**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Interação entre *Methylobacterium extorquens* e cana-de-açúcar
(*Saccharum* sp.)**

Michele de Cássia Pereira e Silva

**Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2008**

Michele de Cássia Pereira e Silva
Farmacêutica

Interação entre *Methylobacterium extorquens* e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)

Orientador: Prof. Dr. WELINGTON LUIZ ARAÚJO

**Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Silva, Michele de Cássia Pereira e
Interação entre *Methylobacterium extorquens* e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) /
Michele de Cássia Pereira e Silva. - - Piracicaba, 2008.
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Biofilmes 2. Cana-de-açúcar 3. Estresse 4. Interação planta-bactéria I. Título

CDD 633.61

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais, Antonio Carlos e Vera Lúcia,
por toda dedicação e amor incondicional.
Por acreditarem em mim sempre.*

DEDICO

*Aos meus irmãos, Kelly e Marcos, pelo
apoio, compreensão e união.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e me dar coragem para superar os momentos difíceis;

À meus pais e meus irmãos por todo apoio, amor e compreensão em mais esta etapa da minha vida;

Ao Dr. Welington Luiz de Araújo, pela orientação, apoio e amizade nesses dois anos de trabalho;

À Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner e prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela amizade e receptividade;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela disponibilização integral da excelente infra estrutura de seu laboratório, indispensáveis a realização deste trabalho;

Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP, funcionários e colegas, que foram importantes em algum passo para a realização deste trabalho;

Aos coordenadores e professores do curso de pós graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos;

À todos os colegas de trabalho do laboratório de Genética de Microrganismos: Aldo Procópio, Alessandro Riffel, Aline S. Romão, Ana Paula Pallu, Anderson Ferreira, Andrea Bogas, Armando Dias, Carlos Vildoso, Cláudia Gai, Danice Luvizotto, Denise Balani, Fernanda Bernardes, Fernanda Sebastianes, Fernando Andreote, Francisco Andreote, Joelma Marcon, José Antonio da Silva (Zezo), Laura Assumpção, Léia Fávaro, Manuella Dourado, Maria Beatriz Calderan, Maria Carolina Quecine, Marise Suzuki, Paulo Lacava, Priscilla Rossetto, Renata Assis, Rodrigo Mendes, Uirá Belmonte, Vanessa dos Santos, pelas brincadeiras, sugestões, apoio técnico e também apoio emocional, pelos almoços no laboratório, no RUCAS, pelos churrascos e cafezinhos durante a tarde. Obrigada por tudo!

Aos colegas do laboratório Max Pfeffer, por toda ajuda, paciência, conversas de laboratório, conversas de boteco, nesses meses de convivência, Danielle Gomes, Mayra Gallo, Mônica Labate, Simone Bragatto, especialmente aos amigos Fernanda Salvato (Honey) e Eduardo

Camargo (Zzé), por estarem sempre presentes e dispostos a colaborar com o trabalho, e por me aguentarem chorando algumas vezes (tá bom, várias vezes!!);

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Plantas, que contribuíram de várias formas, desde sugestões a disponibilização de equipamentos: Bertha Berdejo, Giselle de Carvalho, Paula Martins, Priscila Gratão, Salete Gazioli e Vanderlei Varisi;

À Maria Carolina Quecine, pessoa querida e verdadeira amiga, pela enorme ajuda nos reisolamentos, perdendo seus feriados, pela ajuda na análise dos dados, pelas sugestões, conversas e todo apoio;

Às amigas Léia Fávaro e Aline Romão, por todas as sugestões, e ajuda nos RAPDs, além da companhia nas emocionantes viagens para Londrina;

À Priscilla Rosseto, pela enorme ajuda com a microscopia de varredura;

Aos amigos: Ana Goya, Andréia Cardoso, Christiane Rossi, Eduara Ferreira, Marissol Karine, Polé Lourenço, Simone Déo, Sueli Miguel;

À Dr. Sabrina Moutinho Chambregas, do Centro de Tecnologia Canavieira, por fornecer gentilmente as plantas de cana-de-açúcar utilizadas nesse trabalho;

Ao CNPq pela bolsa de estudos e FAPESP (Proc. 02/14143-3) pelo financiamento de material de pesquisa, respectivamente;

Cada um de vocês teve um papel primordial no desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigada!

"A amizade é um amor que nunca morre"

Mário Quintana

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Bactérias endofíticas	16
2.1.1 Aspectos gerais e importância de <i>Methylobacterium</i> spp.	17
2.2 A interação planta-microrganismo	20
2.2.1 O papel do estresse na interação planta-microrganismo	21
2.3 Ferramentas proteômicas no estudo da interação planta-microrganismo.....	22
2.4 Biofilmes bacterianos e moléculas de quorum sensing.....	23
2.5 Utilização de GFP (Proteína verde fluorescente – Green Fluorescent Protein) para monitoramento de bactérias	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivos Gerais	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Material vegetal	29
4.2 Isolados bacterianos	29
4.3 Meios de cultura.....	30
4.4 Extração de DNA total	30
4.5 Comparação das linhagens de <i>Methylobacterium extorquens</i>.....	31
4.5.1 Análise por RAPD	31
4.5.2 Sequenciamento parcial do 16S rDNA	32
4.6 Padronização das condições de choque térmico	33
4.7 Análise proteômica	33
4.7.1 Quantificação do extrato proteico.....	33

4.7.2 Minigéis.....	34
4.7.3 Géis Bidimensionais.....	35
4.7.3.1 Focalização isoeletrica (IEF).....	35
4.7.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	35
4.7.3.3 Análise de imagem dos géis.....	36
4.8 Avaliação da colonização de <i>Saccharum</i> sp. por <i>Methylobacterium extorquens</i>	36
4.8.1 Inoculação de <i>M. extorquens</i> na planta hospedeira	36
4.8.2 Reisolamento de <i>M. extorquens</i>	36
4.8.3 Ensaio de competição dos isolados de <i>M. extorquens</i>	36
4.8.4 Monitoramento da colonização de <i>M. extorquens</i> por microscopia.....	37
4.8.5 Análise dos dados.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Caracterização das linhagens e determinação do tempo de choque térmico	39
5.2 Estudo da colonização de cana-de-açúcar por <i>Methylobacterium extorquens</i>	41
5.2.1 Estudo da competição entre linhagens de <i>M. extorquens</i>	47
5.3 Estudo proteômico de <i>Methylobacterium extorquens</i>	52
5.3.1 Extração e quantificação das proteínas	52
5.3.2 Separação das proteínas em géis bidimensionais.....	54
5.3.3 Análise de imagem dos géis.....	54
6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS.....	76

RESUMO

Interação entre *Methylobacterium extorquens* e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)

As plantas quando colonizadas produzem diversas enzimas de defesa que podem impedir o estabelecimento de microrganismos. Esta condição adversa na planta hospedeira gera uma resposta do microrganismo, a qual está associada à síntese de proteínas e outras moléculas que atuam na sua interação com a planta e alteram a comunidade microbiana associada. Todos os organismos respondem a essa condição, estabelecendo biofilmes, ou sintetizando um grupo de moléculas e proteínas que os protegem de danos e facilita a recuperação. Estas são chamadas proteínas de choque térmico (HSPs), as quais não foram ainda estudadas na interação *Methylobacterium* – planta. As bactérias do gênero *Methylobacterium* são metilotróficas facultativas da classe Alfa-proteobactéria, encontradas em relações epifíticas e endofíticas com diferentes espécies vegetais. Assim, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito da deficiência da produção de biofilme e de Acil-Homoserina-Lactonas (AHLs), e do estresse térmico de *M. extorquens* na colonização da planta hospedeira (*Saccharum* sp.). Para isso, foram usadas linhagens defectivas para produção de biofilme e AHLs, juntamente com a linhagem selvagem submetida ou não ao estresse térmico. Os resultados obtidos mostram a complexidade dos mecanismos envolvidos na produção de biofilme e moléculas AHLs. O estresse térmico não afetou a colonização das raízes nem de colmos após 5 dias de inóculo, porém causou uma diminuição da colonização do colmo após 15 dias. A mutação para produção de AHL não causou nenhuma diferença significativa na colonização da planta hospedeira, no entanto o mutante para biofilme apresentou uma diminuição significativa da colonização tanto de raízes quanto de colmos, mostrando a grande importância da formação de biofilme na colonização da planta hospedeira. Entretanto, quando esta linhagem foi coinoculada com uma linhagem transformada (ARGFP) este resultado não foi observado. Os demais tratamentos após co-inoculação com a linhagem ARGFP apresentaram o mesmo padrão de colonização. O estudo proteômico de *M. extorquens* detectou um grande número de proteínas induzidas ou suprimidas nos tratamentos avaliados que podem estar associadas às alterações no padrão de interação desta bactéria com a planta hospedeira. A identificação dessas proteínas auxiliará a compreensão e o maior entendimento dos fatores envolvidos na interação bactéria-planta.

Palavras-chave: Interação planta-bactéria, Estresse, Biofilme, Quorum sensing, Reisolamentos

ABSTRACT

Interaction between *Methylobacterium extorquens* and sugarcane (*Saccharum* sp.)

Plants produce a variety of defense enzymes when colonized that can impair the microorganisms' establishment. This adverse condition in the host plant lead to a response from the microorganism, which is associated with the synthesis of a set of proteins and other molecules that affect the interaction with the host and shift the bacterial community associated. All organisms respond to this condition by establishing biofilms, or synthesizing a group of proteins and molecules that protect them from injuries and help them recover from damages. They are called heat shock proteins (HSPs), which is still not studied in *Methylobacterium*-plant interaction. The methylotrophic bacteria of the genus *Methylobacterium* are found in epiphytic and endophytic association with different plant species. So, in this present work the effect of a deficiency in biofilm and acyl-homoserine-lactones (AHLs) production and the effect of heat shock of *M. extorquens* on the host colonization (*Saccharum* sp.) was assessed. Defective strains for biofilm and AHLs production were used. Also the wild type AR 1.6/2 and this strain submitted to heat shock was evaluated. The results demonstrated that the mechanisms associated to biofilm and AHLs production are very complex. The heat stress has no effect on roots or stems colonization after 5 days of the inoculum, but was associated to reduction of bacterial density in stems after 15 days. The strain defective for AHL production showed similar colonization profile with wild type strain, while the biofilm mutant colonized the host plant in low density, suggesting the role of this process in plant colonization. Likewise, coinoculation of this strain with ARGFP target strain, which is AHL producer, the low density of this biofilm mutant was observed. The other treatments after coinoculation with ARGFP strain showed similar result when inoculated alone. A proteomic study of the strains showed that synthesis of many proteins were induced or suppressed in evaluated treatments, which proteins could be associated to shift in the bacteria-plant interaction. The identification of these proteins will contribute to a better understanding of the factors related to bacteria-plant interaction.

Key-words: Plant-bacteria interaction, Stress, Biofilm, Quorum sensing, Reisolations

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Perfil eletroforético dos isolados obtido com os primers (1) OPC-02; (2) OPW-06; (3) OPX-14; 1-AR1.6/2; 2-AR-GFP; 3-P4B12; 4-P20G2. **M** representa o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 1Kb (Invitrogen)..... 39
- Figura 2- Densidade bacteriana reisolada do rizoplano de cana-de-açúcar após 5 e 15 dias de inóculo. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$ 43
- Figura 3- Densidade bacteriana reisolada endofiticamente de raízes de cana-de-açúcar após 5 e 15 dias de inóculo. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$ 44
- Figura 4- Densidade bacteriana reisolada endofiticamente de colmos de cana-de-açúcar após 5 e 15 dias de inóculo. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$ 44
- Figura 5- Densidade bacteriana reisolada do rizoplano após 5 dias de inóculo. **Trat** corresponde apenas ao isolado inoculado e **Trat + GFP** corresponde ao isolado inoculado juntamente com ARGFP. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$ 48

- Figura 6- Densidade bacteriana reisolada endofiticamente de raízes após 5 dias de inóculo. **Trat** corresponde apenas ao isolado inoculado e **Trat + GFP** corresponde ao isolado inoculado juntamente com ARGFP. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$ 49
- Figura 7- Densidade bacteriana reisolada endofiticamente de colmos após 5 dias de inóculo. **Trat** corresponde apenas ao isolado inoculado e **Trat + GFP** corresponde ao isolado inoculado juntamente com ARGFP. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$ 49
- Figura 8- Colonização da superfície da raiz de cana-de-açúcar cultivada *in vitro* por AR 1.6/2 selvagem (**A**), AR 1.6/2 CT (**B**), P4B12 (**C**) e P20G2 (**D**). A seta em (**B**) indica formação de biofilme..... 50
- Figura 9- Colonização do interior de raízes e colmos. AR 1.6/2 selvagem no interior da raiz (**A**) e colmo (**B**). AR 1.6/2 CT no interior da raiz (**C**), colmo (**D**) e colmo de P20G2 (**E**)..... 51
- Figura 10- Perfil de proteínas dos isolados de *M. extorquens*, separadas em gel de poliacrilamida. Quantidades iguais de proteínas foram utilizadas (10 μg). **M**: marcador de massa molecular; **1**: AR 1.6/2 selvagem; **2**: AR 1.6/2 submetida à 40°C por 30 min; **3**: AR 1.6/2 transformada com GFP; **4**: P4B12; **5**: P20G2..... 53

- Figura 11- Padrão de distribuição de proteínas de pH 4-7 de *Methylobacterium extorquens* (A) AR 1.6/2 selvagem e (B) AR 1.6/2 CT. Os números indicam os *spots* diferencialmente expressos detectados pelo programa..... 55
- Figura 12- Alguns dos *spots* detectados pelo programa Image Master e o número de vezes em que foram encontrados mais ou menos expressos em AR 1.6/2CT comparado com AR 1.6/2 selvagem. Os dados foram analisados pelo programa SAS e são médias de 3 repetições..... 56
- Figura 13- Padrão de distribuição de proteínas de pH 4-7 de *Methylobacterium extorquens* P4B12. Os números indicam os *spots* diferencialmente expressos detectados pelo programa..... 57
- Figura 14- Padrão de distribuição de proteínas de pH 4-7 de *Methylobacterium extorquens* P20G2. Os números indicam os *spots* diferencialmente expressos detectados pelo programa..... 58
- Figura 15- Alguns dos *spots* detectados pelo programa Image Master e o numero de vezes em que foram encontrados mais ou menos expressos em P20G2 comparados a AR1.6/2. Os dados foram analisados pelo programa SAS e são médias de 3 repetições 59
- Figura 16- Alguns dos *spots* detectados pelo programa Image Master e o numero de vezes em que foram encontrados mais ou menos expressos em AR 1.6/2 selvagem e P4B12. Os dados foram analisados pelo programa SAS e são médias de 3 repetições..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Diferentes isolados utilizados nos experimentos de colonização.....	29
Tabela 2-	Número de colônias contadas em placa após choque térmico aplicado em diferentes temperaturas e por diferentes tempos. Os experimentos foram repetidos 4 vezes em triplicata. Os dados são médias de 3 repetições.....	40

1. INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente expostas a uma grande quantidade e diversidade de microrganismos como bactérias, fungos, protozoários e vírus, mas a maioria das associações resulta em interações assintomáticas devido a um sistema de defesa da planta bastante elaborado que inclui a produção de espécies reativas de oxigênio, chamado de explosão oxidativa, como parte inicial da resposta. Já as bactérias estão sujeitas a uma série de alterações ambientais, como temperatura, disponibilidade de nutrientes e água, presença de moléculas tóxicas e também moléculas endógenas produzidas durante o metabolismo celular, que podem afetar as condições de crescimento e formação de biofilme.

