Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Ecologia de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira

Manuella Nóbrega Dourado

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

Manuella Nóbrega Dourado
Engenheiro Agrônomo

Ecologia de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira

Orientador:
Prof. Dr. WELINGTON LUIZ DE ARAÚJO

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

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

Dourado, Manuella Nóbrega
Ecologia de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira/ Manuella Nóbrega Dourado. - - Piracicaba, 2010.
132 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bactérias Gram negativas 2.Biofilmes 3. Ecologia Microbiana 4. Expressão gênica 5.Genes 6. Plantas hospedeiras 7. Sequenciamento genético 8. Variação genética. Título

CDD 632.32
D739e

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

Aos meus irmãos, Mateus e Mário Vítor, e

ao meu amor Rafael,

DEDICO.

OFEREÇO

Aos meus pais, Durval e Valéria,

pelo amor e apoio incondicional

que norteiam minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Welington Luiz de Araújo, por me orientar durante quase sete anos de Laboratório de Genética de Microrganismos, e me proporcionar a oportunidade de aprender muito do que hoje sei sobre Genética de Microrganismos, além de dar sempre seu apoio e sua amizade.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

À FAPESP (Processo 02/14143-3), pelo financiamento deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, por intermédio do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela oportunidade da realização do curso.

À Universidade de Mogi das Cruzes, por intermédio do Núcleo Integrado em Biotecnologia, pela oportunidade da realização dos experimentos.

Ao Professor João Lúcio de Azevedo e à Professora Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner por disponibilizar toda a estrutura do Laboratório de Genética de Microrganismos (Esalq, Usp), pela receptividade, pelo apoio e pelo carinho.

Ao Professor Luiz Roberto Nunes e à Professora Regina Lucia Batista da Costa de Oliveira pela disponibilização da estrutura do Laboratório de Genômica (NIB-UMC) e pela confiança.

À Dra. Salete Gaziola do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas (Esalq, Usp), ao Dr. Luiz Humberto Gomes, do Laboratório de Genética de Leveduras (Esalq, Usp) pela utilização dos equipamentos do laboratório.

Ao Professor Carlos Alberto Labate, pelo apoio na realização dos trabalhos de proteoma.

À Fernanda Salvato, Tiago Falda, Mateus Bonato, Maria Juliana Rodrigues do laboratório Max Feffer de Genética de Plantas/Esalq, pela ajuda durante a realização dos trabalhos de proteoma.

À Dra. Mônica Labate, David Moon e Lívia Franceschini do laboratório Max Feffer de Genética de Plantas/Esalq, pela ajuda durante os experimentos com PCR em tempo real.

Ao Marcos Vinicius de Oliveira e à Vivian da Silva pela ajuda nos experimentos de microarranjo, principalmente na montagem dos *chips* e análises.

À Daiene pela ajuda nos experimentos com RNA, principalmente com *Xylella*. Obrigada por me ajudar na bancada, pelas dicas, pelas discussões, pela paciência e pela amizade.

À Ana Claudia e Deibs pela ajuda nas análises do microarranjo e pela amizade.

Ao Anderson que me ajudou no início do mestrado na montagem dos experimentos de interação bactéria-planta.

Aos doutores Léia Cecília, Maria Carolina, Fernando e Paulo pelas discussões científicas e pelas correções que contribuíram para minha formação.

À Marise, pela amizade e pela paciência em revisar a versão final do trabalho.

Aos meus colegas do Núcleo Integrado em Biotecnologia: Aline Aparecida C. Neves, Almir J. Ferreira, Ana Cláudia Rodrigues, Ana Marie Pereira, Bianca Suprizi, Carolina Bertini, Cristiane Santana, Cristine Gobbo, Daiene Santos, Deibs Barbosa, Emy Tio Mano, Felipe Silva, Felipe Rezende, Fábio Lino (Dig), Fábio Silva, Fernanda Alves Caravieri, Fernanda Storte, Flavia Holanda, Gabriela Delfino, Janaína Mendes, Juliana Viana da Silva (Ju), Juliana G. Crescente, Luciana Francisco, Marília Bixília, Marina Silva, Maristela Ciraulo, Roberta Sommers e Tamara Cruz França que foram muito receptivos e tornaram minha estadia em Mogi das Cruzes muito mais prazerosa.

Agradeço a todos meus colegas que também estão desenvolvendo ou desenvolveram pesquisa no Laboratório de Genética de Microrganismos: Ana Paula Pallu, Andréa Bogas, Anderson Ferreira, Aline Romão (Romã), Armando Dias (Jack), Carlos Vildoso (Carlão), Cláudia Gai, Cristiane Fasanella, Danice Luvizzoto (Metal), Fernanda Bernardes, Fernanda Sebastianes, Fernando Andreote, Francisco Andreote, Heloíze Milano, José Antônio Silva (Zezo), Júlia Kuklinsky Sobral, Joelma Marcon, Laura Assumpção, Léia Fávaro, Maria Beatriz Rodrigues, Maria Carolina Quecine (Micuim), Mariele, Marise Suzuki, Mayra Martins, Michele da Silva, Paulo Lacava, Priscilla Rossetto, Renata Assis, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Rudi Procópio, Sarina Tsui, Uirá Belmonte, Vanessa Santos, Viviane dos Santos e pela convivência enriquecedora, carinho e crescimento científico e pessoal durante todos esses anos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Genética, Esalq-Usp.

Às minhas amigas de Mogi das Cruzes: Linoca, Emy e Fer pela amizade, pelo companheirismo e pela hospedagem.

Aos meus amigos de Piracicaba: Aline (Buiaco), Leila Priscila (Xiua), Marise, Moisés, Paula Fabiane, Saly, Sâmala, Sueli, Berenice (Kuri) e Vítor Hugo que contribuíram para vários momentos felizes.

Ao meu namorado Rafael Ribeiro por me entender e incentivar a perseguir meus sonhos.

À minha família e amigos por me apoiar, acreditar em mim, motivando-me a seguir em frente.

A todos que contribuíram de alguma forma científica e/ou emocional (até os que eu com certeza esqueci de citar aqui) para o desenvolvimento deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

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

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO 15
ABSTRACT 17
LISTA DE FIGURAS 19
LISTA DE TABELAS 21
1. INTRODUÇÃO.....23
1.1. Microrganismos endofíticos.....24
1.2 O Gênero *Methylobacterium*.....26
1.3 Importância da diversidade bacteriana.....29
1.4 Interação planta-microrganismos 31
1.5 Análise da variabilidade genética.....31
1.6 Expressão gênica.....32
1.6.1 O Microarranjo de DNA.....32
1.6.2 PCR quantitativo 36
Referências.....37
2. ANÁLISE FILOGENÉTICA (16S *rRNA*) E FUNCIONAL (*mxaF*) DE *Methylobacterium* spp. endofítica 49
Resumo 49
Abstract.....51
2.1 Introdução 53
2.2 Materiais e Métodos.....55
2.2.1 Isolados de *Methylobacterium*.....55
2.2.2 Extração de DNA total 56
2.2.3 Análise da variabilidade genética de *Methylobacterium spp.*.....58
2.2.3.1 Amplificação dos fragmentos dos genes 16S *rRNA* e *mxaF* 58
2.2.3.2 Identificação de bactérias pela análise do gene 16S *rRNA* e *mxaF* 58
2.3 Resultados e Discussão 59
Referências.....64

3. EXPRESSÃO GÊNICA NA INTERAÇÃO DE *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 COM ARROZ E EUCALIPTO PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL 69
Resumo 69
Abstract 71
3.1 Introdução 73
3.2 Materiais e Métodos 75
3.2.1 Isolado de *Methylobacterium mesophilicum* e condições de cultivo 75
3.2.2 Material Vegetal 75
3.2.3 Inoculação de *M. mesophilicum* 75
3.2.4 Extração de RNA total 76
3.2.5 Avaliação da qualidade do RNA obtido 76
3.2.6 Síntese de cDNA 77
3.2.7 Detecção de *M. mesophilicum* (SR1.6/6) 77
3.2.8 Desenho de *primers* 77
3.2.9 Análise por PCR quantitativo (PCR em tempo real) 79
3.3 Resultados e Discussão 80
Referências 86
4. EXPRESSÃO GÊNICA DE *Xylella fastidiosa* EM CO-CULTIVO COM A BACTÉRIA ENDOFÍTICA *Methylobacterium mesophilicum* 91
Resumo 91
Abstract 93
4.1 Introdução 95
4.2 Material e Métodos 99
4.2.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo 99
4.2.2 Co-cultivo de *X. fastidiosa* e *M. mesophilicum* 99
4.2.3 Extração de RNA total 100
4.2.4 Avaliação da qualidade do RNA obtido 100
4.2.5 Purificação do RNA 101
4.2.6 Síntese de cDNA marcado com Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP para hibridação competitiva 101
4.2.7 *Chip* do microarranjo de DNA 101
4.2.8 Hibridação de microarranjo de DNA em câmara úmida 102
4.2.9 Aquisição e análise de imagens 102