Dentre os diferentes fatores que induzem estresse, a variação térmica é a que mais tem atraído a atenção de pesquisadores, pois a sua resposta é conservada entre praticamente todos os organismos e induz tanto a síntese de proteínas de choque térmico (HSPs) altamente conservadas como a supressão da síntese da maioria das outras proteínas. Em *Escherichia coli* e outras bactérias, os mecanismos moleculares de estresse térmico já foram bastante estudados, porém em bactérias do gênero *Methylobacterium* poucos estudos existem a respeito, bem como o papel desta resposta na interação bactéria-planta.

As bactérias do gênero *Methylobacterium* são metilotróficas facultativas da classe Alfa-proteobactéria que apresentam a capacidade de crescer utilizando compostos com apenas um carbono, como metanol e metilamina, são encontradas associadas a diferentes espécies vegetais onde podem estar envolvidas com a formação de nódulos, fixação de nitrogênio, produção do fitohormônios. Podem ser observadas como endófitos, ou seja, colonizam tecidos internos da planta sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis. Esta colonização do hospedeiro pode ser influenciada por interações com outros microrganismos associados à planta, nematóides parasitas e pelo genótipo da planta.

Desta forma, no presente trabalho foi avaliada a interação de *Methylobacterium extorquens* com a planta hospedeira, por meio da utilização de mutantes defectivos para produção de biofilme ou acil-homoserina-lactonas, bem como após estresse térmico. Para tanto, a colonização de cana-de-açúcar por esta bactéria foi avaliada por meio de reisolamento e microscopia eletrônica de varredura. O perfil metabólico das linhagens avaliadas foi estudado por meio da análise do perfil de proteínas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias Endofíticas

Bactérias podem interagir com plantas, atuando como patógenos, epífitas ou endófitos. Os endófitos são microrganismos que em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida colonizam o interior de tecidos vegetais sem causar dano aparente à planta hospedeira (CARROLL, 1986; PETRINI, 1991), ou ainda microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro ou formar estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

As bactérias endofíticas possuem, da mesma forma que patógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistemicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto (MAHAFFEE et al., 1997; QUADT-HALLMANN et al., 1997b), vasos condutores (MAHAFFEE et al., 1997; HALLMANN et al., 1997) e ocasionalmente o meio intracelular (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996; QUADT-HALLMANN et al., 1997a). Com esta colonização sistêmica da planta, estas bactérias podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre as populações de outros microrganismos presentes no interior da planta (ANDREOTE et al., 2004; ANDREOTE et al., 2006). Entre as enzimas produzidas por estes microrganismos, podem ser citadas amilases (STAMFORD et al., 2001), exolevanases (MENENDEZ et al., 2002), quitinases (PLEBAN et al., 1997), glucanases (MOY et al., 2002) e proteases (REDDY et al., 1996), as quais podem atuar em processos importantes na interação microrganismo-planta.

Papéis ecológicos importantes têm sido designados à bactérias e fungos endofíticos. Alguns endófitos, como *Klebsiella pneumoniae* 342 (Kp342) favorecem a nutrição e crescimento de plantas. O estímulo do crescimento de plantas por esses microrganismos pode ser consequência da fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios, biocontrole de fitopatógenos na zona da raiz (por meio da produção de agentes antifúngicos e antibacterianos, produção de sideróforos, competição por nutrientes e indução de resistência sistêmica), ou por aumento na disponibilidade de minerais (STURZ et al., 2000).

Bactérias endofíticas têm sido estudadas na indução de resistência sistêmica. Alguns autores sugerem que a penetração ativa da bactéria endofítica no hospedeiro, com hidrólise de celulose, pode causar uma reação de hipersensibilidade ativando os mecanismos de defesa da

planta (QUADT-HALLMANN et al., 1997a). Porém estudos realizados por Nandakumar et al. (2001) sugerem que a atividade hidrolítica pode atuar direta ou indiretamente sobre o desenvolvimento da doença, pois foi verificado a produção de duas quitinases e cinco peroxidases pelos isolados que induziram resistência ao patógeno, sugerindo um papel destas enzimas na indução de resistência sistêmica.

Em um estudo de diversidade microbiana, foi observado que a comunidade bacteriana endofítica de *Citrus* spp. é constituída por *Bacillus* spp., *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp. e *Curtobacterium flaccumfaciens* (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002). Posteriormente, foi observado que esta comunidade endofítica pode interagir com a bactéria patogênica *Xylella fastidiosa* (ARAÚJO et al., 2002) ou com o fungo endofítico *Guignardia mangiferae* (*G. citricarpa*) (ARAÚJO et al., 2001). O isolamento frequente de *C. flaccumfaciens* como endófito de plantas de citros assintomáticas infectadas com *Xylella fastidiosa* sugerem que esta bactéria endofítica pode atuar na redução dos sintomas causados por esta bactéria patogênica (ARAÚJO et al., 2002).

2.1.1 Aspectos Gerais e Importância de *Methylobacterium* spp.

O gênero *Methylobacterium* pertence à subclasse Alfa-2 de *Proteobacteria*, ordem Rhizobiales, família *Methylobacteriaceae* e atualmente possui 24 espécies descritas: *M. chloromethanicum*, *M. dichloromethanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. lusitanum*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. populi*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. suomiense*, *M. thiocyanatum*, *M. zatmanii*, *M. nodulans*, *M. oryzae*, *M. adhaesivum*, *M. aminovorans*, *M. aquaticum*, *M. hispanicum*, *M. isbiliense*, *M. jeotgali*, *M. podarium* e *M. variable*. Constituem um grupo de bactérias de coloração rósea metilotróficas (Metilotróficas facultativas com pigmento rosado – PPMF) aeróbias, gram-negativas, e que apesar de serem capazes de crescer em uma ampla faixa de substratos se caracterizam pela capacidade de crescer utilizando compostos com apenas um carbono como formaldeído e metanol como única fonte de energia.

Membros desse gênero estão distribuídos em uma variedade de ambientes naturais como solo, ar, poeira, água doce e salgada, sedimentos e ambientes urbanos, tais como suprimento de água, banheiros e ar condicionado (VAN AKEN et al., 2004a), bem como associados à plantas

(ARAÚJO et al. 2002; SY et al. 2001). Entretanto, pouco se sabe do papel da metilotropia na adaptação da bactéria a esses ambientes. Jourand et al. (2005) estudaram o papel da metilotropia durante a simbiose entre *M. nodulans* e *Crotalaria podocarpa*. Fusionando *lacZ* ao gene *mxoF* os autores observaram que os genes de metilotropia são expressos nos nódulos da raiz, sugerindo atividade metilotrófica durante a simbiose, enquanto que a perda dessa função afetou significativamente o desenvolvimento da planta. Em outro estudo, experimentos de competição entre linhagens selvagens de *M. extorquens* e mutantes defectivos para metilotropia revelaram que a habilidade para utilizar metanol como fonte de carbono e energia fornece uma vantagem seletiva durante a colonização de *Medicago truncatula* (SY et al., 2005).

Estudos sugerem que o grau de associação *Methylobacterium*-planta varia de forte, ou simbiótico (JOURAND et al., 2004), a fraco ou epifítico (OMER et al., 2004), faixa que inclui também o estado intermediário de associação endofítica (LACAVA et al., 2004). Espécies do gênero *Methylobacterium* podem ser encontradas em associação com mais de 70 espécies de plantas (OMER et al., 2004). Estudos têm demonstrado que *Methylobacterium* spp. coloniza ativamente a superfície de folhas de diferentes hospedeiros (CHANPRAME et al., 1996) podendo ser encontrado também como endófito de citros (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002), pinus (PIRTTILA et al., 2000), crotalaria (SY et al., 2001) e morangos (ABANDA-NKPWATT et al., 2006). A presença do gene da nitrogenase (*NifH*) e de genes para nodulação já foi descrita em espécies deste gênero (SY et al., 2001), sugerindo a possibilidade destes organismos fixarem N₂. *Methylobacterium* spp. também possui a capacidade de sintetizar celulase e pectinase (FERREIRA FILHO et al., 2001), induzindo resistência às plantas hospedeiras (MADHAIYAN et al., 2006).

Tem sido observado que *Methylobacterium* spp. pode estar associado à biodegradação de compostos, visto que estudos de detoxificação de hidrolisados de ligninocelulose para produção de etanol (LOPÉZ et al., 2004) mostrou, entre outros microrganismos, *M. extorquens* como capaz de degradar compostos derivados de furanos. Esses compostos são tóxicos e inviabilizam a posterior fermentação por outros microrganismos como *S. cerevisiae*. Van Aken et al. (2004b) isolaram uma linhagem de *Methylobacterium* sp., BJ001, capaz de degradar explosivos tóxicos como TNT, sugerindo um papel desta na atenuação natural ou biodegradação *in situ* de ambientes contaminados por explosivos, devido a distribuição do gênero em diversos ambientes naturais e sua associação com plantas.

A síntese de PHAs (polihidroxialconoatos), entre eles PHBs (polihidroxibutiratos) e PHB/HV, já foi relatada em várias espécies do gênero (TROTSENKO et al., 2001). Recentemente, estudos foram realizados por Yezza et al. (2006) com uma nova linhagem pertencente ao gênero *Methylobacterium* designada GW2, e esta se mostrou capaz de produzir quantidades altas de PHB e PHB/HV.

M. extorquens também se mostrou capaz de super expressar proteínas intracelulares recombinantes, como a proteína verde fluorescente e uma esterase, por meio de fermentação utilizando metanol como única fonte de carbono orgânico e energia (FIGUEIRA et al., 2000; FITZGERALD; LINDSTROM, 2003; BÉLANGER, et al., 2004; CHOI et al., 2004). Shen e Wu (2007) construíram uma linhagem capaz de super expressar uma hidroxipiruvato redutase, um componente chave no ciclo da serina, levando ao acúmulo de glioxilato. O glioxilato é comercialmente importante na fabricação de perfumes, drogas e pesticidas.

Methylobacterium spp. inoculadas em sementes de cana-de-açúcar tem efeito estimulador na germinação, possivelmente pela produção de fitohormônios, como o ácido 3 indol acético (AIA) e giberelinas, além de promover o crescimento vegetal (MADHAIYAN et al., 2005). Também contribui para na flavorização de morangos, e tem sido localizadas como endossimbiontes de células de *Pinus sylvestris* (PIRTTILA et al., 2000). Estudos realizados por Madhaiyan et al (2006) mostraram que a inoculação de *Methylobacterium* em plantas de arroz diminuiu a susceptibilidade destas ao patógeno *Rhizoctonia solani*, pelo aumento de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e compostos fenólicos na planta, possível mecanismo de defesa. A coinoculação com *Rhizobium* spp. resultou em um aumento significativo no crescimento vegetal e nodulação, quando comparados ao inóculo individual de *Rhizobium* spp.

Em tomates, foi observado que a inoculação de *M. oryzae* reduz a toxicidade a níquel e cádmio, metais pesados fitotóxicos, e também promove o crescimento da planta (MADHAYVAN, et al., 2007). *Methylobacterium* foi encontrado como gênero dominante da rizosfera e tecidos da planta de *Thlaspi geosingense* (IDRIS et al., 2004), e esta bactéria apresentou resistência a concentrações extremamente altas de metais pesados, como cádmio, cromo e mercúrio (MARCO et al., 2004).

Em citros, *Methylobacterium* spp. têm sido consistentemente isolada como endófito de ramos (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004), e nesta planta hospedeira tem sido sugerido que apresenta interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da CVC (clorose

variegada dos citros). Bactérias do gênero *Methylobacterium* foram mais frequentemente isoladas de plantas com sintomas de CVC que de plantas saudáveis (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004). Esses resultados, sugerem que isolados de *Methylobacterium* poderiam atuar sinergisticamente no desenvolvimento dos sintomas da CVC causado por *Xylella fastidiosa*.

2.2 A interação planta-microrganismo

A interação entre plantas e microrganismos vem sendo relatada há muito tempo e com exceção da associação entre plantas e fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de N₂, acreditava-se que esta interação levasse a formação de lesões nos tecidos vegetais, as quais poderiam causar a morte da planta. Nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado que a presença de microrganismos no interior de tecidos vegetais pode aumentar o *fitness* da planta. Dessa forma, apesar de um grande número de microrganismos terem potencial fitopatogênico, a maioria das interações permanece assintomática, devido a um elaborado sistema de defesa da planta (LIPKA & PANSTRUGA, 2005) e equilíbrio da comunidade microbiana.

A cascata de eventos que ocorre a partir do reconhecimento do patógeno pela planta resulta em uma grande alteração do metabolismo celular, a qual inclui o acúmulo de vários metabólitos secundários (HAHLBROCK et al., 2003). Os mecanismos envolvidos nessa rede de eventos são ainda pouco conhecidos, e a julgar pela sua complexidade, estão longe de serem elucidados e, portanto, estudos visando desvendar esses mecanismos tem sido realizados. Utilizando a tecnologia de microarranjos foram identificados em *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes super regulados e hipo regulados durante a interação com a planta hospedeira (OKINAKA et al., 2003). Muitos genes super regulados foram identificados, como relacionados a fatores de virulência, anaerobiose, quimiotaxia, resistência a xenobióticos e resposta ao estresse, importantes no crescimento e adaptação do patógeno ao ambiente do hospedeiro. Utilizando a mesma técnica Wang et al. (2005) verificaram alteração na expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* quando inoculada com *P. fluorescens*, e esta mudança incluiu aumento na expressão de genes envolvidos com metabolismo, transdução de sinais e resposta ao estresse. Estes resultados mostram que durante a interação bactéria-planta, ocorre uma mudança no perfil transcricional

dos organismos envolvidos na interação, e esta mudança poderia estar associada à manutenção da interação.

2.2.1 Papel do estresse na interação planta-microrganismo

As bactérias estão sujeitas a uma série de alterações ambientais, como temperatura, disponibilidade de nutrientes e água, presença de moléculas tóxicas, até mesmo deletérias que se originam do próprio metabolismo e que podem resultar em condições adversas de crescimento (RAMOS et al., 2001). Um dos mecanismos desenvolvidos por bactérias para sobreviver em tais situações é a capacidade de responder ao estresse sintetizando diferentes moléculas que favorecem o seu desenvolvimento nessas condições adversas. Essa resposta ao estresse é mediada por alterações no padrão de expressão gênica que resulta em aumento da tolerância da bactéria ao fator que iniciou a resposta, e geralmente também a um grande número de outros fatores (JENKINS et al., 1988; JENKINS et al., 1990; PICHEREAU et al., 2000).

O estresse térmico é a condição de estresse para a qual mais tem sido dada atenção. A maioria dos organismos responde ao aumento de temperatura induzindo a síntese de uma série de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins - HSPs). Essas proteínas pertencem a uma classe de chaperonas moleculares, responsáveis pelo correto dobramento de outras proteínas sintetizadas e pela prevenção da agregação protéica. Em *E. coli*, por exemplo, após um aumento de 30° para 42°C, o nível celular do fator σ^{32} aumenta significativamente. Esse aumento direciona a RNA polimerase a transcrever mais de 20 genes específicos codificantes de HSPs. A indução de resposta à temperatura está conectada a processos metabólicos específicos na célula (RAMOS et al., 2001).

Estudos dão suporte a idéia de que o choque térmico induz a produção de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo induz a uma resposta de choque térmico tanto em procariotos quanto em eucariotos (BENOV; FRIDOVICH, 1995). Nos últimos 10 anos, a resposta ao estresse a diferentes tipos de condições tem sido intensamente estudada em várias bactérias, sendo a regulação gênica já bastante conhecida em organismos como *E. coli*. (ATLUNG et al., 1997; HENGGE-ARONIS, 2002). Em estudo recente, foi observado por meio de microarranjos de DNA, que a bactéria *Xylella fastidiosa*, o agente causal da Clorose Variegada dos Citros, após estresse oxidativo apresenta um aumento significativo da expressão

de proteínas de adesão (adesinas), além de outros fatores associados ao revestimento celular (MUNIZ, 2006). O aumento da expressão de proteínas de adesão também foi verificado no estudo realizado por Tsugawa et al. (2007) com células Caco-2 intestinais e *Plesiomonas shigelloides*. Os autores concluíram que o contato patógeno-hospedeiro atua como um sinal levando a uma maior expressão de GroEL, uma HSP, e esta estimula a adesão de *P. shigelloides* a células do hospedeiro.

A superexpressão de genes responsáveis pela expressão de colicinas (toxinas com ação bactericida de amplo espectro) também foi verificada no estudo de Muniz (2006). Os mecanismos de resposta aos fatores de estresse para a maioria das bactérias, como *Methylobacterium* spp., continuam pouco definidos, assim como a influência desses fatores na interação planta – bactéria e na comunidade microbiana associada.

2.3 Análise proteômica no estudo da interação microrganismos-planta

O objetivo maior da abordagem proteômica é contribuir para o entendimento global e integrado da biologia da célula, uma vez que muitas informações não podem ser obtidas apenas a partir do estudo dos genes. As proteínas são os agentes definitivamente responsáveis pelos fenótipos das células, e em função disso, torna-se impossível elucidar processos como, por exemplo, mecanismos de doença, envelhecimento e os efeitos do ambiente, somente pelo estudo dos genes (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

Os primeiros estudos com proteínas que podem ser chamados proteômicos começaram em 1975 com a introdução dos géis em duas dimensões por O'Farrell, Klose e Scheele, porém o termo “proteoma” surgiu apenas em 1994, para designar o conjunto de proteínas expresso pelo genoma de uma célula, em um determinado ambiente (WILKINS et al., 1995; ANDERSEN; ANDERSEN, 1996). A proteômica despontou como uma das vertentes da era pós-genômica, como resultado direto dos avanços conseguidos pelo sequenciamento em larga escala de DNA (PANDEY; MANN, 2000).

O estudo do proteoma tem-se desenvolvido principalmente por meio da separação das proteínas por eletroforese em gel bidimensional, o qual combina duas técnicas de separação. Na primeira separação (primeira dimensão) as proteínas são separadas, por meio de uma alta tensão, em um gradiente de pH imobilizado em um gel de acrilamida até alcançarem o ponto

estacionário ou ponto isoeletrico (*pI*). Na segunda dimensão as proteínas são separadas por peso molecular (*PM*) também em gel de poliacrilamida, originando os diversos pontos no gel ou “*spots*”. Após a coloração do gel, observa-se um perfil bidimensional, posteriormente documentado por meio de programas apropriados que permite analisar a abundância da proteína em cada *spot* através do volume, intensidade e área.

O próximo passo é a identificação das proteínas no gel por meio da espectrofotometria de massa. Para tal, as proteínas de interesse são recortadas do gel, fragmentadas (obtenção dos peptídeos), geralmente por digestão triptica, e os fragmentos são analisados em espectrômetro de massa auxiliados por programas de bioinformática (MANN et al., 1993; HENZEL, 1993; PAPPIN, 1997). Esta abordagem permite identificar e caracterizar proteínas em larga escala, tendo sido desenvolvida por Henzel et al. (1993) e imediatamente difundida e utilizada em laboratórios do mundo todo (PORUBLEVA et al., 1996; KERIM et al., 2003; RENAUT et al., 2004).

A análise proteômica vem sendo amplamente utilizada para estudar detalhadamente bactérias, fungos, plantas e as interações entre eles. A análise comparativa dos mapas gerados permite a identificação de proteínas com acúmulo diferencial, induzidas ou suprimidas, sob diferentes condições (GUERREIRO et al., 1997). A análise diferencial de proteomas tem sido utilizada em estudos de interações simbióticas entre rizóbio e leguminosas (GUERREIRO et al., 1997) e ectomicorrizas (GUTTENBERGER; HAMPP, 1992). Paper et al. (2007) utilizaram a espectrometria de massa MS/MS para identificar proteínas envolvidas na patogênese de *Fusarium graminearum* durante seu crescimento *in vitro* e *in planta* (trigo).

A identificação de proteínas de folhas de arroz diferencialmente expressas em resposta ao fungo *Magnaporthe grisea* foi possível por meio do uso de eletroforese bidimensional (KIM et al., 2004), onde os autores encontraram oito proteínas com maior expressão durante a interação, pertencentes ao grupo das proteínas PR.

2.4 Biofilmes Bacterianos e Comunicação Celular (*quorum sensing*)

Biofilmes são agregados de microrganismos aderidos uns aos outros e/ou a uma superfície e envoltos por uma matriz de exopolímeros (COSTERTONI et al., 1995) composta de uma mistura de componentes, tais como exopolissacarídeos (EPS), proteínas, ácidos nucleicos e

outras substâncias (DAVEY; O'TOOLE, 2000). O termo biofilme também é empregado para designar comunidades de microrganismos (bactérias ou fungos) mobilizadas sobre uma superfície que abriga, estabiliza e otimiza a vida do organismo (KOLENBRANDER, 2000).

As bactérias do biofilme apresentam certas particularidades não encontradas em bactérias livres, como uma plasticidade notável, um gradiente físico-químico significativo formando micronichos, além de propiciar um ambiente protegido com alta densidade celular que permite uma cooperação e interação entre elas. A lista dos efeitos da formação de biofilme na ecologia e biologia bacteriana é grande, e inclui proteção contra desidratação, luz UV, bactericidas e aumento de trocas genéticas (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

Os principais benefícios da vida em um biofilme são, melhor comunicação entre células, em função da solução de continuidade entre elas, facilitando as atividades bioquímicas, a divisão do trabalho, a possibilidade de realizar ações coletivas, cooperação dentro do grupo e também com colônias vizinhas (KREFT et al., 2001; KREFT, 2004).

Essa estratégia de colonização é a chave para a sobrevivência e dominância desses microrganismos na planta hospedeira, visto que a localização em ambientes protegidos da superfície da planta e estruturas de biofilmes podem aumentar a resistência a estresses (MORRIS; MONIER, 2003).

Os indivíduos interagem entre si por meio da produção de moléculas sinalizadoras conhecidas como moléculas de *quorum sensing*, assim chamadas pois o nível de sinais requeridos para indução gênica ocorre apenas quando uma densidade apropriada ou *quorum* está presente (LOH et al., 2002). Estas moléculas apresentam baixo peso molecular, são produzidas por diversas bactérias e apresentam a capacidade de atuar na comunicação celular bactéria-bactéria e bactéria-planta (CHA et al., 1998; GRAM et al., 1999) regulando a expressão de genes responsável por diferentes fenótipos.

O tipo predominante de molécula sinalizadora produzidas por bactérias gram negativas é do grupo das acyl homoserina-lactonas (AHLs), sintetizadas a partir de S adenosil metionina (SAM). Todas as AHLs compartilham o mesmo núcleo homoserina-lactona, porém grupamentos acil distintos podem ser incorporados às cadeias laterais (CAMILLI; BASSLER, 2006). Um dos mecanismos envolvidos com estes reguladores é a produção de compostos antifúngicos, formação de biofilme (DAVIES et al., 1998) e produção de polissacarídeos extracelulares (VON BODMAN; FARRAND, 1995).

Microarranjos de DNA foram utilizados para estudar a expressão de genes relacionados com a formação de biofilme em *E. coli*, e mostraram a presença de vinte e dois genes induzidos significativamente durante este processo, incluindo genes de resposta ao estresse e 11 genes com função desconhecida (REN et al., 2004). Jacques et al. (2005) observaram que, em condições de estresse hídrico, o número de células livres de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* sobre folhas de feijão diminui significativamente permanecendo somente as células em biofilmes. Entretanto, os autores observaram que após supressão do estresse hídrico o número de células livres aumenta novamente, mostrando a importância do biofilme para a manutenção de populações bacterianas associadas à planta hospedeira e uma correlação entre biofilmes e estresse.

A formação de biofilme é determinada por uma sequência de genes que podem induzir as células bacterianas a se aderirem a uma superfície e posteriormente estruturar um biofilme. Para *X. fastidiosa*, tem sido sugerido que o biofilme seja importante para obstrução dos vasos, fato este que poderia ser um importante fator de patogênese (MARQUES et al., 2002). Posteriormente, foi observado que a capacidade de produzir biofilme na planta e no inseto podem ser diferencialmente regulados, e que um sinal difusível é necessário para a formação deste biofilme no inseto (NEWMANN et al., 2004). Os autores observaram que mutantes defectivos para a formação da molécula sinalizadora DSF não formam biofilme no inseto vetor, nem tampouco são transmitidos por este inseto. Entretanto, estes mutantes formam biofilme na planta e apresentam uma virulência maior.

Em *Methylobacterium* spp. estudos mostram que a produção de biofilme pode ser dependente da produção de moléculas de *quorum sensing* (DAVIES et al., 1998; NIETO-PEÑALVER et al., 2006), e que a formação de biofilme sobre a planta pode ser a primeira etapa para a colonização endofítica na interação *Methylobacterium*-planta (ANDREOTE et al., 2006), sugerindo a importância do entendimento destes processos envolvidos na interação bactéria-planta.

2.5 Utilização da GFP (*Green Fluorescent Protein*) para monitoramento de bactérias

A GFP (*Green Fluorescent Protein*) é uma proteína pequena encontrada na água-viva *Aequorea victoria* que possui a propriedade de fluorescer quando excitada por UV ou por luz

azul de onda curta (CHALFIE et al., 1994). Não requer cofatores exógenos para a fluorescência (CODY et al., 1993), o que significa que quando o gene da GFP é colocado sob controle de um promotor, o momento e a duração da expressão do promotor podem ser estudados em tempo real no tecido vivo, sem fixação ou destruição de células (GAGE et al., 1996). Devido a isso, este gene vem sendo amplamente utilizado para estudos de interação entre microrganismos (MONIER; LINDOW, 2005), em estudos de aplicação de microrganismos na biorremediação e como biossensores (BOLDT et al., 2004, DEANGELIS et al., 2005), além do estudo de interação microrganismos-planta (LACAVA et al., 2007; STUURMAN et al., 2000; GAGE et al., 1996).

Um plasmídeo vetor (pDSK-GFPuv) expressando fortemente a proteína GFP foi construído por Wang et al. (2007) para o monitoramento do processo de infecção, localização e atividade por microscopia de fluorescência. Os autores puderam acompanhar o processo infeccioso e observaram uma boa correlação entre o número de células bacterianas e a intensidade da fluorescência, permitindo a obtenção de uma estimativa rápida da densidade populacional.

Figueira et al. (2000) utilizaram a GFP como um modelo para proteínas heterólogas na identificação de vetores apropriados, bem como de promotores eficientes, para *M. extorquens*. O sistema de expressão do gene da GFP pode ser utilizado na análise de genes importantes industrialmente para essa e outras bactérias. Elbeltagy et al. (2001) utilizaram a GFP para monitoramento da colonização e para a localização de uma linhagem de *Herbaspirillum* sp. em arroz irrigado. Os autores observaram pela expressão do gene da GFP que o endófito em condições axênicas coloniza sementes e brotos obtidos das sementes inoculadas. Foi verificado que essa colonização ocorre principalmente nos espaços intercelulares das folhas da planta hospedeira.

A GFP tem sido utilizada com sucesso em estudos de diferentes aspectos do processo de nodulação, sendo expresso por *Rhizobium* sp. (XI et al., 1999). Existem moléculas de GFP mutantes, que possuem alterações das suas propriedades de excitação e emissão (TSIEN, 1998). Essas GFPs de colorações diferentes (chamadas de proteína autofluorescentes - AFPs) permitem o uso de marcas múltiplas de fluorescência, podendo ser distinguidas facilmente umas das outras (ELLENBERG et al., 1999; YANG et al., 1998). Utilizando essas AFPs, Stuurman et al. (2000) monitoraram a variação de espécies de *Rhizobium* marcadas com as proteínas fluorescentes de cores diferentes, durante os vários estágios da simbiose com diferentes espécies de plantas. Gage

et al. (1996) também estudaram a simbiose de *Rhizobium* e alfafa por meio de construções de plasmídeos expressando constitutivamente o gene da GFP. Os autores puderam visualizar e avaliar o crescimento e o comportamento de *Rhizobium meliloti* em alfafa nos estágios iniciais da infecção e nodulação. Estes resultados mostram a viabilidade de se utilizar bactérias endofíticas expressando o gene da GFP para o estudo de colonização destas bactérias na planta hospedeira.

Lacava et al. (2007) utilizaram a bactéria endofítica *Klebsiella pneumoniae* transformada com o gene da GFP para comparar seu perfil de colonização em *Catharanthus roseus* e *Citrus sinensis* por meio das técnicas de isolamento e microscopia de fluorescência. Os autores verificaram um padrão similar de colonização, sugerindo que os resultados obtidos com *C. roseus* poderiam ser utilizados para um maior entendimento da interação endófito-citros.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a interação entre *Methylobacterium extorquens* com a planta hospedeira, utilizando para isso mutantes defectivos para produção de biofilme e acil-homoserina lactonas, e uma linhagem submetida a estresse térmico .

3.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- ✓ Avaliar os efeitos do estresse térmico de *M. extorquens* sobre o padrão de colonização de cana-de-açúcar por meio de isolamentos e microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Avaliar o padrão de colonização de cana-de-açúcar por mutantes de *M. extorquens* deficientes para produção de biofilme e Acil-homoserina-lactonas por meio de isolamentos e microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Avaliar o papel do estresse térmico, produção de biofilme e acil-homoserina-lactonas na competição entre isolados de *M. extorquens* em cana-de-açúcar;
- ✓ Avaliar o padrão de proteínas de *M. extorquens* submetida ao estresse térmico e de mutantes defectivos para produção de biofilme e acil-homoserina-lactonas, por meio das técnicas de SDS PAGE e géis bidimensionais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foi utilizada a variedade comercial SP70 – 1143 de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) gentilmente cedida pela Dr. Sabrina Moutinho, do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba SP. As plantas foram cultivadas *in vitro* em condições axênicas sobre meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

4.2 Isolados bacterianos

Foram utilizados 5 tratamentos com 4 linhagens de *Methylobacterium extorquens* (Tabela 1). Estas linhagens foram obtidas da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, ESALQ/USP. As bactérias foram cultivadas em meio CHOI 3 (TOYAMA et al., 1998) a 28°C por 48 h. Os mutantes utilizados nos experimentos foram gerados com uso de transposon mini-Tn5 por Gai (2006).