4.3 Resultados e Discussão 104

Referências.....118

5. CONCLUSÕES 125

ANEXO 127

RESUMO

Ecologia de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira

O gênero *Methylobacterium* é composto por bactérias de coloração rósea, metilotróficas facultativas (PPFM - *pink-pigmented facultative methylotrophic*), que podem fixar nitrogênio, nodular a planta hospedeira, produzir o fitohormônio citocinina e as enzimas pectinase e celulase, podendo dessa forma promover o crescimento vegetal devido à disponibilidade de nitrogênio e à indução de resistência sistêmica. *Methylobacterium* spp. têm sido descritas como endófitos ou epífitas em diferentes plantas hospedeiras, onde a sua colonização e distribuição no hospedeiro podem ser influenciadas pelo genótipo da planta ou por interações com outros microrganismos associados ao hospedeiro. Neste contexto, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos visando um melhor entendimento da interação *Methylobacterium*-planta e da diversidade deste gênero bacteriano que tem sido isolado de diferentes plantas hospedeiras, exercendo diferentes funções ainda pouco conhecidas. Portanto, este trabalho tem como objetivo estudar a diversidade genética de *Methylobacterium* spp., por meio do seqüenciamento parcial dos genes 16S *rRNA* e *mxaF*; analisar os genes de responsáveis pela interação da *Methylobacterium* com a planta hospedeira e analisar os genes envolvidos na interação *Methylobacterium* (endófito)- *Xylella fastidiosa* (patógeno). Os resultados mostraram que existe uma resposta adaptativa de *Methylobacterium* spp. específica para cada planta hospedeira. Da mesma forma, foi observado que esta adaptação específica da bactéria à planta, também pode levar à seleção de genótipos específicos para cada planta hospedeira, embora eventos aleatórios também possam ser responsáveis pela diversidade de *Methylobacterium* na planta hospedeira. Na análise de expressão gênica da interação *Methylobacterium*-planta, foi observado que o gene relacionado ao metabolismo do metanol (*mxaF*) não apresentou mudança no padrão de expressão. Genes relacionados a estresse *crtI* (estresse sentido pela bactéria) e *acdS* (estresse sentido pela planta), tiveram suas expressões reduzidas na presença da planta, mostrando que a presença de exsudados das plantas não representou um estresse ao desenvolvimento bacteriano. Os genes relacionados à patogenicidade *patatin* e *phoU* não foram alterados, confirmando que *Methylobacterium* é um endófito, e possuem expressão induzida de tais genes quando interagindo com a planta hospedeira. Os resultados permitem concluir que nas condições avaliadas os exsudados das plantas não causam estresse à bactéria (SR1.6/6). Por meio da análise de expressão gênica *in vitro* de *X. fastidiosa* em co-cultivo com *M. mesophilicum*, foi observado que este fitopatógeno vascular apresentou diminuição do crescimento e da formação de biofilme. Os resultados aqui apresentados mostram que a diversidade deste grupo de endófitos é parcialmente determinada pela planta hospedeira, onde tais bactérias interagem tanto com a planta como com outros grupos, como fitopatógenos presentes neste nicho.

Palavras-chave: Diversidade bacteriana; Interação bactéria-planta; Co-cultivo; *Quorum sensing*; Biofilme

ABSTRACT

Methylobacterium spp. ecology in the host plant

The genus *Methylobacterium,* constituted by PPFMs - *pink-pigmented facultative methylotrophic*, are able to fix nitrogen, nodule the host plant, produce cytokines and enzymes involved in induction of systemic resistance such as pectinase and cellulase, inducing plant growth. *Methylobacterium* sp. has been described as endophyte or epiphyte in different host plants, where the colonization and distribution on the host can be influenced by plant genotype or by interaction with other microorganisms associated to the host. In this context, few studies aims the better understanding of the diversity of this genus in different host, the interaction *Methylobacterium*-plant, and the interaction *Methylobacterium*-other bacteria. Therefore, this study aims to study the genetic diversity of *Methylobacterium* spp., by sequencing the 16S *rRNA* and *mxaF* gene; to analyze the genes responsible for the *Methylobacterium*-plant host interaction and to analyze the genes involved in *Methylobacterium* (endophyte) - *Xylella fastidiosa* (pathogen) interaction. Results show differential adaptive responses of *Methylobacterium* spp. in distinct plant species. However, the clustering according to the host plant was observed for a subset of isolates, suggesting that this diversity could be driven by stochastic events, although plant genotype may contribute to this diversity. Analyzing the *Methylobacterium*-plant interaction gene expression it was observed that genes related to metabolism of methanol (*mxaF*) was not amended. The genes related to stress such as *crtI* (stress sensed by the bacteria) and *acdS* (stress sensed by the plant) had its expression reduced with the plant showing that the plant exudates did not represent a stress to the bacteria development. The genes related to pathogenicity like *patatin* and *phoU* were not amended, confirming that *Methylobacterium* is an endophyte that do not induce when the bacteria interacts with the plant host. Using a genetic expression analyses of *X. fastidiosa in vitro* in co-cultive with *M. mesophilicum*, it was seen that this phytopathogen presented the growth and biofilm formation reduction. These results show that the diversity of this endophyte group is partially determinate by the plant host, where this bacterium interacts with the plant and with other groups, such as phytopathogen present in this niche.

Keywords: Bacteria diversity; Plant-bacteria Interaction; Co-cultive; *Quorum sensing*; Biofilm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Representação esquemática de hibridação competitiva em microarranjo de DNA. Amostras de RNA ou DNA extraídas das populações referência e teste são marcadas com diferentes fluoróforos e misturadas para hibridação em microarranjo. A imagem formada após a varredura em "*scanner*" óptico contém pontos verdes, vermelhos ou amarelos, correspondendo à hibridação com sondas marcadas com Cy3, Cy5 ou ambos na mesma proporção (http://www.fao.org).....34

Figura 2.1 - Ciclo da oxidação microbiana do metanol e assimilação do formaldeído (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005).....54

Figura 2.2 - A árvore filogenética construída pelo método de máxima parcimônia com seqüências de 700 bp do gene *16S rRNA* de *Methylobacterium* spp. disponível no banco de dados do RDP database, e *Beijerinckia mobilis* e *Methylocella sylvestris* foram usadas como *outgroup*. Os valores de *Bootstrap* superiores a 50 são mostrados nos internodes (*n* = 1000 replicatas). Os símbolos representam isolados dos seguintes hospedeiros: ○ café, △ cana-de-açúcar, □ citros, ◇ pimentão, ▼ *Borreria verticillata* ■ eucalipto. As barras indicam a divergência das seqüências....61

Figura 2.3 - A árvore filogenética construída pelo método de máxima parcimônia com seqüências de 520 bp do gene *mxaF* de Methylobacterium spp. disponível no banco de dados do GenBank. *Beijerinckia mobilis* e *Methylocella sylvestris* foram usadas como *outgroup*. Os valores de *Bootstrap* superiores a 50 são mostrados nos internodes (n = 1000 replicatas). Os símbolos representam isolados dos seguintes hospedeiros: ○ café, △ cana-de-açúcar, □ citros, ◇ pimentão, ▼ *Borreria verticillata* ■ eucalipto. As barras indicam a divergência das seqüências.....62

Figura 3.1 - Expressão gênica dos genes (A) *mxaF*, (B) *sss*, (C) *acsS*, (D) *crtI*, (E) *patatin*, (F) *phoU* comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *recA* e as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica.....82

Figura 4.1 - Experimento montado um 250 mL de cultura líquida nos 3 tratamentos: (1) SR1.6/6; (2) co-cultura de SR1.6/6- 9a5c e (3) 9a5c.....100

Figura 4.2 - Padrão de migração de RNA total de *X. fastidiosa* em eletroforese em gel de agarose desnaturante. M - Marcador 2 Kb. 1 - RNA de SR1.6/6. 2 - RNA de 9a5c. 3 - RNA da co-cultura de SR1.6/6- 9a5c 104

Figura 4.3 – (A) Gráfico gerado pelo algoritmo FOM – Figura de mérito. O valor representado no eixo y é a média entre as variações de expressão dos genes locados em cada cluster. No eixo x, está o número de *clusters* de 1 a 20. Na coluna à direita, é representada uma lista com os números de *clusters* em ordem crescente, e o valor médio obtido da variação de expresso entre os genes de cada um. O número de cluster selecionado pelo operador é mostrado no gráfico pelo cruzamento das ordenadas em rosa e (B) Agrupamento de 49 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 7 *clusters* 105

Figura 4.4 - Agrupamento de 49 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 7 "*clusters*". Cada "cluster" apresenta genes com padrão de expressão semelhantes. (A) Genes de *X. fastidiosa* super expressos no tratamento com *M. mesophilicum* e (B) genes de *X. fastidiosa* reprimidos no tratamento com *M. mesophilicum* 108

Figura 4.5 - Representação gráfica da distribuição das funções presumidas pelos genes estatisticamnete diferencialmente expressos de *X. fastidiosa* na presença de *M. mesophilicum* 111

Figura 4.6 - Um modelo proposto para a sinalização celular DFS em *X. fastidiosa*. *rpfF* codifica o DSF sintase, *rpfC* codifica um híbrido de dois componente sensores de DSF. A concentração de DSF regula negativamente a expressão de *rpfF*. O DSF se liga ao sensor de dois componentes que induz a autofosforilação e fosforila o regulador de dois componentes, como RpfG, que regula positivamente os genes necessários para a adesão e formação de biofilme (*hxfA*, *hxfB*, *fimA* e *gumJ*) modulando reguladores transcricionais como -sigma 54 ou CLP. O repressor "R" possivelmente reprime genes de virulência tais como *tolC*, *pglA*, e PD0279 (codifica proteína do domínio GGDEF), que é necessária para colonização e a movimentação de *X. fastidiosa* na planta (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008) 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Identificação de isolados de *Methylobacterium* spp. de diferentes plantas hospedeiras a partir da seqüência parcial dos genes 16 S *rRNA* e *mxaF*.....57

Tabela 3.1 - Seqüências de *primers* utilizados 78

Tabela 3.2 - Identificação de isolados de Methylobacterium spp. de diferentes plantas hospedeiras a partir da seqüência parcial dos genes 16 S *rRNA* 79

Tabela 3.3 - Amplificação do genes de diferentes gêneros bacterianas pelos *primers* utilizados neste estudo.....81

Tabela 4.1 – Relação de 49 genes com variação estatisticamente significativa classificados em oito categorias gênicas de acordo com http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf/. Os genes em vermelho foram super expressos e os em verde reprimidos em *X. fastidiosa* no tratamento em co-cultivo com *M. mesophilicum*.....109

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Methylobacterium* pertence à ordem Rhizobiales, família Methylobacteriaceae, é composto por bactéria de coloração rósea, metilotrófica facultativa (PPFM) com capacidade de utilizar metanol como única fonte de carbono, é encontrada em relações epifíticas e endofíticas com diferentes espécies vegetais. *Methylobacterium* spp. podem estar envolvidas na formação de nódulos, fixação de nitrogênio em fabáceas (leguminosas), produção do fitohormônio citocinina e também na indução de resistência sistêmica. Acredita-se que esse grupo pode ter importante envolvimento na interação com a planta hospedeira, visto que em soja, foi observado que a presença de *Methylobacterium* pode estimular a germinação de sementes, entretanto, os mecanismos genéticos envolvidos durante essa interação ainda não foram descritos.