Para os experimentos de reisolamento e competição foram utilizadas as linhagens AR1.6/2 selvagem, previamente isolada de citros (ARAÚJO et al., 2002), esta mesma linhagem AR1.6/2 submetida a choque térmico, designada aqui como AR1.6/2CT, e as linhagens ARGFP, P4B12 e P20G2 (Tabela 1).

Tabela 1: Diferentes linhagens utilizadas nos experimentos

Tratamento	Características	Referências
AR1.6/2	Linhagem selvagem endofítica de citros	Araujo et al. (2002)
AR1.6/2CT	Linhagem selvagem submetida a estresse térmico	Este estudo
AR GFP	Linhagem AR1.6/2 transformada com gene de GFP	Ferreira-Filho (2002)
P4B12	Mutante defectivo para produção AHLs	Gai (2006)
P20G2	Mutante defectivo para formação de biofilme	Gai (2006)

4.3 Meios de cultura

4.3.1 Meio CHOI 3 (TOYAMA et al., 1998)

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5g
KH ₂ PO ₄	1,305g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	4,02g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,45g
Solução de metais*	10ml
Ágar	15g
Água	1000ml
*Solução de metais	
CaCl ₂ .H ₂ O	2g
FeSO ₄ .7H ₂ O	2g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5g
ZnSO ₄ .H ₂ O	0,26g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,08g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,08g
H ₃ BO ₃	0,06g
Água	1000ml

Metanol (10ml/l) foi adicionado após autoclavar o meio de cultura.

Tetraciclina (50µg/ml) foi adicionada para o crescimento/isolamento da linhagem ARGFP e canamicina (100µg/ml) foi adicionada para o crescimento/isolamento das linhagens P4B12 e P20G2.

4.4 Extração de DNA total

Foram centrifugados 5 ml de uma cultura bacteriana em meio CHOI 3 líquido por 2 minutos a 12000g. O precipitado foi ressuspensionado em 500 µl de TE, centrifugado novamente, e ressuspensionado em 500 µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0). Foram adicionados 30 µl de SDS 10%, incubado por 10 minutos a 65°C, adicionados 0,1 g de esferas de

vidro (0,1 mm de diâmetro – *Sigma*) e agitada em agitador de pérolas (*Bead Beater, Ação Científica*) por 1 minuto. O DNA foi purificado pelo método fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989) e quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e DNA do fago *Lambda* (*Invitrogen*) com concentração conhecida. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídio e fotodocumentado sobre luz UV.

4.5 Comparação das linhagens de *Methylobacterium extorquens*

Tendo em vista que os mutantes foram obtidos da linhagem AR1.6/2, a similaridade genética entre elas foi confirmada por meio de RAPD e sequenciamento parcial do 16S rDNA.

4.5.1. Análise por RAPD

Para análise por RAPD foram utilizados os *primers* aleatórios OPX-14 (5'-ACAGGTGCTG-3'), OPC-02 (5'-GTGAGGCGTC-3') e OPW-06 (5'-AGGCCCCGATG-3') (*Operon Technologies*), diluídos a 4µM em água ultrapura (Milli-Q) e armazenados a -20°C.

As reações de RAPD foram conduzidas em termociclador (*Perkin-Elmer Gene AmpPCR System 9700*) programado para efetuar uma desnaturação inicial de 92°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo apresentou uma etapa de desnaturação de 1 minutos a 92°C, seguida de uma etapa de anelamento de 37°C por 2 minutos e posterior etapa de alongamento de 72°C durante 3 minutos, com uma extensão final de 3 minutos a 72°C. As amostras foram amplificadas em reações com volume final de 25mL, apresentando 0,2mM de cada nucleotídeo; 0,40mM de *primer*; 1,5U da enzima Taq DNA polimerase (*Fermentas*); 5,0mM de MgCl₂, e 75ng de DNA genômico. Os produtos gerados na reação de RAPD foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,4% em tampão TAE 1X. Posteriormente, o gel foi corado em brometo de etídio, e fotodocumentado sobre luz UV.

4.5.2 Sequenciamento parcial do 16S rDNA

Para a amplificação da região do 16S rDNA foram utilizados os *primers* R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-

3'). As reações foram realizadas em um volume de 50 μL , contendo 3,75 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μM de cada primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1 μL de DNA molde (10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (*Perkin-Elmer Gene AmpPCR System 9700*), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C; 1 min a 62,5°C; 1 min a 72°C, e uma extensão final de 7 min a 72°C. O fragmento de DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,2% a 3 volts cm^{-1} , juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL^{-1}) e fotodocumentado.

O fragmento amplificado foi purificado com PEG 8000. Para isso 50 μL de PEG foram adicionados a 50 μL do produto de PCR e homogeneizado com pipeta, e incubado por 15 minutos 37°C. A solução foi centrifugada (15000xg) por 15 minutos a temperatura ambiente, e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 125 μL de etanol 80% gelado, pelas laterais do tubo, e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido, e os passos a partir da adição do etanol foram repetidos. O DNA precipitado foi seco a 37°C por 15 minutos e ressuscitado em 30 μL de água ultrapura (Milli-Q) por 12 h a 4°C.

Os fragmentos purificados foram seqüenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo – SP. Para a identificação, as seqüências foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank, por meio do BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Foram consideradas as seqüências que apresentaram os mais altos valores de similaridade. Posteriormente, as seqüências foram comparadas por meio de alinhamento, utilizando o programa *Clustal X 1.8*.

4.6 Padronização das condições de choque térmico

Para avaliação do efeito do estresse térmico de *M. extorquens* sobre o padrão de colonização de cana-de-açúcar, a linhagem AR1.6/2 foi crescida em 5mL de meio CHOI 3 líquido por 48 horas. Em seguida a cultura bacteriana foi centrifugada por 2 minutos a 12000xg. O precipitado de células foi então ressuscitado em 1,6 mL de tampão PBS (NaCl 0,8%, KCl 0,02%, Na_2HPO_4 0,144%, KH_2PO_4 0,024%). Alíquotas de 300 μL dessa suspensão, juntamente com 200 μL de tampão PBS foram submetidas ao choque térmico por 30 minutos em termobloco

(*Biometra TBI, Whatman Company*), onde foram utilizadas as temperaturas 28°C (controle), 33°C, 37°C, 40°C e 45°C. Após este tratamento, a suspensão bacteriana foi diluída e semeada sobre meio CHOI 3 sólido e incubado a 28°C por 72 horas, quando foi estimada a taxa de sobrevivência da bactéria. A maior temperatura com maior taxa de sobrevivência foi utilizada.

4.7 Análise Proteômica

4.7.1 Extração de proteínas

As linhagens foram crescidas em meio CHOI 3 líquido a 28°C, sob agitação (150rpm) por 24h. Em seguida, 10mL desse pré-inóculo foi transferido para 150mL de CHOI 3 e mantido a 28°C por 30h sob agitação (150rpm). Em seguida a cultura foi centrifugada por 3 minutos a 10000xg, o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 20mL de meio CHOI 3 a 40°C e mantidas sob agitação (100rpm) por 30 minutos à temperatura do choque térmico. O controle foi realizado utilizando a temperatura de 28° C para todo o procedimento. Após o choque térmico, a cultura foi deixada a 28°C por 15 minutos e em seguida foi centrifugada por 3 minutos a 10000xg. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao precipitado 10mL de TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0) acrescido de 0,3mg/mL de PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonil) como inibidor de protease. A suspensão foi novamente centrifugada e as células foram transferidas para tubos de 1,5mL para extração das proteínas. Para isso, foram adicionados 300 µL de tampão de extração (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0; 0,3mg/mL PMSF), 0,1 g de sílica (0,1 mm de diâmetro, *SIGMA*) e agitado (3000 bpm) em homogeneizador de células por 2 ciclos de 1 minuto. Esta suspensão celular foi centrifugada (10000xg) por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e imediatamente armazenado a -20°C.

Para a obtenção de um extrato protéico sem interferentes, as amostras obtidas com a metodologia acima descrita foram precipitadas com solução de acetato de amônio 0,1M em metanol por 18 horas a -20°C. Após esse período o precipitado foi lavado 3 vezes com solução 0,1M de acetato de amônio em metanol, 1 vez com metanol e 1 vez com acetona 100%. Em cada etapa, as proteínas foram precipitadas por 1 hora a -20°C, centrifugadas por 30 minutos a 10000 xg, secas a 4°C em dessecador por 24 horas e solubilizadas em 300µL de tampão de solubilização

suplementado com 15mM de iodoacetamida e 2M de tiouréia.

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o Kit Biorad Protein Assay (*BioRad*), baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma mistura preparada com 5 µl do extrato protéico, 5 µl de HCl (0,1 N) e 3,0 ml do corante foi homogeneizada em um tubo de vidro, transferida para cubetas e colocada no espectrofotômetro para efetuar a leitura da absorbância no comprimento de 595 nm. O valor acusado foi interpolado em uma curva de calibração, construída com a mesma metodologia, utilizando-se a proteína BSA (albumina de boi) como padrão.

4.7.2 Análise do perfil de proteínas em minigéis

Após a extração e quantificação das amostras, foi preparado um gel de poliacrilamida contendo SDS, de 10 cm x 8,5 cm com objetivo de confirmar o perfil de expressão das proteínas de *M. extorquens*, e a qualidade das proteínas extraídas. As proteínas foram desnaturadas em tampão 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) glicerol, 10% (p/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 1% (p/v) azul de bromofenol por 1 minuto a 95°C, e em seguida foram submetidas à eletroforese. A concentração do gel principal foi de 12% e do gel de empilhamento 4%. Os tampões inferior (25mM Tris, 192mM glicina) e superior (25mM Tris, 192mM glicina, 0,1% (p/v) SDS) foram preparados conforme descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi conduzida com corrente de 50V/placa por 30 minutos e 80V até o final da corrida. Após a eletroforese, os géis foram fixado por 1 hora em solução de fixação (etanol 40%, ácido acético 10%) e corados com solução de Comassie Blue (comassie blue G250 0,1%, sulfato de amônio 10%, ácido fosfórico 2%, metanol 200mL, qsp. 1000mL) por 12h.

4.7.3 Géis Bidimensionais

4.7.3.1 Focalização isoeletrica (IEF)

O extrato protéico de *Methylobacterium extorquens* foi separado por eletroforese bidimensional utilizando a faixa de pH de 4,0 a 7,0 (*Amersham Biosciences*). Para aplicação das amostras no gel, 750 µg de proteínas foram diluídos em 350 µl de tampão de focalização. As

proteínas da fita de acrilamida (*IPG strips Amersham Biosciences*) foram solubilizadas em 7 M uréia, 2 M tiouréia, 50 mM DTT (dithiotreitol), 0,4% (v/v) Triton X – 100, 2% (p/v) CHAPS, 0,5% (v/v) anfólitos pH 4-7. A focalização foi conduzida no IPGphor (*Amersham Biosciences*) à corrente constante de 50 μ A por fita. O programa de focalização incluiu os seguintes passos: 12 horas de reidratação a 50V, passo de 500V por 1h, gradiente de 1000V por 1h, gradiente de 8000V por 4h, passo de 8000V por 4h e um último passo de 8000V até atingir 80000Vh. As fitas focalizadas foram armazenadas a -80°C até serem equilibradas antes da eletroforese bidimensional.

4.7.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a focalização isoeletrica, as fitas foram equilibradas por 15 min em 3 ml da solução 1 (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M uréia; 30% glicerol; 2% SDS; 2% DTT) e por mais 15 minutos em 3 ml da solução 2 (50 mM Tris-HCl pH8,8; 6 M uréia; 30% glicerol; 2% SDS; 2% iodoacetamida), a fim de promover a redução e a alquilação das proteínas, respectivamente. Para proceder a eletroforese da segunda dimensão, as fitas foram transferidas para géis de acrilamida (12% p/v), colocadas em cubas SE-630 (*Amersham Biosciences*) contendo tampão de corrida pH 8,3 (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0,1% (p/v) SDS). As proteínas migraram sob campo eletroforético de 16 mA/gel por 30 minutos, seguido de 24mA/gel por aproximadamente 4,5 h a 4°C. Os géis foram deixados 1 hora em solução de fixação e corados com solução de Azul de Comassie por 12h.

4.7.3.3 Análise de imagens dos géis

Três géis bidimensionais pH 4-7 (*a, b, c*) de cada tratamento (T1: linhagem AR1.6/2; T2: linhagem AR1.6/2 CT; T3: linhagem P20G2 deficiente para produção de biofilme e T4: linhagem P4B12 deficiente para produção de AHLs) foram preparados conjuntamente, desde a extração das proteínas, seguida pela focalização isoeletrica e separação das moléculas em corrida eletroforética, a fim de se eliminar quaisquer tipos de variação no perfil de expressão dos *spots* que fosse proveniente destas fontes. Os géis foram digitalizados no Image Scanner UTA-1100 (*Amersham Biosciences*) e as imagens analisadas pelo programa Image Master 2D Elite Versão

3.01 (Amersham Biosciences). Os géis foram submetidos aos mesmos parâmetros de detecção, realizada automaticamente pelo programa, seguida da edição manual, por meio de remoção e adição de *spots*. Para cada *spot* foi determinado o volume relativo médio, ou seja, a média do volume do *spot* nos géis *a*, *b* e *c* foi dividida pelo somatório do volume de todos os *spots* do gel, com a finalidade de fazer inferências sobre o nível de expressão de cada proteína identificada. Por fim, foram adicionados os valores de marcador molecular e faixa de pH utilizada a fim de servirem como referência ao programa para a determinação automática dos pIs (ponto isoelétrico) e PMs (peso molecular) de todos os *spots*.

4.8 Avaliação da colonização de *Saccharum* sp. por *M. extorquens*

4.8.1 Inoculação de *M. extorquens* na planta hospedeira

Uma suspensão bacteriana (10^5 UFC/mL) em crescimento exponencial de cada tratamento foi inoculada na planta via sistema radicular. Após inoculação, as plantas foram mantidas em em BOD 28°C com fotoperíodo 16/8 horas (claro/escuro) e após 5 e 15 dias foram realizados reisolamentos para avaliar a colonização das plantas por *M. extorquens*.

4.8.2 Reisolamento de *M. extorquens*

A comunidade bacteriana endofítica da raiz, colmo e rizoplane foi isolada segundo Araújo et al. (2002) e Heuer et al. (2002), em meio CHOI 3 suplementado com benomyl (50µg/mL) para inibir o crescimento de fungos. Ao meio de cultivo foi adicionado canamicina para isolamento das linhagens P20G2 e P4B12 e tetraciclina para isolamento da linhagem ARGFP. Para reisolamento da comunidade do rizoplane, o material vegetal foi transferido para falcon de 50mL contendo 2mL de tampão PBS e deixado agitando (100rpm) a 28°C por 1h. Após esse período, diluições apropriadas foram semeadas sobre meio CHOI 3 e incubadas a 28°C por 4-14 dias. Para reisolamento da comunidade de raízes e colmos, as plantas passaram por processo de desinfecção superficial (lavagem por 30 segundos em etanol 70%, 1 minuto em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% de cloro ativo (v/v), 30 segundos em etanol 70%, seguido de 1 lavagem de 1 minuto em água destilada esterilizada), em seguida os tecidos vegetais foram cortados de forma asséptica em

pequenos fragmentos e macerados em 1 ml de tampão PBS. Foram utilizadas 3 plantas para cada tratamento. Diluições apropriadas da suspensão foram semeadas (100µL) sobre meio CHOI 3, incubadas a 28°C e avaliadas após 4-14 dias. Para confirmar o sucesso do processo de desinfecção, alíquotas da água destilada da última lavagem foram semeadas sobre meio CHOI3 suplementado com Benomyl e incubadas a 28°C por até 14 dias.