A colonização e distribuição de bactérias endofíticas no hospedeiro podem ser influenciadas por interações com outros microrganismos associados à planta, nematóides parasitas e pelo tipo de interação com o hospedeiro, e, portanto, o conhecimento da diversidade bacteriana associada pode contribuir para o entendimento desta interação bactéria-planta, bem como bactéria-planta, bactéria-bactéria e bactéria-fungo. Da mesma forma, bactérias são dominantes na comunidade epifítica, sendo o grupo mais importante quanto ao número e à biomassa, tendo também a sua composição e papel no desenvolvimento vegetal dependente do tipo de interação com a planta e outras populações microbianas. Neste contexto, já foram descritas muitas espécies de bactérias residentes sobre a superfície da folha que causam impacto na biologia da planta ou no seu ambiente, mas pouco é conhecido sobre a diversidade e função destas populações naturais. Além disso, este nicho pode ser uma potencial fonte de novas espécies, as quais podem apresentar potencial aplicação na indústria e na agricultura. Neste contexto, estudos recentes têm mostrado que regiões tropicais apresentam um adversidade biológica maior que regiões temperadas, e portanto a avaliação de comunidades destas regiões com maior diversidade pode permitir a descrição de novas espécies e/ou genótipos microbianos com novas propriedades biotecnológicas.

Além disso, a técnica do PCR quantitativo tem sido pouco explorada para a análise da expressão de genes microbianos envolvidos na interação microrganismo-planta, principalmente quando esta interação envolve bactérias endofíticas. Da mesma forma, nenhum trabalho até o momento avaliou por meio de técnicas moleculares (técnicas baseadas em expressão gênica), as respostas de bactérias fitopatogênicas à presença de bactérias endofíticas, visando compreender as

interações bacterianas no interior das plantas, e em especial, a importância destas interações no desenvolvimento da CVC.

Neste contexto, o presente trabalho visa um melhor entendimento da interação *Methylobacterium*-planta, por meio da análise de sua diversidade genética, da expressão de genes envolvidos na interação com a planta hospedeira e do efeito desta bactéria sobre a expressão de genes de *X. fastidiosa*. Portanto, este trabalho tem como objetivos: (1) Avaliar a diversidade genética de *Methylobacterium* spp., por meio do seqüenciamento parcial dos genes 16S *rRNA* e *mxaF*; (2) Analisar os genes responsáveis pela interação da *Methylobacterium* com a planta hospedeira por meio da técnica de PCR quantitativo; e (3) Identificar genes de *X. fastidiosa* (patógeno) expressos diferencialmente em co-cultivo com a bactéria endofítica *M. mesophilicum*, por meio da técnica de microarranjos de DNA.

1.1. Microrganismos endofíticos

Bactérias podem interagir com plantas, atuando como patógenos, epífitas ou endófitas. São denominados endofíticos todos aqueles em que 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. Assim, excluem-se fungos micorrízicos e bactérias simbióticas nodulantes, microrganismos epifíticos e fitopatógenos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Entretanto, essas distinções de ordem didática, nem sempre correspondem às complexas relações entre os microrganismos e seus hospedeiros. Dependendo das condições ambientais, um microrganismo classificado como endófito pode comportar-se como um epifítico ou um patógeno subclínico (AZEVEDO, 1998; ANDREWS; HARRIS, 2000), ou em alguns casos a presença do endófito pode estar associada à presença do patógeno ou de outro microrganismo, com o qual pode existir uma íntima interação (ARAÚJO et al., 2001).

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; HALLMANN; KLOEPPER, 1997), vasos condutores (MAHAFFEE et al., 1997; HALLMANN et al., 1997) e ocasionalmente o meio intracelular (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996; QUADT-HALLMANN; BENHAMOU; KLOEPPER, 1997). Segundo Sturz e Nowak (2000), microrganismos endofíticos são mais

estáveis por não estarem expostos às condições ambientais externas aos órgãos vegetais, havendo pouca ou nenhuma competição microbiana.

Misagui e Donndelinger (1990) relataram que bactérias endofíticas, possivelmente, influenciam a fisiologia da planta hospedeira por processos ainda não esclarecidos. Essa influência se deve à íntima relação entre os diferentes organismos, desenvolvida durante a co-evolução das espécies. Bactérias desempenham, no interior de seus hospedeiros, diversas propriedades de interesse, protegendo-os do ataque de insetos, patógenos, herbívoros; produção de compostos de crescimento vegetal, maior disponibilização de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO; MACCHERONI JÚNIOR; ARAÚJO, 2003).

Estes microrganismos produzem diferentes enzimas, entre elas podem ser citadas exolevanases (MENENDEZ et al., 2002), quitinases (PLEBAN;CHERNIN; CHET, 1997), glicanases (MOY et al., 2002) e proteases (REDDY; LAM; BELANGER, 1996), as quais podem atuar em processos importantes na interação microrganismo-planta. Já 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; BENHAMOU; KLOEPPER, 1997). 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* (ARAÚJO et al., 2001). O isolamento freqüente de *C. flaccumfaciens* como endófito de plantas de citros assintomáticas infectadas com *X. fastidiosa* sugere que esta bactéria endofítica pode atuar na redução dos sintomas causados pela bactéria patogênica (ARAÚJO et al., 2002).

1.2 O Gênero *Methylobacterium*

O gênero *Methylobacterium* pertence à subclasse α-Proteobactéria e possui 34 espécies descritas: *Methylobacterium adhaesivum, M. aminovorans, M. aquaticum, M. brachiatum, M. chloromethanicum, M. dichloromethanicum, M. extorquens, M. fujisawaense, M. gregans, M. hispanicum, M. isbiliense, M. jeotgali, M. komagatae, M. lusitanum, M. mesophilicum, M. nodulans, M. organophilum, M. oryzae, M. persicinum, M. phyllosphaerae, M. platani, M. podarium, M. populi, M. radiotolerans, M. rhodesianum, M. rhodinum, M. salsuginis, M. suomiense, M. tardum, M. thiocyanatum, M. variabile, M. zatmanii*, sendo a espécie tipo *M. organophilum* (WEON et al., 2008; KATO et al., 2008; MADHAIYAN et al., 2009). Membros desse gênero estão distribuídos em ambientes naturais explorados pelo homem, como solo, ar, poeira, água (doce e salgada) e sedimentos e ambientes urbanos (tais como suprimento de água, banheiros e ar condicionado) (VAN AKEN et al., 2004a).

Esse gênero é formado por bactérias Gram negativas que geralmente apresentam pigmentação rósea, devido à síntese de carotenóides (VAN DIEN et al., 2003) e podem crescer utilizando compostos de apenas um carbono (C_1), como metanol e metilamina (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998), sendo por estas características denominadas de PPFM (*Pink-Pigmented Facultative Methylotrophics*).

A principal característica desse grupo está na habilidade de oxidar metanol por meio da desidrogenase do metanol (MDH), codificada pelo gene *mxaF*. Bactérias do gênero *Methylobacterium* são assimiladoras de formaldeído, pertencentes à subclasse α-proteobactéria, enquanto que espécies que utilizam a ribulose monofosfato pertencem à subclasse β-proteobactéria (NISHIO; YOSHIKURA; ITOH, 1997). Essas bactérias apresentam como características taxonômicas a forma de bastonete reto e metabolismo estritamente aeróbio. Crescem ativamente em tecidos meristemáticos, formando populações entre 10^4 e 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido da planta (DORONINA et al., 2002), onde podem formar biofilmes (ANDREOTE et al., 2006) e utilizar o metabolismo metilotrófico como vantagem durante a colonização da planta hospedeira (SY et al., 2005).

Os membros do gênero *Methylobacterium* ocupam os mais diferentes habitat, incluindo solo, água, superfícies de folha, nódulos, grãos, ar entre outros. Estudos sugerem que o grau de associação *Methylobacterium*-planta varia de forte ou simbiótico (JOURAND et al., 2004) a fraco ou epifítico (OMER; TOMBOLINI; GERHARSON, 2004), incluindo também a faixa no 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; TOMBOLINI; GERHARSON, 2004), colonizando ativamente a superfície de folhas de diferentes hospedeiros (CHANPRAME; TODD; WIDHOLM, 1996), podendo colonizar endofiticamente hospedeiros como soja (HOLLAND; POLLACO, 1994; KUKLINSKY-SOBRAL, 2003), cana de açúcar, algodão (MADHAIYAN et al., 2006a), amendoim (MADHAIYAN et al., 2006b), citros (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002), pinus (PIRTTILA et al., 2000), eucalipto (ANDREOTE et al., 2009), crotalária (SY et al., 2001), *Catharanthus roseus*, tabaco (ANDREOTE et al., 2006) e morangos (ABANDA-NKPWATT et al., 2006). Foi encontrado também o gênero *Methylobacterium* em paredes de artérias (DA SILVA et al., 2006), mostrando que esse gênero deve apresentar uma grande plasticidade fenotípica, a qual permite ocupar diferentes nichos.

Na rizosfera de mostarda selvagem, foi observado por meio da análise do gene 16S *rRNA*, bactérias do gênero *Methylobacterium* tolerantes a metais pesados (Níquel, Cádmio, Cobalto, Zinco e Cromo) (IDRIS et al., 2006). Tem sido observado que *Methylobacterium* spp. podem estar associadas 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* foi capaz de degradar compostos derivados de furanos. Esses compostos são tóxicos e inviabilizam a posterior fermentação por outros microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae*. Van Aken, Yoon e Schnoor (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 PHA (polihidroxialconoatos) e PHB (polihidroxibutiratos), 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. *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; MIGUEZ; LEE, 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.