4.8.3 Ensaio de competição dos isolados de *M. extorquens*

Para a realização do ensaio de competição entre as diferentes linhagens, uma suspensão da cultura bacteriana em crescimento exponencial (10^5 UFC/mL) foi inoculada via raiz, juntamente com a linhagem ARGFP, nas mesmas condições de crescimento. As plantas foram mantidas em condições axênicas, em BOD 28°C com fotoperíodo 16/8 horas (claro/escuro) por 5 dias quando a colonização na planta hospedeira foi avaliada por reisolamento.

4.8.4 Monitoramento da colonização de *M. extorquens* por microscopia

Plantas de cada tratamento (item 4.8.1) foram utilizadas para análise da colonização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no NAP/MEA (ESALQ/USP). Para isso, as plantas foram retiradas dos frascos e raízes e colmos foram cortados em pequenos fragmentos de aproximadamente 2x2cm com auxílio de pinça e estilete esterilizados. Os fragmentos foram fixados usando a solução Karnovsky (formaldeído 2,5%; glutaraldeído 2,5%; tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,2; cloreto de cálcio 1mM) e armazenados em geladeira até o preparo das amostras. Em seguida, as amostras foram lavadas por três vezes em tampão cacodilato 0,1 M (20 minutos cada lavagem) e desidratadas por meio de uma série crescente de etanol (35, 50, 60, 75, 85, 95%), por 20 a 30 min. por troca e 3 repetições de etanol 100%. As amostras foram secas ao ponto crítico (CPD 030, Balzers), montadas sobre os stubbs e cobertas com ouro no metalizador (MED 010, Balzers) para serem observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (ZEIS, NAP/MEPA. ESALQ/USP).

4.8.5 Análise de dados

A análise dos dados de reisolamento e de volume dos *spots* detectados pelo programa foram conduzidos usando o software SAS (*Copyright*® 1989-1996 do SAS Institute) com a análise das variâncias ($p < 0,05$). O número de colônias encontradas por tratamento foi convertido a $\log_{10} (\text{UFC} + 2)$ / grama de tecido antes das análises de variância. O Teste de Tukey foi usado para comparação das médias, e para detecção dos *spots* diferencialmente expressos foi utilizado o teste T *student*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das linhagens e determinação do tempo de choque térmico

As linhagens utilizadas nos experimentos foram comparadas por meio da técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), com 3 *primers* aleatórios, os quais possibilitaram a observação de bandas monomórficas e polimórficas. Primeiramente diferentes concentrações de DNA foram testadas para a otimizar a amplificação dos *primers* visto que nesta técnica a concentração de DNA é de extrema importância, podendo haver segundo Williams et al. (1993), a perda de bandas em baixa concentração ou formação de borrão no gel, em altas concentrações de DNA. O padrão de bandas obtido pode ser observado na Figura 1.

O coeficiente de similaridade encontrado entre as linhagens foi de 72% . Isso permite concluir que todos os mutantes e transformados foram derivados da linhagem parental AR1.6/2 já que esta diferença observada pode ser devido as mutações. Segundo Quiberoni et al. (1998) pode ser observado até 25% de dissimilaridade entre a linhagem selvagem e mutantes fago resistentes de *Lactobacillus helveticus*. Similaridade de 65% já foram considerados suficientes para a confirmação da identidade entre linhagens selvagem e mutantes do fungo *Colletotrichum sublineolum* (FÁVARO et al., 2006).

Figura 1 - Perfil eletroforético dos isolados obtido com os primers (1) OPC-02; (2) OPW-06; (3) OPX-14. A- AR1.6/2; B-AR-GFP; C-P4B12; D-P20G2. M representa o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 1Kb (Invitrogen)

A pequena variabilidade encontrada entre os perfis de RAPD podem ser devido à heterogeneidade celular inerente de *M. extorquens* (STROVAS et al., 2007). Tendo em vista que as linhagens P20G2 e P4B12 foram obtidas por meio da inserção aleatória de mini transposons Tn5 (GAI, 2006), esta mutação pode gerar uma variação no perfil de RAPD. A similaridade entre as diferentes linhagens foi também avaliada por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, o qual mostrou que a linhagem AR1.6/2 apresenta 99,1 e 99,84% de similaridade com as linhagens P4B12 e P20G2, respectivamente.

Para a determinação do tempo e temperatura mais adequados para serem utilizados nos experimentos de choque térmico, análises preliminares foram realizadas tendo como critério a viabilidade da cultura bacteriana após diferentes tempos e temperaturas testados. Dessa forma, com base nos resultados (Tabela 2) foi determinado que 40°C por 30 minutos é o tempo ideal para avaliação do efeito do estresse térmico sobre o padrão de proteínas e colonização de cana-de-açúcar por *M. extorquens*.

Tabela 2: Número de colônias contadas em placa após choque térmico aplicado em diferentes temperaturas e por diferentes tempos. I indica incontável. Os experimentos foram repetidos 3 vezes em triplicata. Os dados são médias de 3 repetições

		(continua)			
Tempo\	Diluições	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
28°C	30 min	I	I	I	I
	60 min	I	I	I	I
33°C	30 min	I	I	I	200
	60 min	I	I	I	120
37°C	30 min	I	I	150	97
	60 min	I	I	116	59

Tabela 2: Número de colônias contadas em placa após choque térmico aplicado em diferentes temperaturas e por diferentes tempos. **I** indica incontável. Os experimentos foram repetidos 3 vezes em triplicata. Os dados são médias de 3 repetições

		(Conclusão)			
Tempo\Diluições		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
40°C	30 min	I	I	84	10
	60 min	I	216	40	4
.....					
45°C	30 min	100	30	0	0
	60 min	67	23	0	0

5.2 Estudo da colonização de cana-de-açúcar por *Methylobacterium extorquens*

A rizosfera é o ambiente do solo que está diretamente adjacente e sob a influência das raízes da planta, sendo possível dividi-la em partes, como por exemplo, a endorizosfera (tecidos da raiz incluindo endoderme e camadas corticais), o rizoplane (superfície das raízes como a epiderme e camada mucilaginosa de polissacarídeos) e a ectorizosfera (solo imediatamente adjacente a raiz) (MORGAN et al., 2005). Na rizosfera o crescimento dos microrganismos é estimulado pelos exsudatos das raízes, os quais contêm nutrientes, metabólitos secundários e moléculas sinalizadoras. No presente trabalho, os experimentos foram realizados *in vitro*, e para fins de reisolamento, toda a região externa às raízes, contendo os microrganismos agregados, foi chamada rizoplane.

A ligação da bactéria à superfície da planta ocorre em dois passos. O primeiro, de forma mais fraca e reversível e pode envolver uma variedade de polissacarídeos bacterianos, como lectinas e o segundo, requer a síntese de celulose bacteriana, e forma uma ligação forte e irreversível e leva à formação de agregados na superfície (MATHYSSE; KIJNE, 1998). Todas as linhagens utilizadas colonizaram a superfície das raízes (Figura 2), e a para uma colonização eficiente do interior da planta, a habilidade para colonizar a rizosfera é quase que um pré requisito (DANHORN; FUQUA, 2007). Após 5 dias, foi observado que a linhagem P4B12 foi mais eficiente na colonização do rizoplane, apresentando uma maior densidade bacteriana

(Figura 2) que se manteve após 15 dias. As linhagens AR1.6/2CT e ARGFP não diferiram de AR1.6/2 após 5 dias, mas apresentaram, após 15 dias, uma maior densidade bacteriana (Figura 2). A linhagem P20G2 (mutante defeitivo para formação de biofilme) apresentou o mesmo perfil de colonização que a linhagem controle AR1.6/2, sugerindo que neste tempo de amostragem, esta deficiência não mudou o padrão de interação com a planta hospedeira.

A presença de flagelos, síntese de lipopolissacarídeos, taxa de crescimento e a habilidade de crescer com os exsudatos das raízes são características importantes para que a bactéria possa colonizar as raízes da planta hospedeira (LUGTENBERG; DEKKERS, 1999). No presente trabalho foi observado que a densidade de *M. extorquens* no interior (endófitos) das raízes não foi alterada pela época de amostragem para todos os tratamentos, exceto P20G2 (Figura 3). Entretanto, foi observado que a densidade bacteriana da linhagem ARGFP foi significativamente diferente ($p < 0,05$) em todos os tempos (5 e 15 dias) de amostragem. A densidade bacteriana do mutante P20G2 foi significativamente diferente ($p < 0,05$) apenas aos 5 dias, nas raízes e colmo (Figura 4), indicando que a falta de produção de biofilme, embora não afete a densidade no rizoplane (Figura 2), pode dificultar a colonização endofítica. Após 15 dias, a densidade bacteriana aumentou em ambos os tecidos da planta, porém foi maior no colmo, nicho preferencial de *Methylobacterium* spp. (ARAÚJO et al., 2002; ANDREOTE et al., 2006). Esses resultados sugerem que essa mutação provavelmente afetou estágios importantes da formação de biofilme, como por exemplo a motilidade, dificultando a colonização da planta hospedeira. Neste contexto, Merritt et al. (2007) utilizaram uma linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* deficiente para motilidade e observaram que embora estas bactérias apresentem o flagelo, elas não formam biofilme e nem tampouco colonizam o hospedeiro. A importância da motilidade é evidenciada nos estudos de Pratt & Kolter (1998), onde os autores verificaram que mutantes de *E. coli* que possuem flagelo, mas que não realizam o movimento de rotação, são deficientes na formação de biofilme. Em *Pseudomonas* spp. mutações em genes responsáveis pela síntese de flagelo e motilidade alteram significativamente a formação e arquitetura do biofilme (KLAUSEN et al., 2003; O'TOOLE; KOLTER, 1998).

Vários estudos relacionam a formação de biofilme com a interação bactéria-hospedeiro. Estudos com *Campylobacter jejuni* (AKASURA et al., 2007) mostraram que linhagens mutantes para uma proteína de adesão celular apresentaram níveis reduzidos de colonização intestinal. Barak et al. (2007) demonstraram que mutações nos genes responsáveis pela síntese de celulose e

antígeno-O, importantes na formação de biofilme, reduzem a habilidade de *Salmonella enterica* de aderir e colonizar alfalfa.

As linhagens P4B12 (defectiva para produção de AHLs) e AR1.6/2CT não apresentaram diferença significativa no padrão de colonização de raízes e colmos em relação ao controle (Linhagem AR1.6/2), mostrando que as alterações sofridas não resultam em mudanças na densidade desta bactéria no interior das raízes de cana-de-açúcar.

A análise da densidade de *M. extorquens* no interior do colmo mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as épocas de amostragem (Figura 4). Com exceção às linhagens AR1.6/2 (controle), ARGFP e P4B12, foi observada diferença entre as duas épocas de amostragem, sendo que para AR1.6/2CT a densidade bacteriana foi 5 > 15 dias, enquanto que para o mutante P20G2, a densidade após 5 dias foi significativamente menor que após 15 dias (Figura 4), mostrando, neste caso, que colonização do colmo foi contínua, fato este semelhante à colonização endofítica das raízes. Após 5 dias de inóculo a densidade bacteriana da linhagem AR1.6/2CT não apresentou diferença significativa quando comparada à AR1.6/2 (controle), assim como P4B12. No entanto, AR1.6/2CT apresentou uma diminuição após 15 dias. A linhagem P20G2 porém, mutante defeitivo para produção de biofilme, apresentou uma maior densidade populacional após 15 dias, mostrando que o padrão de colonização nesse tecido foi diferente.

Figura 2- Densidade bacteriana reisolada do rizoplane de cana-de-açúcar após 5 e 15 dias de inóculo. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$

Figura 3- Densidade de *M. extorquens* reisolada endofiticamente de raízes de cana-de-açúcar após 5 e 15 dias de inóculo. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$

Figura 4 - Densidade de *M. extorquens* reisolada endofiticamente de colmos de cana-de-açúcar após 5 e 15 dias de inóculo. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$.

O mutante P4B12 apresenta deficiência na produção de AHLs (acil-homoserina-lactonas), moléculas de sinalização que permitem às bactérias monitorar sua própria densidade bacteriana, modulando a expressão gênica. Esse sistema, mediado por AHL parece controlar genes essenciais

para colonização, adesão, e formação de biofilmes em *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia* e *Serratia liquefaciens* (LABBATE et al., 2001).

Este mecanismo de comunicação celular (*quorum sensing*) é um processo relativamente conservado, visto que diferentes espécies de bactérias empregam esse sistema como um regulador global de operons, codificantes para diferentes funções (FUQUA et al., 2001). Sendo assim, mutações nesse sistema resultará em efeitos pleiotrópicos com consequências complexas para expressão de diversos genes (KJELLEBERG; MOLIN, 2002)

A semelhança entre o padrão de colonização de linhagens mutantes para *quorum sensing* e linhagens selvagens, como a observada no presente trabalho, já foi descrita por outros autores. Resultados semelhantes foram obtidos com *Klebsiella pneumoniae*, onde os autores avaliaram a relação entre produção de moléculas de *quorum sensing* e formação de biofilme, e observaram que não houve diferença nos níveis de colonização entre o isolado selvagem e o mutante para essas moléculas (BALESTRINO et al., 2005). Embora não tenha sido observada redução na colonização do rizoplano, uma das razões para a semelhança com a linhagem AR1.6/2 pode ser a não formação de agregados pelo mutante P4B12 provavelmente devido à fraca adesão à superfície da planta, já que genes que codificam proteínas relacionadas à adesão podem ser regulados por *quorum sensing*. De forma semelhante, mutantes para *quorum sensing* do patógeno *Pantoea stewartii* apresentaram um comportamento aberrante, se dispersando e migrando do biofilme podendo se espalhar mais facilmente pela planta (KOUTSOUDIS et al., 2006).

A influência dessas moléculas na maturação do biofilme também foi observada em *Serratia liquefaciens* (LABBATE et al., 2004), onde mutações nesse sistema resultaram em biofilmes anormais, menos densos e ausentes de agregados e filamentos. A formação de biofilme por linhagens de *P. aeruginosa* selvagem e mutante para produção de moléculas de AHL também foi avaliada por Davies et al. (1998), em cujo trabalho os autores observaram que ambos os isolados aderiram e proliferaram sobre uma superfície inerte, porém o biofilme mutante formado era em média 20% menos denso comparado ao selvagem, e não houve formação de microcolônias.

A não formação de microcolônias pôde ser evidenciada por meio da microscopia de varredura das linhagens, onde os mutantes P20G2 e P4B12 apresentaram um comportamento mais individualizado (Figura 8). As linhagens AR1.6/2 e AR1.6/2CT porém, apresentaram a formação de microcolônias e um padrão de colonização geral caracteristicamente não uniforme,

com algumas áreas bastante colonizadas, como base de pêlos, e outras relativamente livres de bactérias (Figura 9). Esse padrão já foi anteriormente discutido (ROVIRA; CAMPBELL, 1974) após análise da colonização de raízes de trigo por microrganismos por meio de microscopia eletrônica de varredura, onde os autores observaram que as bactérias eram mais comuns na região dos pêlos de raiz. Não foi possível observar, contudo, a colonização endofítica da raiz pelo mutante P20G2 e tão pouco a colonização por P4B12 de nenhum dos tecidos, o que pode ser explicado pela baixa densidade populacional das linhagens nesses tecidos, em torno de 10^2 para o mutante P4B12 e 10^1 para P20G2, dificultando bastante a observação dessas linhagens colonizando os tecidos internos da planta.