Na área agrícola, tem sido descrito que *M. nodulans* está envolvida na fixação de nitrogênio e na formação de nódulos (SY et al., 2001), sendo encontrada em diferentes espécies de fabáceas (MENNA et al., 2006), enquanto que outras espécies podem estar envolvidas na produção de fitohormônios citocinina ou interagindo com patógenos da planta hospedeira (HOLLAND, 1997; ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2006a). Cervantes-Martinez, Lopez-Diaz e Rodriguez-Garay (2004) atribuíram ao endófito *Methylobacterium* sp. maior atividade fotossintética pelo aumento no número de estômatos, no teor de clorofila e conteúdo de ácido málico. Além disso, foi descrita a comunicação bactéria-bactéria por meio da produção de acil-homoserina-lactonas (NIETO PENALTER et al., 2006; POMINI et al., 2009).

Embora *Methylobacterium* spp. não seja uma bactéria fitopatogênica, nem tampouco esteja associada à degradação de restos vegetais, tem sido observado que isolados pertencentes a esse gênero podem apresentar a capacidade de sintetizar pectinase e celulase, fato esse que sugere que essas bactérias podem, durante o processo de colonização da planta hospedeira, induzir resistência sistêmica em planta (MADHAIYAN et al., 2006b; LEE et al., 2006). Dessa forma, essas bactérias poderiam apresentar importante papel na manutenção do equilíbrio microbiológico na planta, evidenciando sua importância no desenvolvimento da planta hospedeira.

Em citros, foi observado que o gênero *Methylobacterium* é dominante no interior de ramos, e tendo em vista a variação na freqüência de isolamento, tem sido sugerido que apresenta interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da CVC (clorose variegada dos citros) (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; SANTOS, 2005). Os autores sugerem que *M. extorquens* poderia participar no desenvolvimento dos sintomas da CVC por favorecimento de *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2004). Por outro lado, a presença da bactéria endofítica *C. flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* em tecidos internos de plantas assintomáticas de citros, que hospedam *X. fastidiosa*, poderia estimular a produção de compostos ou elicitar, de alguma forma, um aumento na resistência destas plantas a *X. fastidiosa* ou redução no crescimento deste fitopatógeno vascular, observado *in vitro* por Lacava et al. (2004). Assim, este endófito poderia limitar o estabelecimento

de *X. fastidiosa* em plantas assintomáticas. Andreote et al. (2006) e Gai et al. (2009) mostraram que o endófito *M. mesophilicum* coloniza o xilema e pode ser transmitido de planta para planta por meio de insetos como *Bucephalogonia xanthopis*. Tendo em vista que o xilema é o nicho de *X. fastidiosa* e que cigarrinhas como *B. xanthopis* transmitem *X. fastidiosa*, pode ser sugerido que em diferentes momentos *M. mesophilicum* e *X. fastidiosa* interagem para estabelecimento na planta hospedeira. Contudo, são necessários mais estudos para se compreender os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos neste processo.

Esses resultados da interação *in vitro*, assim como os dados de isolamento de bactérias endofíticas de citros, realizados por Araújo et al. (2002) e Lacava et al. (2004), sugerem que a presença de *M. mesophilicum* e *X. fastidiosa* na planta hospedeira, pode ser resultado de uma interação onde *X. fastidiosa* pode ser inibida por *M. mesophilicum*. Nesse contexto, uma das hipóteses seria a inibição da formação de biofilme de *X. fastidiosa* por *M. mesophilicum* durante a colonização da planta. Dessa forma, estudos que visam avaliar a diversidade destas bactérias e estudar os genes envolvidos na interação bactéria-planta ou do endófito-patógeno podem favorecer o entendimento da interação *Methylobacterium*-planta-*X. fastidiosa*, bem como avaliar se existe especificidade do genótipo bacteriano à planta hospedeira, permitindo avaliar o impacto da mudança do genótipo e do trato cultural sobre a diversidade microbiana, assim como avaliar a influência do endófito sobre o patógeno vegetal.

Dessa forma, trabalhos têm sido desenvolvidos com isolados endofíticos, e conduzidos para avaliar a diversidade genética desses isolados (HIRAISHI et al., 1995; DA SILVA et al., 2006), tendo a finalidade de explorar de forma adequada a variabilidade genética existente, e a interação dos diferentes genótipos bacterianos com a planta hospedeira.

1.3 Importância da diversidade bacteriana

Os microrganismos procariotos representam a maior reserva de diversidade genética, além de apresentarem uma origem anterior aos protistas, metazoários, plantas e ocuparem um espaço muito maior na biosfera. Esses microrganismos possuem a maior biomassa e são responsáveis pela ciclagem de nutrientes, minimizando o impacto antropogênico no ambiente. Além disso, os microrganismos possuem o maior potencial para produção de produtos bioativos, enzimas, polímeros, antibióticos e muitas ferramentas de importância biotecnológica (VALERA, 2004).

Milhares de genomas presentes no solo, água ou sedimentos já foram seqüenciados permitindo o conhecimento de inúmeros genes e de possíveis genes ainda desconhecidos, os quais

podem permitir o entendimento da via de síntese de inúmeros antibióticos ou possíveis novos antibióticos ou alvos para esses. Um exemplo disso foi a descoberta da estreptomicina e outros antibióticos bacterianos em um experimento básico de taxonomia e ecologia de actinomicetos no solo (SCHOLOSS; HANDESAMAN, 2003).

Além da diversidade de espécies, existe a diversidade de genes dentro da mesma espécie. Segundo Boucher, Nesbo e Doolittle (2001), espécie genômica é definida como a compressão de todos os genes da linhagem caracterizada da espécie, que é dividido em dois componentes: (i) o "núcleo" dos genes presentes em pelo menos 95% das linhagens e (ii) um "grupo auxiliar" que pode ser encontrado em 1 a 95% das linhagens (genes menos freqüentes que 1% devem ser considerados "estrangeiros" ou em declínio). O "núcleo" é mantido nas espécies pelos eventos de especiação de "descendência vertical" e o "núcleo" não é o mesmo de uma espécie para outra. O "grupo auxiliar" não identifica a espécie, pois em cada linhagem será diferente, sendo um dos motivos a fácil transferência de genes desse grupo. Entretanto, os genes do "núcleo" podem ser trocados por "núcleos" de outros indivíduos ou genes do "grupo auxiliar", isso ocorre quando espécies adaptam a uma situação que torna os genes sempre necessários.

Dessa forma, tem sido observado que a diversidade bacteriana não é estática, sendo observada uma alta capacidade reprodutiva, com ciclos vitais muito curtos, o que leva a alta capacidade adaptativa, com rápida alteração no perfil dessas comunidades devido às alterações do ambiente (ABBY; DAUBIN, 2007). Além dessa grande capacidade em perpetuar a espécie, baseada na rápida reprodução e adaptação, a capacidade de adquirir DNA por transferência lateral de genes aumenta ainda mais a diversidade e conseqüentemente a adaptabilidade das bactérias aos ambientes terrestres (KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006).

As causas de variação intra-específica são em maior parte devido à aquisição (transferência lateral) ou perda de genes do que devido à mutação, para o gene *rRNA*, a ocorrência de transferência horizontal ainda não foi descrita, sendo portanto um ótimo gene para se estudar filogenia de grupos. Já para outros genes, com o gene *nif*H, a transferência lateral pode ter ocorrido durante o processo evolutivo de diferentes espécies (CANTERA; KAWASAKI; SEKI, 2004). Da mesma forma, segundo Heyer, Galchenk e Dunfield (2002), pela análise da filogenia, pode ocorrer transferência horizontal do gene *mxaF* entre bactérias que oxidam metano (MOB) do tipo II. Dessa forma, a transferência e recombinação intragênica dão uma certa arbitrariedade às

relações filogenéticas, sendo por esse motivo importante a escolha correta dos genes a serem utilizados.

1.4 Interação planta-microrganismos

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 N_2, acreditava-se que essa 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 a aptidão 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* genes super regulados e hiporegulados durante a interação com a planta hospedeira (OKINAKA et al., 2002). 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 essa 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 essa mudança poderia estar associada à manutenção da interação.

1.5 Análise da variabilidade genética

O gene 16S *rRNA* é considerado um cronômetro evolutivo, pois são genes com uma taxa de mutação mínima, visto que o produto da expressão é essencial para a vida do organismo. Além

disso, esses genes apresentam sítios de evolução rápida e outros de evolução lenta, permitindo a avaliação das relações filogenéticas tanto entre organismos filogeneticamente próximos como distantes (SCHOLOSS; HANDELSMAN, 2003).

A análise das seqüências do gene 16S *rRNA* é uma ferramenta com alta sensibilidade que possibilita a comparação entre genótipos de microrganismos não cultiváveis, os quais podem representar 99% dos microrganismos (fungos, bactérias e arqueias) dos diferentes ambientes (SCHOLOSS; HANDELSMAN, 2003; LAMBAIS et al., 2006).

O gene *mxaF* codifica a atividade da subunidade de desidrogenase do metanol (MDH), e é encontrado em todas os organismos metanotróficos, bem como em bactérias metilotróficas Gram negativas. Além disso, contem um sitio de atividade da enzima que é muito conservado, sendo fácil a construção de *primers* para a sua amplificação (MCDONALD; MURRELL, 1997).

Dessa forma, a utilização de vários genes conservados pode auxiliar no estudo das relações filogenéticas no gênero *Methylobacterium* e também no desenvolvimento de um sistema de detecção e quantificação dessa bactéria no ambiente.

1.6 Expressão gênica

1.6.1 O Microarranjo de DNA

O microarranjo de DNA ("*DNA microarray*") é uma técnica capaz de monitorar a expressão de genes, gerando dados simultâneos e rápidos. Essa tecnologia vem promovendo impactos significativos em pesquisas desenvolvidas nas áreas médicas e biológicas (SHOEMAKER; LINSLEY, 2002). O microarranjo de DNA tem sido empregado no estudo da expressão e regulação de genes (CARULLI et al., 1998; CHAUSSABEL; SHER, 2002); no estudo da comparação de genomas (LUO et al., 2009; GOERING et al., 2009) e na detecção de microrganismo no ambiente, inferindo a diversidade microbiana daquele ambiente (HAN et al., 2009) ou diagnosticando doenças em plantas (BOONHAM; TOMLINSON; MUMFORD, 2007). Essa técnica também contribui no estudo de sistemas biológicos que combinam seqüenciamento de DNA em larga escala, expressão gênica, proteômica e metabolômica com a finalidade de compreender os processos biológicos.

O uso de moléculas de ácido nucléico marcadas para investigar, por hibridação, moléculas de DNA aderidas a um suporte sólido, foi descrito primeiramente na década de 1970, entretanto, com a abordagem restrita gene a gene, o que limitava o uso da técnica ao estudo de funções

biológicas individuais relacionadas a poucos genes ou vias metabólicas para investigações mais globais da atividade celular (HOHEISEL, 2006). Os microarranjos exploram o princípio da complementaridade de bases dos ácidos nucléicos, ou seja, a capacidade de um DNA/RNA se hibridar especificamente a uma fita de DNA segundo sua seqüência de nucleotídeos. O desenvolvimento dessa tecnologia representou um novo e poderoso conjunto de ferramentas que possibilitou o entendimento de sistemas biológicos e organismos de maneira ampla, uma vez que permitiu a quantificação do nível de expressão de milhares de genes simultaneamente, de uma maneira compreensível e sistemática, vinculando o teste de hipóteses a resultados observados (HEID et al., 1996).

Os microarranjos são geralmente produzidos sobre um suporte inerte que pode ser uma lâmina de vidro ou membrana de nylon, que entre outras vantagens, permite efetiva imobilização de sondas em sua superfície e uma hibridação robusta da amostra alvo (CHEUNG et al., 1999). A produção do microarranjo inicia com a seleção das sondas que estarão em sua composição e posterior distribuição ordenada das sondas selecionadas em cima de uma lâmina, através de um robô (*arrayer*) de alta precisão. Esse robô recolhe alíquotas de microplacas de 96 ou 384 poços através de agulhas que trabalham simultaneamente. Cada agulha coleta e deposita 0,25-1,0 nL em cada lâmina de vidro, criando *spots* de aproximadamente 100-150 µm de diâmetro (até 200 µm), separados pela distância de aproximadamente 200-250 µm (medidos do centro de cada *spot*). Em geral, podem carregar até 10.000 pontos distribuídos em uma área de 2 cm x 7 cm.

Para análise comparativa de expressão gênica, amostras de cDNA marcado com fluoróforos distintos, provenientes de duas condições experimentais (controle e tratamento) são misturadas em quantidades equimolares e submetidas à hibridação com os *biochips*. Após a lavagem, estas lâminas são submetidas à leitura em um *scanner* óptico, onde são excitados em diferentes comprimentos de onda e as imagens de hibridação são geradas para cada fluoróforo independentemente (Figura 1.1) (BROWN; BOTSTEIN, 1999; DUGGAN et al., 1999).

A quantificação dos valores de intensidades de cada "*spot*" é feita por programas de computador, gerando um perfil da expressão gênica da célula permitindo acessar bancos de dados para se obter informações a respeito de cada gene. Os estudos de expressão gênica geram um montante enorme de dados, os quais devem ser integrados e avaliados de forma organizada e global, e para isso são utilizados pacotes de programas computacionais especializados, adaptados ao tratamento de quantidades maciças de dados.

Quando se identifica um grupo de genes com variação estatisticamente significativa na expressão, experimentos validatórios são necessários para confirmar as alterações observadas no perfil de expressão. A validação deve ser realizada preferencialmente por métodos com PCR quantitativa, Northern e Western blotting, citometria de fluxo, todos adequados à confirmação dos resultados prévios observados no perfil de expressão (D'AMBROSIO; GATTA; BONINI, 2005).

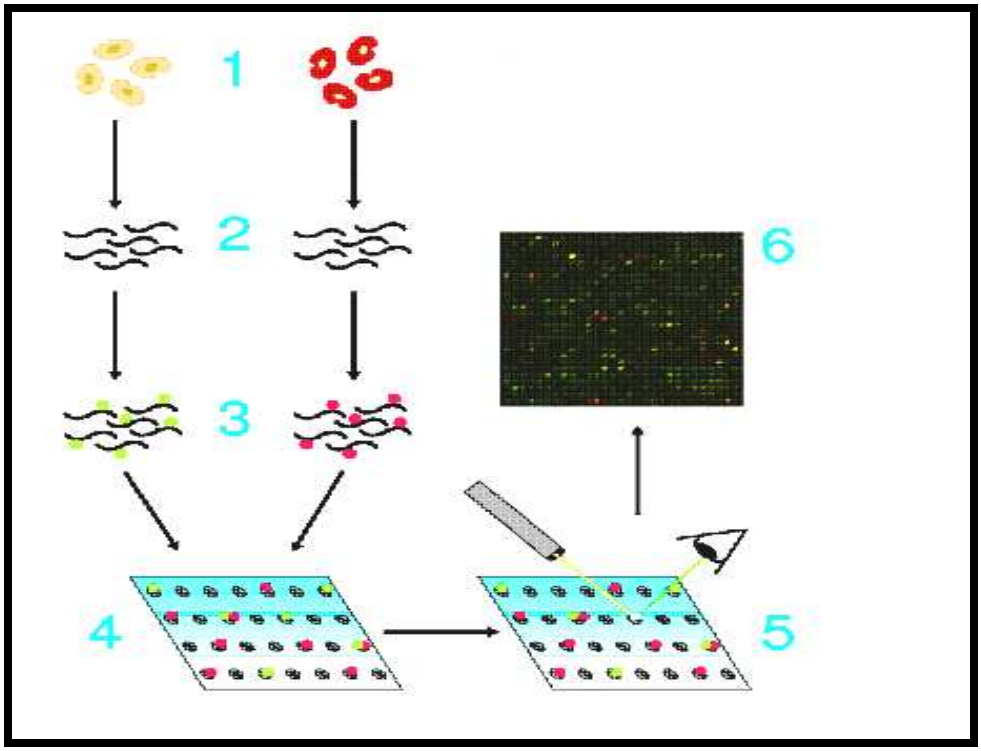

Figura 1.1 - Representação esquemática de hibridação competitiva em microarranjo de DNA. Amostras de RNA ou DNA extraídas das populações referência e teste são marcadas com diferentes fluoróforos e misturadas para hibridação em microarranjo. A imagem formada após a varredura em "*scanner*" óptico contém pontos verdes, vermelhos ou amarelos, correspondendo à hibridação com sondas marcadas com Cy3, Cy5 ou ambos na mesma proporção (http://www.fao.org)

Experimentos de hibridação feitos com *microchips* viabilizam a análise comparativa de milhares de genes em um único experimento, permitindo a categorização de todo um genoma em diferentes grupos, com variados graus de conservação entre espécies ou variedades. Essa abordagem para estudos de relações fenéticas entre organismos se denomina genômica comparativa (OLIVER, 2000). Através desse tipo de abordagem, podemos determinar entre organismos de uma mesma espécie, seqüências gênicas conservadas, ausentes ou multiplicadas, sempre comparando com as seqüências presentes no *biochip*. Há muitos estudos de comparação de genomas de diferentes espécies bacterianas como a comparação de isolados de *Xylella fastidiosa* provenientes de hospedeiros e regiões geográficas distintas (NUNES et al., 2003),

comparações de estirpes de *X. fastidiosa* patogênica (9a5c) e não patogênica (J1a12) evidenciando os genes relacionados a patogenicidade (KOIDE et al., 2004), de estirpes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolados de diferentes áreas de mineração na China (LUO et al., 2009), de isolados de *Staphylococcus aureus* extraídos de diferentes regiões e em diferentes tempos (GOERING et al., 2009).

A técnica do microarranjo pode também ser utilizada no estudo da interação bactéria-planta, tanto com bactérias patogênicas como aquelas benéficas às plantas. Becker et al. (2004) estudaram *Sinorhizobium meliloti* e avaliaram os níveis de expressão gênica em células de vida livre bem como aquelas em nódulos durante a fixação de nitrogênio. Já Van Rij et al. (2005) estudaram o efeito do ácido fusárico (FA) produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum* (agente causal da podridão da raiz) no nível de expressão gênica de *Pseudomonas chlororaphis* e observaram que este composto é capaz de inibir a expressão de genes relacionados à síntese de fenazina (PCN), um metabólico antifúngico. Okubo et al. (2007, 2010) analisaram, com a técnica de microarranjo, as rotas metabólicas na utilização de compostos com um, dois e mais carbono por *M. extorquens*.

No estudo de bactérias patogênicas, Okinaka et al. (2002) identificaram genes de virulência na bactéria fitopatogênica *Erwinia chrysanthemi* durante seu processo de colonização em violetas. Os autores verificaram que a maioria dos genes expressos durante o processo de infecção estão, provavelmente, associados a respostas de adaptação e não a patogenicidade ao hospedeiro. Em *Xylella fastidiosa*¸ patógeno de citros, diferentes trabalhos caracterizaram funções gênicas e rotas metabólicas envolvidas na virulência e formação de biofilme (SHI et al., 2007; SHI et al., 2009; DA SILVA NETO et al., 2008). A técnica do microarranjo permite uma visão geral da expressão gênica em determinada condição, fornecendo dados para estudos fisiológicos e bioquímicos. Neste caso, os genes transcritos devem ser comparados com as proteínas e metabólitos produzidos com a finalidade de compreender os processos biológicos, já que nem todo gene transcrito dará origem a uma proteína.

A introdução da tecnologia de microarranjos de DNA para o estudo da interação entre microrganismos e seus hospedeiros pode auxiliar na avaliação da expressão gênica bacteriana, permitindo o entendimento desta associação e sua possível aplicação biotecnológica.