Em *Methylobacterium* spp. estudos mostram que a produção de biofilme pode ser dependente da produção de AHLs (DAVIES et al., 1998; NIETO-PEÑALVER et al., 2006), porém em alguns casos estas moléculas parecem realmente não estar envolvidas nesse processo. No presente trabalho foi visto que a ausência dessas moléculas não afetou a colonização da planta hospedeira. Provavelmente os efeitos da deficiência de AHL levaram a formação de um biofilme não diferenciado, onde as células se espalharam facilmente pela planta.

Vários estudos têm sido direcionados ao melhor entendimento dessa interação bactéria-planta. Neste contexto, Okinaka et al. (2003) avaliaram a interação entre a bactéria *Erwinia chrysanthemi* 3937 e folhas de *Saintpaulia ionantha* var. *Katja* (violeta africana) pela técnica de microarranjo, e verificaram que a maioria dos genes hiporegulados são homólogos de genes de manutenção da célula como os que codificam funções metabólicas, componentes da fosforilação oxidativa e processos de tradução e transcrição. Por outro lado, uma grande quantidade de genes hiper-regulados estão envolvidos provavelmente na adaptação do microrganismo ao novo ambiente. Ou seja, quaisquer que sejam as alterações nesses genes, diferenças na capacidade de colonização da planta hospedeira serão percebidas.

A bactéria *M. extorquens* é conhecida por colonizar plantas de forma endofítica e epifítica. Como as partes aéreas das plantas estão constantemente expostas a alterações rápidas e bruscas de temperatura, umidade, radiação, as bactérias capazes de colonizar a filosfera, por exemplo, devem ser capazes de responder a estas alterações rapidamente. Essa capacidade pode em parte explicar os resultados obtidos para a linhagem AR1.6/2 submetida ao choque térmico (AR1.6/2CT). O estresse térmico a que a bactéria foi submetida não reduziu a colonização do rizoplane (Figura 2) ou das raízes (Figura 3), mas a colonização endofítica do colmo foi menor

após 15 dias, mostrando que a translocação da bactéria na planta pode ter sido alterada. Este resultado pode ser corroborado com estudos prévios com *E. coli*, onde foi observado que o aumento de proteínas de choque térmico (HSPs) estava associado ao aumento na expressão de citocinas e moléculas de adesão (GALDIERO et al., 1997; MARCATILI et al., 1997; RETZLAFF et al., 1994). Dessa forma, após o choque térmico, *M. extorquens* pode ter a sua capacidade de adesão aumentada, mas devido a isso, a sua motilidade na planta pode ter sido diminuída, interferindo na capacidade de se translocar no interior da planta hospedeira, em especial o colmo.

5.2.1 ESTUDO DE COMPETIÇÃO ENTRE LINHAGENS DE *M. extorquens*

Para que um isolado colonize um hospedeiro mais que outro é necessário que esse possua um conjunto de características que aumente sua capacidade de adaptação a um determinado nicho; ou que o outro isolado não expresse certas características necessárias a uma efetiva colonização. A capacidade de competição das linhagens de *M. extorquens* foi avaliada, onde as linhagens AR1.6/2, AR1.6/2 CT, P4B12 e P20G2 foram coinoculados na planta com ARGFP e reisoladas após 5 dias de inóculo.

Nenhuma das linhagens utilizadas demonstrou ser afetada pela presença de ARGFP, com exceção de P4B12. Esta linhagem apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na capacidade de colonizar o rizoplane devido a presença da linhagem ARGFP (Figuras 5), onde se mostrou ser menos competitiva, indicando que a produção de AHLs pode ser um importante mecanismo de competição no interior da planta. As características inerentes ao rizoplane já o tornam um ambiente extremamente competitivo. Estudos recentes mostraram que mutações nesse sistema de comunicação afetam o *fitness* bacteriano (LEE et al., 2006). Os autores realizaram estudos de competição entre linhagens selvagem e mutante para produção de moléculas de *quorum sensing* de *Helicobacter pylori* e observaram que a linhagem mutante apresentou menor mobilidade e habilidade em competir com o selvagem durante o processo de infecção de ratos, possivelmente por distúrbios metabólicos causados pela mutação.

Na raiz, a presença da ARGFP não afetou a colonização da planta hospedeira por nenhum dos isolados (Figura 6), no colmo porém, interessantemente, P20G2 mostrou ser capaz de colonizar mais os tecidos quando na presença de ARGFP (Figura 7). Possivelmente esse mutante

utilizou moléculas de sinalização originadas de ARGFP, e/ou outras, importantes para a colonização endofítica. Neste aspecto, pode ser sugerido que a deficiência de formação do biofilme poderia ser solucionada com auxílio da linhagem ARGFP. Entretanto, estudos de microscopia de fluorescência deveriam ser feitas para distinguir as duas bactérias no interior da planta, permitindo dessa forma entender o comportamento destas bactérias em um possível biofilme misto.

O isolado ARGFP foi reisolado, em quantidade bem menores, apenas do rizoplane, porém não foi observado em placas de reisolamento de nenhum dos tratamentos ou tecidos. Os estudos vistos na literatura tomam como premissa que a incorporação de GFP tem pouco ou mesmo nenhum efeito na fisiologia e metabolismo celular, porém Allison & Sattenstall (2007) encontraram resultados diferentes. Os autores compararam linhagens selvagens com linhagens transformadas de *E. coli* com o gene da GFP e analisaram quanto a taxa de crescimento e susceptibilidade a antibióticos. O crescimento mostrou não ser afetado pela transformação, porém os transformados mostraram um aumento na susceptibilidade aos antibióticos de diferentes classes testados, o que indica que a incorporação com GFP altera características fisiológicas, tais como estrutura e permeabilidade da membrana celular. Os resultados aqui mostrados corroboram com esse trabalho, onde ARGFP se mostrou menos competitiva que qualquer outra linhagem. Provavelmente a incorporação possui efeitos mais complexos e ainda não estudados na colonização endofítica que dificultaram até mesmo a agregação à superfície das raízes.

Figura 5- Densidade bacteriana reisolada do rizoplane após 5 dias de inóculo. **Trat** corresponde apenas ao isolado inoculado e **Trat + GFP** corresponde ao isolado inoculado juntamente com AR-GFP. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$

Figura 6- Densidade bacteriana reisolada endofiticamente das raízes após 5 dias de inóculo. **Trat** corresponde apenas ao isolado inoculado e **Trat + GFP** corresponde ao isolado inoculado juntamente com AR-GFP. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$

Figura 7- Densidade bacteriana reisolada endofiticamente de colmos após 5 dias de inóculo. **Trat** corresponde apenas ao isolado inoculado e **Trat + GFP** corresponde ao isolado inoculado juntamente com AR-GFP. Os dados são médias de três repetições sendo avaliado por Tuckey (5%) pelo programa SAS. Os dados de densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)/\text{grama de tecido}$

Figura 8- Colonização da superfície da raiz de cana-de-açúcar cultivada *in vitro* por AR 1.6/2 selvagem (A), AR 1.6/2 submetida a choque térmico (B), P4B12 (C) e P20G2 (D). Superfícies não colonizadas (E) e (F). A seta em (B) indica formação de biofilme

Figura 9- Colonização do interior de raízes e colmos. AR 1.6/2 selvagem no interior da raiz (A) e colmo (B). AR 1.6/2 submetida a choque térmico no interior da raiz (C), colmo (D) e P20G2 interior de colmos (E)

5.3 Estudo proteômico de *Methylobacterium extorquens*

5.3.1 Extração e quantificação das proteínas

Os principais passos do trabalho com eletroforese 2D incluem: preparação e solubilização da amostra, quantificação das proteínas, separação das proteínas por 2-D PAGE, análise computacional dos padrões de 2-D, identificação e caracterização das proteínas e construção dos bancos de dados. No estudo proteômico de microrganismos, os passos mais críticos são a extração e a preparação das amostras, onde a condição de cultivo como temperatura, tempo de incubação, composição do meio e método de extração podem afetar a amostra e interferir de forma negativa. A reprodutibilidade dos resultados depende desde a padronização dos métodos de cultivo, até a extração, a corrida eletroforética e coloração dos géis. É também de grande importância o conhecimento das características da bactéria, assim como sua curva de crescimento, pois as células, para extração, devem ser coletadas na fase exponencial de crescimento.

O método de escolha para extração das proteínas de *M. extorquens*, levou em consideração o tipo de material, a simplicidade do método aumentando assim a reprodutibilidade e o rendimento obtido em comparação com outros métodos avaliados. Como as células bacterianas podem excretar proteases e outras enzimas extracelulares no meio de cultura e que podem interferir na extração, as células foram primeiramente lavadas em um tampão fosfato salina (PBS). A extração com esferas de vidro em *Bead Beater* (CORDWELL et al., 2000; GÖRG et al., 2000) mostrou ser um método bastante adequado, obtendo frações protéicas não degradadas em concentrações que alcançaram 30µg/mL a partir de pouca quantidade de material bacteriano. Posteriormente foi observado que o tratamento das amostras com acetato de amônio 0,1M em metanol aumentou bastante a resolução dos géis bidimensionais. Esse tratamento passou a ser utilizado então após todas as extrações. Um mini gel (SDS PAGE) foi realizado após cada processo de extração para verificar a sua qualidade.

A figura 10 representa o perfil de proteínas de diferentes isolados de *M. extorquens* separadas em eletroforese de poliacrilamida 12%. Como o isolado ARGFP foi utilizado também nos reisolamentos, dele foram extraídas proteínas e feito um minigel para se ter uma caracterização geral do padrão das proteínas, porém não foi analisado através de géis 2D.

Foi observado que a maior parte das proteínas extraídas estão acumuladas na faixa de 20 KDa a 120KDa. Três proteínas, de pesos 60, 40 e 13KDa foram detectados em todos os tratamentos. Uma proteína de 28KDa foi detectada mais expressa apenas no isolado ARGFP, e uma proteína de 20KDa se mostrou mais expressa apenas no isolado submetido a choque térmico. Exceto algumas variações, os isolados apresentaram perfis de distribuição das bandas bastante semelhantes, dificultando a comparação entre eles, e justificando a utilização de géis bidimensionais para o estudo da expressão diferencial de proteínas dos diferentes isolados e o maior entendimento do papel destas na interação *Methylobacterium*-cana-de-açúcar.

Figura 10- Perfil de proteínas dos isolados de *M. extorquens*, separadas em gel de poliacrilamida. Quantidades semelhantes de proteínas foram utilizadas (10µg). M: marcador de massa molecular; 1: AR 1.6/2 selvagem; 2: AR 1.6/2 submetida à 40°C por 30 min; 3: ARGFP; 4: P4B12; 5: P20G2

5.3.2 Separação das proteínas em géis bidimensionais

A faixa de pH utilizada para a separação das proteínas foi de 4-7, escolhida com base em outros estudos de expressão de proteínas com *M. extorquens* (LAUKEL et al., 2004; GOURION et al., 2006). A estreita faixa de pH utilizada também reduziu problemas de co-migração de proteínas para um mesmo ponto, aumentando a resolução dos *spots*. Westbrook et al. (2001) demonstraram que o uso de uma faixa mais estreita de pH não apenas aumentou a resolução e o número de *spots*, como também permitiu a identificação por espectrometria de massa de proteínas adicionais ou isoformas de aparentemente um único *spot*.

Os géis bidimensionais foram realizados em triplicata e as fitas carregadas com 750µg de proteínas para focalização isoeletrica sob condições indicadas pelo fornecedor (GE). O protocolo para coloração dos géis com Solução de Comassie coloidal G-250 se mostrou adequado para identificação de grande número de *spots*. Embora pudessem ser utilizados corantes mais sensíveis, como coloração com prata, por exemplo, essa dificultaria a posterior identificação e sequenciamento das proteínas devido a baixa concentração.

5.3.3 Análise de imagem dos géis

Após a corrida eletroforética, os géis foram analisados no programa Image Master 2D Elite Versão 3.01 (Amersham Pharmacia Biotech), onde os *spots* foram detectados automaticamente e corrigidos manualmente, pois o programa entende como *spot* quaisquer manchas, bolhas d'água e rastros de proteínas não focalizadas. Essa edição manual consiste em apagar e desenhar *spots* com base na imagem impressa dos géis, o que torna a análise bastante subjetiva.

Considerando a triplicata a, b e c de cada tratamento, os géis de AR 1.6/2 selvagem forneceram 615, 603 e 613 *spots* respectivamente, e AR 1.6/2 CT 618, 669 e 673 respectivamente. Todos os géis apresentaram *spots* muito bem definidos, porém em maior ou menor número, mas como não existem estudos que abordem a questão da reprodutibilidade entre géis, os três foram mantidos na análise.

A análise de imagem dos géis detectou a presença de 58 proteínas presentes exclusivamente na linhagem AR1.6/2CT (Figura 11B), e 196 *spots* diferencialmente expressos.

Figura 11- Padrão de distribuição de proteínas de pH 4-7 de *Methylobacterium*. **(A)** AR1.6/2 e **(B)** AR1.6/2 CT. Os números indicam os *spots* diferencialmente expressos detectados pelo programa

A chamada resposta de choque térmico (Heat Shock Response) é induzida por uma série de estresses ambientais e fatores físicoquímicos, choque térmico, produtos do metabolismo, e permite às células se adaptarem a estas condições. Em *E. coli*, a resposta a alteração de temperatura de 30°C para 42°C leva a uma rápida indução de mais de 20 proteínas de choque térmico (HSPs) (BUKAU, 1993; GEORGOPOULOS et al., 1994). Em um estudo com *Bradyrhizobium japonicum* (MÜNCHEBACH et al., 1999), um grupo de 19 proteínas de choque térmico foram induzidas quando do aumento da temperatura de 28°C para 43°C. No presente trabalho, o aumento da temperatura de 28°C para 40°C resultou na indução/repressão de 196 proteínas. A resposta a fatores de estresse como, no caso, altas temperaturas, leva também à supressão da maioria das proteínas de manutenção da célula, prevenindo a desnaturação. Essa pode ser uma possível explicação para o fato da maioria das proteínas detectadas como diferencialmente expressas estarem sendo reprimidas pelo choque térmico. A Figura 12 mostra o número de vezes que alguns *spots* se mostraram mais ou menos expressos em AR1.6/2CT.

As mutações em P4B12 e P20G2 resultaram em redução no número de *spots* (proteínas). Os géis do mutante para produção de AHL, P4B12 (Figura 13), apresentaram 373, 350 e 331 *spots* e do mutante para formação de biofilme, P20G2 (Figura 14), 400, 446 e 363 *spots*, 42,6% e 33,9% menos *spots*, que na linhagem AR1.6/2, respectivamente.

Figura 12- Alguns dos *spots* detectados pelo programa Image Master e o número de vezes em que foram encontrados mais ou menos expressos em AR 1.6/2 CT comparados com AR 1.6/2 selvagem. Os dados foram analisados pelo programa SAS e são médias de 3 repetições

A análise do padrão de proteínas da linhagem P4B12 (Figura 13) permitiu a detecção de 51 *spots* diferencialmente expressos, sendo 21 reprimidos e 30 induzidos. Ao contrário, a análise da linhagem P20G2 (Figura 14) detectou presença de 65 *spots* diferencialmente expressos, sendo 45 reprimidos e 20 induzidos.

Muitas bactérias coordenam diversos processos fisiológicos por meio do sistema de comunicação, incluindo diferenciação de biofilme, conjugação, motilidade, bioluminescência, expressão de fatores de virulência, produção de antibióticos, esporulação entre outras (CAMILLI BASSLER, 2006). Considerando o número de genes e rotas envolvidas nesse sistema fica claro, pela análise dos géis bidimensionais e o menor número de *spots* detectados, a complexidade dos efeitos causados por mutações, e que já foi previamente discutido por Kjelleberg & Molin (2002), a respeito dos efeitos pleiotrópicos potencialmente complexos que podem ocorrer devido a mutações nesse sistema. Além disso, as moléculas de comunicação celular exibem propriedades biológicas que vão muito além do papel de coordenar a expressão gênica (WILLIAMS, 2007).

Figura 13- Padrão de distribuição de proteínas de pH 4-7 de *M. extorquens* P4B12. Os números indicam alguns dos *spots* diferencialmente expressos detectados pelo programa

O estudo dos fatores e processos envolvidos na transição entre o comportamento planctônico e a formação de biofilmes é bastante complexo, uma vez que se trata de um processo dinâmico envolvendo a coordenação de mecanismos como adesão, agregação, e a expansão da comunidade no biofilme. Análises genéticas revelaram que a superfície de estruturas como flagelos, adesinas e fímbrias de *E. coli* são importantes para a formação de biofilme (SCHEMBRI et al., 2003). Um estudo foi realizado por Niba et al. (2007) visando identificar genes importantes na formação de biofilme por meio do uso de mutantes. Eles observaram que a maioria dos mutantes para biossíntese de flagelo e genes envolvidos na motilidade apresentaram defeitos severos no biofilme e perda de motilidade. Isolados com genes mutados para biossíntese de lipopolissacarídeos também apresentaram perda de motilidade e consequentemente defeitos na formação de biofilme.

Figura 14- Padrão de distribuição de proteínas de pH 4-7 de *M. extorquens* P20G2. Os números indicam alguns dos *spots* diferencialmente expressos detectados pelo programa

Esses resultados ilustram a complexidade dos processos envolvidos e a diferença observada nos proteomas dos dois mutantes, onde algumas proteínas são quase totalmente suprimidas (Figuras 15 e 16). A identificação das proteínas diferencialmente expressas nos diferentes tratamentos auxiliará para um maior entendimento das interações bactéria-planta e nos mecanismos envolvidos na formação de biofilme e comunicação celular em *M. extorquens*.

Figura 15- Alguns dos *spots* detectados pelo programa Image Master e o numero de vezes em que foram encontrados mais ou menos expressos em P20G2 comparados a AR1.6/2. Os dados foram analisados pelo programa SAS e são médias de 3 repetições

Figura 16- Alguns dos pontos detectados pelo programa Image Master e o numero de vezes em que foram encontrados mais ou menos expressos em AR 1.6/2 selvagem e P4B12. Os dados foram analisados pelo programa SAS e são médias de 3 repetições

6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ O estresse térmico altera o padrão de expressão de *M. extorquens*, o qual altera o padrão de interação com a planta hospedeira;
- ✓ A formação de biofilme por *Methylobacterium extorquens* é importante para a colonização da planta hospedeira;
- ✓ A síntese de AHLs (*quorum sensing*) por *M. extorquens* está relacionado tanto com a colonização da planta hospedeira, quanto com o fitness;
- ✓ A deficiência para formação de biofilme não afeta a competitividade de *M. extorquens* durante a interação com a planta hospedeira;
- ✓ A deficiência na produção de AHLs diminui a competitividade de *M. extorquens* no interior da planta.

A análise dos géis bidimensionais das linhagens mutantes indica que proteínas importantes na interação, formação de biofilme e moléculas de AHLs podem ter sido afetadas pela mutação. O estudo das proteínas diferencialmente expressas encontradas nos diferentes tratamentos, AR1.6/2CT, P4B12 e P20G2, auxiliará o maior entendimento dos fatores envolvidos na interação *Methylobacterium*-planta.

REFERÊNCIAS

- ABANDA-NKPWATT, D.; MÜSCH, M.; TSCHIRSCH, J.; BOETTNER, M.; SCHWAB, W. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, n.15, p.4025-4032, 2006.
- AKASURA, H.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Deletion of *peb4* gene impairs cell adhesion and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiology Letter**, Oxford, v.275, p.278-285, 2007.
- ALLISON, D.G.; SATTENSTALL, M.A. The influence of green fluorescent protein incorporation on bacterial physiology: a note of caution. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.103, p.318-324, 2007.
- ANDERSEN, N.G.; ANDERSEN, N.L. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 17, p. 443-453, 1996.
- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v.42, p.169-173, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.52, p.419-426, 2006.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed) **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007, chap.6, p.189-207.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.47, p.229-236, 2001.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W.; ELSAS, J. D.VAN; AZEVEDO J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.10, p.4906-4914, 2002.

ATLUNG, T.; H. INGMER. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.24, p.7-17, 1997.

BALESTRINO, D.; HAAGENSEN, J.A.J.; RICH, C.; FORESTIER, C. Characterization of Type 2 Quorum Sensing in *Klebsiella pneumoniae* and Relationship with Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.187, p. 2870-2880, 2005.

BARAK, J.D.; JAHN, C.E.; GIBSON, D.L.; CHARKOWSKI, A.O. The Role of Cellulose and O-Antigen Capsule in the Colonization of Plants by *Salmonella enterica*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.20, p. 1083-1091, 2007.

BÉLANGER, L.; FIGUEIRA, M.M.; BOURQUE, D.; MOREL, L.; BÉLAND, M.; LARAMÉ, L.; GROLEAU, D.; MIGUEZ, C.B. Production of heterologous protein by *Methylobacterium extorquens* in high cell density fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.231, p.197–204, 2004.

BENOV, L.; FRIDOVICH, I., Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.177, p.3344-3346, 1995.

BOLDT, T.S.; SORENSEN, J.; KARLSON, U.; MOLIN, S. ; RAMOS, C. Combined use of different GFP reporters for monitoring single-cell activities of a genetically modified PCB degrader in the rhizosphere of alfalfa. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.48, p.139-148, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p. 248-259, 1976.

BUKAU, B. Regulation of *E. coli* heat shock response. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.9, p.671-680, 1993.

CAMILI, A.; BASSLER, B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, Washington, v.311, p. 1113-1116, 2006.

CARROLL, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. VAN DEN. (Ed). **Microbiology of Phyllosphere**. London: Cambridge University Press, 1986, p.205-222.

CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y. C.; SHAW, P. D.; FARRAND, S. K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.11, p.1119-1129, 1998.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, v.263, p.802-805, 1994.

CHANPRAME, S.; TODD, J.J.; WIDHOLM, J.M. Prevention of pink-pigmented methylotrophic bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) contamination of plant tissues cultures. **Plant Cell Reports**, New York, v.16, p.222-225, 1996.

CHOI, Y.J.; MIGUEZ, C.B.; LEE, B.H. Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of a novel esterase gene, *estI* from *Lactobacillus casei* CL96 in methylotrophs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.3213-3221, 2004.

CODY, C. W.; PRASHER, D. C.; WESTLER, W. M.; PRENDERGAST, F. G.; WARD, W. W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. **Biochemistry**, Washington, v.32, p.1212-1218, 1993.

CORDWELL S.J.; NOUWENS A.S.; VERRILLS N.M.; BASSEAL D.J.; WALSH B.J. Subproteomics based upon protein cellular location and relative solubilities in conjunction with composite two-dimensional electrophoresis gels. **Electrophoresis**, Berlin, v.21, p.1094-1103, 2000.

COSTERTONI, J.W.; LEWANDOWISK, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPINSCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.49, p.711-745, 1995.

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

DAVIES, D.G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, P. E. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. **Science**, Washington, v.280, p.295-298, 1998.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DEANGELIS, K.M.; JI, P.S.; FIRESTONE, M.K.; LINDOW, S.E. Two novel bacterial biosensors for detection of nitrate availability in the rhizosphere **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.12, p.8537-8547, 2005.

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

ELLENBERG, J.; LIPPINCOTT, S. J.; PRESLEY, J. F. Dual-colour imaging with GFP variants. **Trends in Cell Biology**, London, v.9, p.52-56, 1999.

FÁVARO, L.L.C.; ARAÚJO, W.L.; SOUZA-PACCOLA, E.A.; AZEVEDO, J.L.; PACCOLA-MEIRELES, L.D. *Colletotrichum sublineolum* genetic instability assessed by mutants resistant to chlorate. **Mycological Research**, Oxford, doi:10.1016/j.mycres.2006.08.008, 2006.

FERREIRA FILHO, A. S.; ARAÚJO, W. L.; KULINSKY-SOBRAL, J. Bactéria endofítica *Methylobacterium* spp. e interação com a planta hospedeira. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2001, Piracicaba. **Resumos**. Piracicaba: ESALQ, USP, 2001.

FERREIRA FILHO, A.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ROSSETO, P.B.; LIMA, A.O.S.; QUECINE, M.C.; AZEVEDO, J.L.; In: 48 ° CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 2002, Águas de Lindóia. **Resumos**. Águas de Lindóia, 2002.

FIGUEIRA, M.M.; LARAMÉ, L.; MURREL, J.C.; GROLEAU, D.; MÍGUEZ, C.B. Production of green fluorescent protein by the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.193, p.195–200, 2000.

FITZGERALD, K.A.; LIDSTROM, M.E. Overexpression of a heterologous protein, haloalkane dehalogenase, in a poly-beta-hydroxybutyrate-deficient strain of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v.81 (3), p.263–268, 2003.

FUQUA, C.; PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.35, p.439-468, 2001.

GAI, C.S. **Comunidade bacteriana associada às cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae), insetos vetores de *Xylella fastidiosa***. 2006. 102p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

GAGE, D. J.; BOBO, T.; LONG, S. R. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfafa (*Medicago sativa*). **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.178, p.7159-7166, 1996.

GALDIERO, M., DELERO, G. C.; MARCATILI, A. Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins. **Infectious Immunology**, Washington, v.65, p.699–707, 1997.

GEORGOPOULOS, C.; LIBEREK, K.; ZYLICZ, M.; ANG, D. Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response. In: MORIMOTO, R.I.; TISSIÉRES, A.; GEORGOPOULOS, C. (Eds.). **The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, p. 209– 250.

GÖRG A.; OBERMAIER C.; BOGUTH G.; HARDER A.; SCHEIBE B.; WILDGRUBER R.; WEISS W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Berlin, v.21, p.1037–1053, 2000.

GOURION, B.; ROSSIGNOL, M.; VORHOLT, J.A. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n.35, p.13186-13191, 2006.

GUERREIRO, N.; REDMOND, J.W.; ROLFE, B.G.; DJORDJEVIC. New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.10, n.4, p.506-516, 1997.

GUTTENBERG, M.; HAMPP, R. Ectomycorrhizins – symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas? **Planta**, Tübingen, v.188, p.129-136, 1992.

GRAM, L.; CHRISTENSEN, A. B.; RAVN, L.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Production of acylated homoserine lactones by psychotrophic *Enterobacteriaceae* isolated from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.3458-3463, 1999.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 1, p. 39-63, 2002.

HAHLBROCK, K.; BEDNAREK, P.; CIOLKOWSKI, C.; HAMBERGER, B.; HEISE, A.; LIEDGENS, H.; LOGEMANN, E.; NÜRNBERGER, T.; SCHMELZER, E.; SOMSSICH, I.E.; TAN, J. Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v.100, p. 14569-14576, 2003.

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

HENGGE-ARONIS, R. Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter σ S-selective? **Current Opinion in Microbiology**, London, v.5, p.591-595, 2002.

- HENZEL, W.J.; BILLECI, T.M.; STULTS, J.T.; WONG, S.C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.90, p.5011-5015, 1993.
- HEUER, H.; KROPPESTEDT, R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.1325-1335, 2002.
- IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W.W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.2667-2677, 2004.
- JACQUES, M.A.; JOSI, K.; DARRASSE, A.; SAMSON, R. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.4, p.2008-2015, 2005.
- JENKINS, D. E.; SCHULTZ, J.E.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.170, p.3910-3914, 1988.
- JENKINS, D.E.; CHAISSON, S.A.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.172, p.2779-2781, 1990.
- JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BENA, G.; SY, A.; WILLENS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 2269-2273, 2004.
- JOURAND, P.; RENIER, A.; RAPIOR, S.; MIANA DE FARIA, S.; PRIN, Y.; GALIANA, A.; GIRAUD, E.; DREYFUS, B. Role of Methylo trophy During Symbiosis Between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, p. 1061-1068, 2005.
- KERIM, T.; IMIN, N.; WEINMAN, J.J.; ROLFE, B.G. Proteome analysis of male gametophyte development in rice anthers. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, n. 5, p. 738-751, 2003.
- KIM, S.T.; KIM, S.G.; HWANG, D.H.; KANG, S.Y.; KIM, H.J.; LEE, B.H.; LEE, J.J.; KANG, K.Y. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.3569-3578, 2004.

KJELLEBERG, S.; MOLIN, S. Is there a role for quorum-sensing signaling in bacterial biofilms? **Current Opinion in Microbiology**, London, v.5, p.254-258, 2002.

KLAUSEN, M.; HEYDORN, A.; RAGAS, P.; LAMBERTSEN, L.; AAES-JORGENSEN, A.; MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.48, p.1511–1524, 2003.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, Berlin, v. 26, p. 231-243, 1975.

KOLENBRANDER, P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.54, p.413-437, 2000.

KOUTSOUDIS, M.D.; TSALTAS, D.; MINOGUE, T.D.; VON BODMAN, S.B. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences fo the United States of America**, Washington, v.103, p.5983–88, 2006.

KREFT, J.U.; PICIOREANU, C.; WINPENNY, J.W.T.; VAN LOSSDRECHT, M.C.M. Individual-based modeling of biofims. **Microbiology**, New York, v.147, p.2897-2912, 2001.

KREFT, J.U. Biofilms promote altruism. **Microbiology**, Berks, v.150, p.2751-2760, 2004.

LABBATE, M.; RICE, S.A.; QUECK, J.; GIVSKOV, J.; KJELLEBERG, S. Attachment and formation of biofilm structures in *S. liquefaciens* MG1 is regulated by *N*-butanoyl-l-homoserine lactone. Abstract MO.042 of the **Ninth International Symposium on Microbial Ecology**, Amsterdam, August 26–31, 2001.

LABBATE, M.; QUECK, S.Y.; KOH, K.S.; RICE, S.A.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Quorum sensing-ontrolled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.186, p.692–698, 2004.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., AZEVEDO J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, casual agent of citrus-variegated clorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.39, p.55-59, 2004.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO J.L. Evaluation of endophytic colonization of *Citrus sinensis* and *Catharanthus roseus* seedlings by endophytic Bacteria. **Journal of Microbiology**, Seoul, v.45, n.1, p.11-14, 2007.

LAUKEL, M.; ROSSIGNOL, M.; BORDERIES, G.; VÖLKER U.; VORHOLT, J.A. Comparison of the proteome of *Methylobacterium extorquens* AM1 grown under methylotrophic and nonmethylotrophic conditions. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.1247–1264, 2004.