1.6.2 PCR quantitativo

O PCR quantitativo (qPCR) ou PCR em tempo real foi desenvolvido com o objetivo de estimar o número de cópias de um gene de interesse (DOLKEN; SCHULER; DOLKEN, 1998; HIGUCHI et al., 1993). O qPCR é uma variação da técnica do PCR convencional que visa quantificar uma amostra de DNA ou RNA usando uma seqüência de *primer* específico, determinando assim o número de cópias de uma determinada seqüência de DNA ou RNA. Se determinada seqüência (DNA ou RNA) é abundante na amostra a amplificação é observada nos ciclos iniciais, se a seqüência é rara, a amplificação é observada nos ciclos mais tardios (HEID et al., 1996).

Este método tem sido utilizado para quantificar e estudar bactérias de importância clínica como *Listeria monocytogenes* (BASSLER et al., 1995), *Yersinia pestis* (HIGGINS et al., 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (DESJARDIN et al., 1998) e *Borrelia burgdoferi* (PAHL et al., 1999), bactérias fitopatogênicas como *X. fastidiosa* (OLIVEIRA et al., 2002), *Ralstonia solanacearum* (WELLER et al., 2000) e *Xanthomonas campestris* (CUBERO, GRAHAM, 2002) e para a bactéria endofítica *M. mesophilicum* (LACAVA et al., 2006), bem como para a quantificação da expressão de genes bacterianos (VANDECASTEELE et al., 2001) e fúngicos (SEMIGHINI et al., 2002). Além disso, devido ao fato de se poder quantificar o número de cópias de uma molécula de DNA ou RNA, esta técnica tem sido indicada para validar resultados obtidos por microarranjos de DNA e quantificação de genes no ambiente.

Há poucos estudos utilizando o PCR quantitativo para avaliar a expressão dos genes de interação microrganismo-planta. A maioria dos trabalhos avaliam os genes da planta em resposta a um microrganismo patogênico, sendo que é mais estudada a interação com fungos patogênicos como *Puccnia striiformis* f. sp. *tritici*, agente causal a ferrugem do trigo (WANG et al., 2010), *Sclerotinia sclerotiorum* que causa podridão em canola (WANG et al., 2009), *Pyrenophora teres* patógeno de cevada, causando mancha reticular (BOGACKI; OLDACH; WILLIAMS, 2008) entre outros. Há um menor número de trabalhos com bactérias que também priorizam o estudo da planta tais com o estudo de interação de *Ralstonia solanacearum* com batata (GAO et al., 2009) ou a validação do experimento de microarranjo que avalia os genes diferencialmente expressos em mandioca (*Manihot esculenta*) infectada *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (LOPEZ et al., 2005).

Referências

ABANDA-NKPWATT, D.; MUSCH, M.; TSCHIERSCH, 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, p.4025-4032, 2006.

ABBY, S.; DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends in Microbiology,** Cambridge, v.15, p.135-141, 2007.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; OVERBEEK, L.S.V.; ELSAS, J.D.V.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **National Research Council of Canada Research Press**, Ottawa, v.52, p.419-426, 2006.

ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, R.T.; SALLES, J.F.; MARCON, J.; LABATE, C.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culture-Independent Assessment of Rhizobiales-Related Alphaproteobacteria and the Diversity of Methylobacterium in the Rhizosphere and Rhizoplane of Transgenic Eucalyptus. **Microbial Ecology,** Menlo Park, v.57, p.82-93, 2009.

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

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.4906-4914, 2002.

ARAÚJO, W.L.; SARIDAKIS, H.O.; BARROSO, P.A.V.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; 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.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia Microbiana.** Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.117-138.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v.3, 2000. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/index.html>. Acesso em: 17 mar 2010.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W.L. Importância dos microrganismos endofíticos na Agricultura. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.11, p.333-371, 2003.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Eds.) **Fungi:** multifaceted microbes, New Delhi: CRC Press, 2007. p.189-207.

BASSLER, H.I.; FLOOD, S.J.A.; LIVAK, K.J.; MARMARO, J.; KNORR, R.; BATT, C.A. Use of fluorogenig probe in a PCR-base assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.61, p.3724-3728, 1995.

BECKER, A.; BERGÈS, H.; KROL, E.; BRUAND, C.; RÜBERG, S.; CAPELA, D.;LAUBER, E.; MEILHOC, E.; AMPE, F.; DE BRUIJN, F.J.; FOURMENT, J.; FRANCEZ-CHARLOT, A.; KAHN, D.; KÜSTER, H.; LIEBE, C.; PÜHLER, A.; WEIDNER, S.; BATUT, J. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.17, p.292-303, 2004.

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**, Amsterdam, v.231, p.197-204, 2004.

BOGACKI, P.; OLDACH, K.H.; WILLIAMS, K.J. Expression profiling and mapping of defense response genes associated with the barley-*Pyrenophora teres* incompatible interaction. **Molecular Plant Pathology**, London, v.9, p.645-60, 2008.

BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; MUMFORD, R. Microarrays for rapid identification of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.45, p.307-328, 2007.

BOUCHER, Y.; NESBO, C.L.; DOOLITTLE, W.F. Microbial genomics: dealing with diversity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.4, p.285-289, 2001.

BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new word of the genome with DNA microarray. **Nature Genetics (Supplement)**, New York, v.21, p.33-37, 1999.

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

CANTERA, J.J.L.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. The nitrogen-fixing gene (*nif*H) of *Rhodopsseudomonas palustris*: a case of lateral gene transfer? **Microbiology**, Reading, v.150, p.2237-2246, 2004.

CARULLI, J.P.; ARTINGER, M.; SWAIN, P.M.; ROOT, C.D.; CHEE, L.; TULING, C.; GUERIN, J.; OSBORNE, M.; STEIN, G.; LIAN, J.; LORNEDICO, P.T. High throughput analysis of differential gene expression. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.30, p.286-296, 1998.

CERVANTES-MARTINEZ, J.; LOPEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ-GARAY, B. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, Amsterdam, v.166, p.889-892, 2004.

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.

CHAUSSABEL, D.; SHER, A. Mining microarray expression data by literature profiling. **Genome Biology**, London, v.3, p.55.1-55.16, 2002.

CHEUNG, V.G.; MORLEY, M.; AGUILAR, F.; MASSIMI, A.; KUCHERLAPATI, R.; CHILDS, G. Making and reading microarrays. **Nature Genetics (Supplement**), New York, v.21, p.15-19, 1999.

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**, Baltimore, v.70, p.3213-3221, 2004.

CUBERO, J.; GRAHAM J. H. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas c*ausing canker in citrus species and design of new *primer*s for their identification by PCR. **Applied and Environmental Microbiology,** Baltimore, v.68, p.1257-1264, 2002.

D'AMBROSIO, C.; GATTA, L.; BONINI, S. The future of microarray technology: networking the genome search. **Allergy**, Copenhagen, v.60, p.1219-1226, 2005.

DA SILVA, R.M.; CAUGANT, D.A.; ERIBE, E.R.K.; AAS, J.A.; LINGAAS, P.S.; GEIRAN, O.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. **Journal of Vascular Surgery**, Saint Louis, v.44, p.1055-1060, 2006.

DA SILVA NETO, J.F.; KOIDE, T.; ABE, C.M.; GOMES, S.L.; MARQUES, M.V. Role of sigma54 in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *Xylella fastidiosa*. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.189, p.249-261, 2008.

DESJARDIN, L.E.; CHEN, Y.; PERKINS, M.D.; TEIXEIRA, L.; CAVE, M.D.; EISENNACH, K.D. Comparison of the ABI 7700 system (Taqman) and competitive PCR for quantification of IS 6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p.1964-1968, 1998.

DOLKEN, L.; SCHULER, F.; DOLKEN, G. Quantitative detection of t (14;18)-positive cell by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. **Biotechniques**, Natick, v.6, p.1058-1064, 1998.

DORONINA, N.V.; TROTSENKO, Y.A.; KUZNETSOV, B.B.; TOUROVA, T.P.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. *Methylobacterium suomiense* sp. nov. and *Methylobacterium lusitanum* sp. nov., aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.52, p.773-776, 2002.

DUGGAN, D.J.; BITTNER, M.; CHEN, Y.; MELTZER, P.; TRENT, J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nature Genetics (Supplement)**, New York, v.21, p.10-14, 1999.

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

FITZGERALD, K.A.; LIDSTROM, M.E. Overexpression of a heterologous protein, haloalkane dehalogenase, in a poly-betahydroxybutyrate-deficient strain of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.81, p.263-268, 2003.

GAI, C.S.; LACAVA, P.T.; QUECINE, M.C.; AURIAC, M.C.; LOPES, J.R.S.; ARAÚJO, W.L.; MILER, T.A.; AZEVEDO, J.L. Transmission of *Methylobacterium mesophilicum* by *Bucephalogonia xanthophis* for Paratrangenic Control Strategy of Citrus Variegated Chlorosis. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v.47, p.448-454, 2009.

GAO, G.; JIN, L.P.; XIE, K.Y.; QU, D.Y. The potato StLTPa7 gene displays a complex Ca-associated pattern of expression during the early stage of potato-*Ralstonia solanacearum* interaction. **Molecular Plant Pathology,** London**,** v.10, p.15-27, 2009.

GOERING, R.V.; LARSEN, A.R.; SKOV, R.; TENOVER, F.C.; ANDERSON, K.L.; DUNMAN, P.M. Comparative genomic analysis of European and Middle Eastern community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CC80:ST80-IV) isolates by high-density microarray. **Clinical Microbiology and Infection**, Nottingham, v.15, p.748-55, 2009.

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**, 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.

HAN, B.; CHEN, Y.; ABELL, G.; JIANG, H.; BODROSSY, L.; ZHAO, J.; MURRELL, J.C.; XING, X.H. Diversity and activity of methanotrophs inalkaline soil from a Chinese coalmine. **FEMS Microbiology Ecology,** Amsterdam, v.70, p.40-51, 2009.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIANS, P.M. Real Time quantitative PCR. **Genome Research**, Woodbury, v.6, p.986-994, 1996.

HEYER, J.; GALCHENK, V.F.; DUNFIELD, P.F. Molecular phylogeny of type II methaneoxidizingbacteria isolated from various Environments. **Microbiology,** Reading, v.148, p.2831-2846, 2002.