LEE, W.; OGURA, K.; LOH, J.T.; COVER, T.L.; BERG, E. Quantitative effect of *luxS* gene inactivation on the fitness of *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, p.6615-6622, 2006.

LIPKA, V.; PANSTRUGA, R.; Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.8, p.625-631, 2005.

LOH, J.; PIERSON, E.A.; PIERSON III, L.S.; STACEY, G.; CHATTERJEE, A. Quorum sensing in plant-associated bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.5, p.285-290, 2002.

LOPÉZ, M.J.; NICHOLS, N.N.; DIEN, D.S.; MORENO, J.; BOTHAST, R.J. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.64, p.125-131, 2004.

LUGTENBERG, B.J.J.; DEKKERS, L.C. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? **Environmental Microbiology**, Oxford, v.1, p.9–13, 1999.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H.S.; SUANDARAM, S.P. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.41, p.350-358, 2005.

MADHAIYAN, M.; SURESH REDDY, B.V.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T. Plant Growth–Promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v.53, p.270-276, 2006.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; TONGMIN S.A. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Chemosphere**, Oxford, v.69, p.220–228, 2007.

MAHAFFEE, W.F.; BAUSKE, E. M.; VAN VUURDE, J.W.; VAN DER WOLF, J.M.; VAN DEN BRINK, M.; KLOPPER, J.W. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining, and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of *rhizobacterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.1617-1622, 1997.

- MANN, M.; HOJRUP, P.; ROEPSTORFF, P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. **Biology of Mass Spectrometry**, W Sussex, v.22, p.338-345, 1993.
- MARCATILI, A.; CIPOLLARO DEL'ERO, G.; GALDIERO, M.; FOLGORE, A.; PETRILLO, G. TNF- α , IL-1 α , IL-6 and ICAM-1 expression in human keratinocytes stimulated in vitro with *Escherichia coli* heat shock proteins. **Microbiology**, Berks, v.143, p.45-53, 1997.
- MARCO, P.D.; PACHECO, C.C.; FIGUEIREDO, A.R.; MORADAS-FERREIRA, P. Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.234, p.75-80, 2004.
- MARQUES, L.L.R.; CERI, H.; MANFIO, G.P.; REID, D.M.; OLSON, M.E. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, p.633-638, 2002.
- MATHYSSE, A.G.; KIJNE, J.W. Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J. (Ed.). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998, p.235-249.
- MENENDEZ, C.; HERNANDEZ, L.; SELMAN, G.; MENDOZA, M.F.; HEVIA, P.; SOTOLONGO, M.; ARRIETA, J.G. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exo-levanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. **Current Microbiology**, New York, v.45, p.5-12, 2002.
- MERRIT, P.M.; DANHORN, P.; FUQUA, C. Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.189, p. 8005-8014, 2007.
- MONIER, J.M.; LINDOW, S.E. Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. **Microbial Ecology**, New York, v.49, n.3, p.343-352, 2005.
- MORGAN, J.A.W.; BENDING, G.D.; WHITE, P.J. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n.417, p. 1729-1739, 2005.
- MORRIS, C.E.; MONIER, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.41, p.429-453, 2003.
- MOY, M.; LI, H.M.; SULLIVAN, R.; WHITE, J.F. JR; BELANGER, F.C. Endophytic fungal β -1,6-glucanase expression in the infected host grass. **Plant Physiology**, Lancaster, v.130, p.1298-1308, 2002.

MUNCHBACH, M.; DAINESE, P.; STAUDENMANN, W.; NARBERHAUS, F.; JAMES, P. Proteome analysis of heat shock protein expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.263, p.39-48, 1999.

MUNIZ, C. R. **Análise da resposta a estresse oxidativo de *Xylella fastidiosa* através de hibridações de microarranjos de DNA**. 2006. 62p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p. 603-612, 2001.

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants, **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, New York, v.101, p.1737-1742, 2004.

NIBA, E.T.E.; NAKA, Y.; NAGASE, M.; MORI, H.; KITAKAWA, M. A Genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli*. **DNA Research**, Oxford, p. 1-10, 2007.

NIETO-PENÁLVER, C.G.; MORIN, D.; CANTET, F.; SAUREL, O.; MILON, A.; VORHOLT, J.A. *Methylobacterium extorquens* AM1 produces a novel type of acyl homoserine lactone with a double insaturated side chain under methylotrophic growth conditions. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.580, p.561-567, 2006.

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OKINAKA, Y.; YANG, C.; PERNA, N.T.; KEEN, N.T. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 that are regulated during plant infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.15, n.7, p.619-629, 2003.

OMER, Z.S.; TOMBOLINI, R.; GERHARSON, B.; Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.46, p.319-326, 2004.

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

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, London, v. 405, n. 6788, p. 837-846, 2000.

PAPER, J.M.; SCOTT-CRAIG, J.S.; ADHIKARI, N.D.; CUOMO, C.A.; WALTON, J.D. Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in plant from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Proteomics**, Weinheim, v.7, p. 3171-3183, 2007.

PAPPIN, D.J. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v.64, p.165-173, 1997.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds.) **Microbial ecology of leaves**. New York: Spring Verlag, 1991, p.179-197.

PICHEREAU, V.; HARTKE, A.; AUFRAY, D.Y. Starvation and osmotic stress induced multiresistances. Influence of extracellular compounds. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.55, p.19-25, 2000.

PIRTTILA, A.M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch pine (*Pinus Sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.3073-3077, 2000.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.25, p.284-288, 1997.

PORUBLEVA, L.; VELDEN, K.; KOTHARI, S.; OLIVER, D.; CHITNIS, P. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. **Electrophoresis**, Berlin, v. 22, n. 9, p. 1724-1738, 2001.

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

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of interating the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p. 577-582, 1997a.

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

QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J.A.; TAILLIEZ, P. Characterization of *Lactobacillus helveticus* phage resistant mutants by RAPD fingerprints and phenotypic parameters. **Food Research International**, Oxford, v. 31, p. 537-542, 1998.

RAMOS, J.L.; GALLEGOS, M.; MARQUÉS, S.; RAMOS-GONZÁLEZ, M.; ESPINOSA-URGEL M.; SEGURA, A. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.4, p.166–171, 2001.

REDDY, P.V.; LAM, C.K.; BELANGER, F.C. Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. **Plant Physiology**, Rockville v.111, p.1209–1218, 1996.

REN, D.; BEDZYK, L.A.; YE, R.W.; THOMAS, S.M.; WOOD, T.K. Differential gene expression shows natural brominated furanones interferes with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.88, p.630-642, 2004.

RENAUT, J.; LUTTS, S.; HOFFMANN, L.; HAUSMAN, J.F. Responses of poplar to chilling temperatures: Proteomic and physiological aspects. **Plant Biology**, New York, v. 6, n. 1, p. 81-90, 2004.

RETZLAFF, C.; YAMAMOTO, Y.; HOFFMAN, P. S.; FRIEDMAN, H.; KLEIN, T. W. Bacterial heat shock proteins directly induced cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. **Infectious Immunology**, Washington, v. 62, p.5689–5693, 1994.

ROVIRA, A.D.; CAMPBELL, R. Scanning electron microscopy of microorganisms on the roots of wheat. **Microbial Ecology**, New York, v.1, p.15–23, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHEELE, G.A. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, p. 5375-5385, 1975.

SCHEMBRI, M.A.; KJAERGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.48, p.253-267, 2003.

SHEN, P.H.; WU, B. Over-expression of a hydroxypyruvate reductase in *Methylobacterium* sp. MB200 enhances glyoxylate accumulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.34, p.657-663, 2007.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.67, p.509-544, 1998.

STAMFORD, T.L.; STAMFORD, N.P.; COELHO, L.C.; ARAUJO, J.M. Production and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresources Technology**, Oxford, v.76, p.137-141, 2001.

STUURMAN, N.; BRAS, C. P.; SCHLAMMAN, H. R. M.; WIJFJES, A. H. M.; BLOEMBERG, G.; SPAINK, H. P. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.13, p.1163-1169, 2000.

STROVAS, T.J.; SAUTER, M.L.; GUO, X.; LIDSTROM, L.M. Cell-to-cell heterogeneity in growth rate and gene expression in *Methylobacterium extorquens* AM1. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 189, p. 7127-7133, 2007.

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

SY, A; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.183, p. 214-220, 2001.

SY, A.; TIMMERS, A.T.J.; KNIEF, C.; VORHOLT, J.A. Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.7245-7252, 2005.

TOYAMA, H.; ANTHONY, C.; LIDSTROM, M. E. Construction of insertion and deletion *mxs* mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.166, p.1-7, 1998.

TROTSSENKO, Y.A.; IANOVA, E.G.; DORONINA, N.V. Aerobic methylophilic bacteria as phytosymbionts. **Microbiology**, New York, v.70, p.623-632, 2001.

TSUGAWA, H.; ITO, H.; OHSHIMA, M.; OKAWA, Y. Cell adherence-promoted activity of *Plesiomonas shigelloides* GroEL. **Journal of Medical Microbiology**, Berks, v.56, p.23-29, 2007.

VAN AKEN, B.; PERES, C.M.; DOTY, S.L.; YOON, J.M.; SCHNOOR, J.L. *Methylobacterium populi* sp nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.54, p.1191-1196, 2004a.

VAN AKEN, B.; YOON, J.M.; SCHNOOR, J.N. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.508-517, 2004b.

VON BODMAN, S.B.; FARRAND, S.K. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.177, p.5000-5008, 1995.

WANG, K.; KANG, L.; ANAND, A.; LAZAROVITS, G.; MYSORE, K.S. Monitoring *in plant* bacterial infection at both cellular and whole plant levels using the green fluorescence protein variant GFPuv. **New Phytology**, Oxford, v.174, n.1, p.212-223, 2007.

WANG, Y.; OHARA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting Rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.18, n.5, 2005, p. 385–396, 2005.

WESTBROOK, J.A.; YAN, J.X.; WAIT, R.; WELSON, S.Y.; DUNN, M.J. Zooming-in on the proteome: Very narrow-range immobilised pH gradients reveal more protein species and isoforms. **Electrophoresis**, Berlin, v.22, p.2865–2871, 2001.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, New York, v.218, p.706-740, 1993.

WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. **Microbiology**, Washington, v.153, p.3923-3938, 2007.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 13, p. 19-50, 1995.

YANG, T. T.; SINAI, P.; GREEN, G.; KITTS, P. A.; CHEN, Y. T.; LYBARGER, L.; CHERVENAK, R.; PATTERSON, G. H.; PISTON, D. W.; KAIN, S. R. Improved fluorescence and dual color detection with enhancer blue and green variants of the green fluorescent protein. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, p.8212-8216, 1998.

YEZZA, A.; FOURNIER, D.; HALASZ, A.; HAWARI, J. Production of polyhydroxyalkanoates from methanol by a new methylotrophic bacterium *Methylobacterium* sp. GW2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 73, p.211-218, 2006.

XI, C.W.; LAMBRECHT, M.; VANDERLEYDEN, J. Bi-functional gfp and gus-A containing mini TN5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.35, p.85-92, 1999.

ANEXOS

Anexo A

Alinhamento das sequências do gene 16S rDNA dos isolados de *M. extorquens* identificados

CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignments

Sequence type explicitly set to DNA
 Sequence format is Pearson
 Sequence 1: AR 1.6/2 Selvagem 754 bp
 Sequence 2: P4B12 751 bp
 Sequence 3: P20G2 710 bp
 Start of Pairwise alignments
 Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 34.8868
 Sequences (1:3) Aligned. Score: 37.7465
 Sequences (2:2) Aligned. Score: 40.4794
 Sequences (2:3) Aligned. Score: 34.0845
 Sequences (3:2) Aligned. Score: 34.0845
 Sequences (3:3) Aligned. Score: 40.4225
 Guide tree file created:

[clustalw.dnd]
 Start of Multiple Alignment
 There are 2 groups
 Aligning...
 Group 1: Sequences: 2 Score:13095
 Group 2: Sequences: 3 Score:13125
 Alignment Score 15474
 CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln]

clustalw.aln

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

AR 1.6/2      CCTTCATGCACCCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAACTGAGACGGCTTTTGGGGATTT
P20G2        CCTTCATGCACCCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAACTGAGACGGCTTTTGGGGATTT
P4B12        CCTTCATGCACCCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAACTGAGACGGCTTTTGGGGATTT
*****

AR 1.6/2      GCTCAACCTCGCGGTTTTCGCGTCCCACTGTCAACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAT
P20G2        GCTCAACCTCGCGGTTTTCGCGTCCCACTGTCAACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAT
P4B12        GCTCAACCTCGCGGTTTTCGCGTCCCACTGTCAACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAT
*****

AR 1.6/2      CCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCACACCTTCCTCGCGGCTTATCACCGGCA
P20G2        CCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCACACCTTCCTCGCGGCTTATCACCGGCA
P4B12        CCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCACACCTTCCTCGCGGCTTATCACCGGCA
*****

AR 1.6/2      GTCTCCCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAGGACGTGGGTTGCGCTCGTTGCG

```

```

P20G2      GTCTCCCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAGGACGTGGGTTGCGCTCGTTGCG
P4B12      GTCTCCCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAGGACGTGGGTTGCGCTCGTTGCG
*****

AR 1.6/2   GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGCAC
P20G2      GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGCAC
P4B12      GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGCAC
*****

AR 1.6/2   GCCTCCGAAGAGGATCCCCGATCTCTCGA-GGTAACATGCCATGTCAAGGGATGGTAAGG
P20G2      GCCTCCGAAGAGGATCCCCGATCTCTCGA-GGTAACATGCCATGTCAAGGGATGGTAAGG
P4B12      GCCTCCGAAGAGGATCCCCGATCTCTCGAAGGTAACATGCCATGTCAAGGGATGGTAAGG
*****

AR 1.6/2   TTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
P20G2      TTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
P4B12      TTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
*****

AR 1.6/2   TCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCGG
P20G2      TCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCGG
P4B12      TCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCGG
*****

AR 1.6/2   CGCCACTGACCTGCAAGCAGGCCAACGGCTGGCATTTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCA
P20G2      CGCCACTGACCTGCAAGCAGGCCAACGGCTGGCATTTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCA
P4B12      CGCCACTGACCTGCAAGCAGGCCAACGGCTGGCATTTCATCGTTTTACGGCGTGGACTAACA
*****

AR 1.6/2   GGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCGCCTC-AGCGTCAGAACCGGACCA
P20G2      GGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCGCCTC-AGCGTCAGAACCGGACCA
P4B12      GGG-TATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCGCCTCAGCGTCAGAACCGGACCA
*** *****

AR 1.6/2   GACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTGCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCG
P20G2      GACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTGCGAATATCTACGAATT-CACCTCTACACTCG
P4B12      GACAGC-GCCTTCGCCACTGGTGTTCTTGCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCG
*****

```

clustalw.dnd

```

AR 1.6/2 selv:0.30726,
P4B12:0.34388,
P20G2:0.31528);

```

```

P4B12: 6 gaps 654 x 100/ 660 = 99.09%
P20G2: 1 gap 659 x 100/660 = 99.84%

```


Anexo B

Dendograma de similaridade genética entre as 4 linhagens utilizadas, gerado por UPGMA utilizando-se o software NTSYS versão 2.1