HIGGINS, J.A.; EZZELL, J.; HINNEBUSCH, B.J.; SHIPLEY, M.; HENCHAL, E.A.; IBRAHIN, M.S. 5' nuclease PCR assay to detect *Yersinia pestis*. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p.2284-2288, 1998.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplifications reactions. **Bio/Technology**, New York, v.11, p.1026-1030, 1993.

HIRAISHI, A.; FURUHATA, K.; MATSUMOTO, A.; KOIKE, K.A.; FUKUYAMA, M.; TABUCHI, K. Phenotypic and Genetic Diversity of Chlorine-Resistant *Methylobacterium* Strains Isolated from Various Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.61, p.2099-2107, 1995.

HOHEISEL, J.D. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. **Nature Review Genetics**, London, v.7, p.200-210, 2006.

HOLLAND, M.A. *Methylobacterium* and plants. Recent Research Developments in **Plant Physiology**, Rockville, v.1, p.207-213, 1997.

HOLLAND, M.A.; POLACCO, J.C. PPFMs and other contaminants: is there more to plant physiology than just plant? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.45, p.197-209, 1994.

IDRIS, R.; KUFFNER, M.; BODROSSY, L.; PUSCHENREITER, M.; MONCHY, S.; WENZEL, W.W.; SESSITSCH, A. Characterization of Ni-tolerant methylobacteria associated with the hyperaccumulating plant *Thlaspi goesingense* and description of *Methylobacterium goesingense* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.29, p.634-644, 2006.

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**, Reading, v.54, p.2269-2273, 2004.

KATO, Y.; ASAHARA, M.; GOTO, K.; KASAI, H.; YOKOTA, A. *Methylobacterium persicinum* sp. nov., *Methylobacterium komagatae* sp. nov., *Methylobacterium brachiatum* sp. nov., *Methylobacterium tardum* sp. nov. and *Methylobacterium gregans* sp. nov., isolated from freshwater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, p.1134-1141, 2008.

KOIDE, T.; ZAINI, P.A.; MOREIRA, L.M.; VÊNCIO, R.Z.N.; MATSUKUMA, A.Y.; DURHAM, A.M.; TEIXEIRA, D.C.; EL-DORRY, H.; MONTEIRO, P.B.; DA SILVA, A.C.R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DA SILVA, A.M.; GOMES, S.L. DNA Microarray-Based Genome Comparison of a Pathogenic and a Nonpathogenic Strain of *Xylella fastidiosa* Delineates Genes Important for Bacterial Virulence. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.186, p.5442-5449, 2004.

KONSTANTINIDIS, K.T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied and Environmental Microbiology,** Baltimore, v.72, p.7286-7293, 2006.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

LACAVA, P.T.; LI, W.B.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; HARTUNG, J.S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.65, p.535-541, 2006.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. **Science**, Washington, v.312, p.1917, 2006.

LEE, H.S.; MADHAIYAN, C.W.K.; CHOI, S.J.; CHUNG, K.Y.; SA, T.M. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N_2-fixing methylotrophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.42, p.402-408, 2006.

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

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**, Berlin, v.64, p.125-131, 2004.

LOPEZ, C.; SOTO, M.; RESTREPO, S.; PIÉGU, B.; COOKE, R.; DELSENY, M.; TOHME, J.; VERDIER, V. Gene expression profile in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis infection in cassava using a cDNA microarray. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.57, p.393-410, 2005.

LUO, H.; SHEN, L.; YIN, H.; LI, Q.; CHEN, Q.; LUO, Y.; LIAO, L.; QIU, G.; LIU, X. Comparative genomic analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains using the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 whole-genome oligonucleotide microarray. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.55, p.587-598, 2009.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Environmental and Experimental Botany,** Oxford, v.57, p.168-176, 2006a.

MADHAIYAN, M.; SURESH REDDY, B.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM S.P.; SA, T.M. 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, 2006b.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; KWON, S.W.; SA, T.M. *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p.22-27, 2009.

MAHAFFEE, W.F.; BAUSKE, E.M.; VAN VUURDE, J.W.; VAN DER WOLF, J.M.; VAN DEN BRINK, M.; KLOEPPER, 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**, Baltimore, v.63, p.1617-1622, 1997.

MCDONALD, I.R.; MURRELL, J.C. The Methanol Dehydrogenase Structural Gene *mxaF* and Its Use as a Functional Gene Probe for Methanotrophs and Methylotrophs. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p.3218-3224, 1997.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S *rRNA* gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology,** Stuttgart, v.29, p.315-32, 2006.

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.

MISAGUI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Lancaster, v.80, p.808-811, 1990.

MOY, M.; LI, H.M.; SULLIVAN, R.; WHITE JÚNIOR, J.F.; BELANGER, F.C. Endophytic fungal β-1,6-glucanase expression in the infected host grass. **Plant Physiology**, Rockville, v.130, p.1298-1308, 2002.

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.

NIETO PENALVER, 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 unsaturated side chain under methylotrophic growth conditions**. FEBS Letters**. Amsterdam, v.580, p.561-567, 2006.

NISHIO, T.; YOSHIKURA, T.; ITOH, H. Detection of Methylobacterium species by 16S *rRNA* gene-targeted PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p.1594-1597, 1997.

NUNES, L.R.; ROSATO, Y.B.; MUTO, N.G.; YANAI, G.M.; SIKLVA, V.S.; LEITE, D.B.; GONÇALVES, E.R.; SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; LOPES, S.A.; COSTA DE OLIVEIRA, R. Microarray Analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. **Genome Research**, Woodbury, v.13, p.570-578, 2003.

OKINAKA, Y.; YANG, C.H.; PERNA, N.T.; KEEN, N.T. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.15, p.619-629, 2002.

OKUBO, Y.; SKOVRAN, E.; GUO, X.; SIVAM, D.; LIDSTROM, M.E. Implementation of Microarrays for *Methylobacterium extorquens* AM1. **A journal of Integrative Biology**, Larchmont, v.11, p.325-340, 2007.

OKUBO, Y.; YANG, S.; CHISTOSERDOVA, L.; LIDSTROM, M.E. Alternative Route for Glyoxylate Consumption 1 During Growth on Two-carbon Compounds by *Methylobacterium extorquens* AM1. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.192, p.1813-1823**,** 2010.

OLIVER, S.G. Comparative and functional genomics. **Yeast**, Chichester, v.17, n.1, p.6, 2000.

OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M.A.; SEMIGHINI, C.P.; ARAÚJO, W.L.; GOLDMAN, G.H.; MACHADO, M.A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. **Phytopathology**, Lancaster, v.92, p.1048-1054, 2002.

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.

PAHL, A.; KUHLBRANDT, U.; BRUNE, K.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSNER, A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.37, p.1958-1963, 1999.

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

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**, Baltimore, 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**, Oxoford, v.25, p.284-288, 1997.

POMINI, A.M.; CRUZ, P.L.R.; GAI, C.; ARAÚJO, W.L.; MARSAIOLI, A.J. Long-Chain Acyl-Homoserine Lactones from *Methylobacterium mesophilicum:* Synthesis and Absolute Configuration. **Journal of Natural Products,** Pittsburgh, v.72, p.2125-2129, 2009.

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

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

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.

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.

SANTOS, L.C. **Produção de bacteriocinas por endófitos de citros e caracterização da endoficina de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofítico.** 2005. 121p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SEMIGHINI, C.P.; MARINS, M.; GOLDMAN, M.H.S.; GOLDMAN, G.H. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *Atr* genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.1351-1357, 2002.

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

SHI, X.Y.; DUMENYO, C.K.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; AZAD, H.; COOKSEY, D.A. Characterization of regulatory pathways in *Xylella fastidiosa*: genes and phenotypes controlled by *alg*U. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.73, p.6748-6756, 2007.

SHI, X.Y.; DUMENYO, C.K.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; AZAD, H.; COOKSEY, D.A. Characterization of regulatory pathways in *Xylella fastidiosa*: genes and phenotypes controlled by *gacA.* **Applied and Environmental Microbiology,** Baltimore, v.75, p.2275-2283, 2009.

SHOEMAKER, D.D.; LINSLEY, P.S. Recent development in DNA microarrays. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.5, p.334-337, 2002.

SCHOLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v.14, p.303-310, 2003.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil and Ecology**, Amsterdam, v.15, p.183-190, 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. Methylotrophic *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. Methylotrophic Metabolism Is Advantageous for *Methylobacterium extorquens* during Colonization of *Medicago truncatula* under Competitive Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, p.7245-7252, 2005.

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

TROTSENKO, Y.A.; IANOVA, E.G.; DORONINA, N.V. Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. **Microbiology**, Reading, v.70, p.623-632, 2001.

VALERA, F.R. Environmental genomics, the big picture? **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.231, p.153-158, 2004.

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, metane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoids* x *nigra* DN34). **Microbiology**, Reading, 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 deltoids* x *nigra* DN34). **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.70, p.508-517, 2004b.

VANDECASTEELE, S.J.; PEETERMANS, W. E.; MERCKX, R.; VAN ELDERE, J. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with TaqMan quantitative PCR during *in vitro* growth and under different conditions. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.183, p.7094-7101, 2001.

VAN DIEN, S.J.; OKUBO, Y.; HOUGH, M.T.; KOROTKOVA, N.; TAITANO, T.; LIDSTROM, M.E. Reconstruction of C3 and C4 metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. **Microbiology**, Reading, v.149, p.601-609, 2003.

VAN RIJ, T.; GIRARD, G.; LUGTENBERG, B.J.J.; BLOEMBERG, G.V. Influence of fusaric acid on phenazine-1-carboxamide synthesis and gene expression of *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391E. **Microbiology**, Reading, v.151, p.2805-2814, 2005.

WANG, X.; LIU, W.; CHEN, X.; TANG, C.; DONG, Y.; MA, J.; HUANG, X.; WEI, G.; HAN, Q.; HUANG, L.; KANG, Z. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. **BioMed Central Plant Biology**; London, v.10, 2010. Disponível em: <http://www.biocentral.com/1471-2229/10/9>. Acesso em: 22 mar. 2010.

WANG, X.; LI, Q.; NIU, X.; CHEN, H.; XU, L.; QI, C. Characterization of a canola C2 domain gene that interacts with PG, an effector of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Experimental Botany**, Oxoford, v.60, p.2613-2620, 2009.

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, p.385-396, 2005.

WELLER, A.; ELPHINSTONE, J.G.; SMITH, N.C.; BOONHAM, N.; STEAD D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.66, p.2853-2858, 2000.

WEON, H.Y.; KIM, B.Y.; JOA, J.H.; SON, J.A.; SONG, M.H.; KWON, S.W.; GO, S.J.; YOON, S.H. *Methylobacterium iners* sp. nov. and *Methylobacterium aerolatum* sp. nov., isolated from air samples in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, p.93-96, 2008.

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**, Baltimore, v.73, p.211-218, 2006.

2. ANÁLISE FILOGENÉTICA (16S *rRNA*) E FUNCIONAL (*mxaF*) DE *Methylobacterium* spp. ENDOFÍTICA

Resumo

O gênero *Methylobacterium* é constituído de bactérias PPFM (*pink-pigmented facultative methylotrophic*) e é um grupo bacteriano de grande importância na associação com a planta, é capaz de nodular as raízes das plantas, fixar nitrogênio, produzir citocinina e enzimas envolvidas na indução da resistência sistêmica da planta tais como pectinase e celulase. A diversidade de *Methylobacterium* spp. isolada de diferentes plantas foram analisadas pela comparação das seqüências do gene estrutural (16S *rRNA*) e funcional (*mxaF*), que codifica uma subunidade da enzima metanol desidrogenase. Os resultados mostram uma resposta adaptativa diferente de *Methylobacterium* spp. nas diferentes plantas. Porém, a clusterização de isolados de um mesmo hospedeiro foi observado em um subgrupo de isolados, sugerindo que essa diversidade se deve a eventos estocásticos, devido à seleção de genótipos bacterianos por meio da planta hospedeira.

Palavras-chave: Diversidade; Metilotróficas; Interação bactéria-planta

PHYLOGENETIC (16S *rRNA*) AND FUNCTIONAL (*mxaF*) ANALISYS OF ENDOPHITIC *Methylobacterium spp*.

Abstract

The genus *Methylobacterium*, constituted by the PPFMs (*pink-pigmented facultative methylotrophic*) bacteria, is an important plant associated bacterial group, where it is able to nodulate plants, fix nitrogen, produce cytokines and enzymes involved in induction of systemic resistance such as pectinase and cellulase. The diversity of *Methylobacterium* spp. isolated from different plants was analyzed by a comparative approach of sequences from structural (16S *rRNA*) and functional (*mxaF* gene, which codifies for a subunit of the enzyme methanol dehydrogenase) ubiquitous genes. Results show differential adaptive responses of *Methylobacterium* spp. in distinct plant species. However, the clustering according to the host plant was observed for a subset of isolates, suggesting that this diversity could be driven by stochastic events, due to the bacteria genotype selection by the host plant.

.

Keywords: Diversity; Methylotrofics; Plant bacteria-interaction

2.1 Introdução

Bactérias do gênero *Methylobacterium*, pertencentes à classe α-proteobactéria, têm a capacidade de utilizar metanol como única fonte de carbono e são metilotróficas facultativas. São capazes de converter compostos C_1 em produtos importantes, como biopolímeros, ácidos orgânicos, coenzimas e vitaminas. Essas bactérias também possuem um papel importante no ciclo de carbono (JEONG et al., 2002).

O metano se tornou o gás mais importante do efeito estufa, visto que a concentração de deste gás na atmosfera tem aumentado em uma taxa de 1% ao ano, além do fato desta molécula apresentar uma capacidade maior que o CO_2 de reter o calor. Neste contexto, áreas com água contribuem com cerca de 15 a 20% do total de metano emitido para a atmosfera a cada ano (MCDONALD; KENNA; MURRELL, 1995). O primeiro passo para a oxidação microbiana do metano a gás carbônico é a conversão de metano a metanol pela enzima monooxygenase metano (MMO) (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005). O gene *mmoX*, que codifica a subunidade α da hydroxylase do sMMO, tem sido usado para estudar a diversidade de metanotróficos que contem sMMO. Enquanto o gene *mxaF*, que codifica a atividade da subunidade de dehydrogenase do metanol (MDH), tem sido usada para estudar a diversidade de bactérias metilotróficas. MDH é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ com dois sítios de atividade, contendo um grupo prostético e um átomo de cálcio (ZHANG; LIDSTROM, 2003). O metanol produzido pela enzima MMO é oxidado pela enzima MDH a formaldeído, o qual é o intermediário principal no metabolismo metilotrófico, como mostra a Figura 2.1 (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005). O formaldeído é consumido dentro da célula, assimilado em biomassa no ciclo da serina ou oxidado a CO_2 gerando energia (ZHANG; LIDSTROM, 2003).

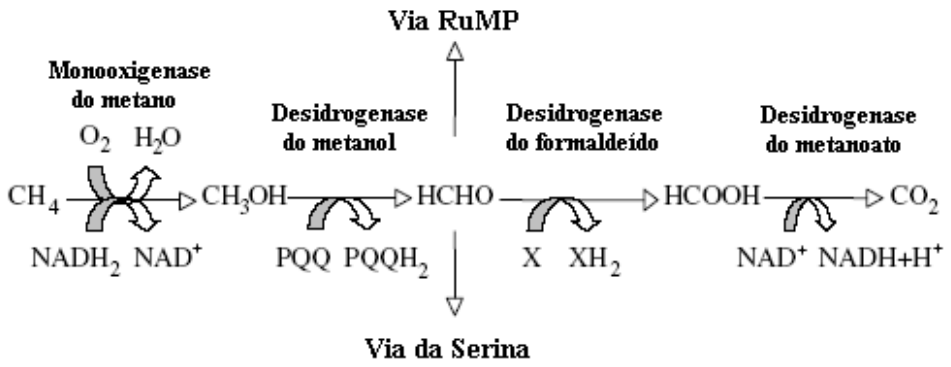

Figura 2.1 - Ciclo da oxidação microbiana do metanol e assimilação do formaldeído (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005)

Espécies do gênero *Methylobacterium* foram isoladas de diferentes plantas hospedeiras (PIRTILLA et al., 2000, SY et al., 2001, ARAÚJO et al., 2002, YATES et al., 2007, FERREIRA et al., 2008, ANDREOTE et al., 2009) e de diferentes ambientes marinhos com o oceano Pacífico (WANG et al., 2004), a Antártica (MOOSVI et al., 2005), o fundo mar de Kuroshima Knoll, no Japão (INAGAKI et al., 2004), e posteriormente caracterizada por meio da seqüência parcial do gene 16S *rRNA* e *mxaF*. Sedimentos marinhos em alto mar são conhecidos por serem ambientes pobres em matéria orgânica, em metano e em oxigênio, escuros e gelados (1-2°C), e nessas condições, as bactérias metilotróficas são os principais componentes nesse ecossistema extremo, devido ao seu papel essencial na ciclagem do carbono (WANG et al., 2004). Esses estudos permitem a melhor compreensão do papel desses microrganismos no ciclo do metano e observação da oxidação do metano por comunidades microbianas aeróbicas e anaeróbicas.

A vantagem de se utilizar genes funcionais como o gene *mxaF* juntamente com o gene ribossomal (16S *rRNA*) no estudo da diversidade bacteriana é que eles permitem avaliar a diversidade funcional dentro do ambiente estudado, determinando a atividade da bactéria em diferentes ambientes e seu papel no metabolismo de compostos importantes nos ciclos biogeoquímicos (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005).

Em plantas, *Methylobacterium* spp. apresenta diferentes funções benéficas a planta hospedeira tais como fixação de nitrogênio (SY et al., 2001; YATES et al., 2007), produção de citocinina ou interação com patógenos de plantas (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2006a, 2006b). Além disso, essa bactéria apresenta a capacidade de sintetizar enzimas que degradam a parede celular, como pectinas e celulase, espécies desse gênero

não são conhecidos como fitopatógenos. Isso pode indicar que essa bactéria durante a colonização da planta pode induzir resistência sistêmica a planta hospedeira (MADHAIYAN et al., 2006a, 2006b). Com isso, esse gênero bacteriano pode determinar a comunidade bacteriana associada a planta (ANDREOTE et al., 2006; KNIEF et al., 2010), influenciando o desenvolvimento vegetal.

De acordo com análises recentes do gênero *Methylobacterium*, 34 espécies foram descritas (KATO et al., 2008; WEON et al., 2008; MADHAIYAN et al., 2009), a maioria nos últimos anos, indicando que parte da diversidade desse gênero é ainda desconhecida. Portanto, estudos envolvendo isolados de plantas do gênero *Methylobacterium* pode contribuir para o conhecimento desse grupo. Considerando resultados prévios, os quais mostram que o metabolismo metilotrófico, com papel fundamental da expressão do gene *mxaF*, é necessário para *M. extorquens* durante a colonização da planta hospedeira (SY et al., 2005), sugerindo que pode ocorrer a seleção de genótipos metilotróficos durante a interação *Methylobacterium*-planta.

Estudos de genômica comparativa baseados em hibridação de DNA genômico de diferentes isolados em um *chip* com todo o genoma pode fornecer informações sobre aquisição, perdas e evolução gênica em nível de seqüência de nucleotídeo. Além disso, pode mostrar a evolução, a diversidade genômica, a plasticidade e o potencial genético de virulência bacteriana (SAUNDERS et al., 2004; DORRELL; HINCHLIFFE; WREN, 2005). Nesse estudo foi avaliada a diversidade genética de 60 estirpes de *Methylobacterium* spp. isoladas de oito diferentes plantas hospedeiras utilizando a análise da seqüência do gene 16S *rRNA* e do gene *mxaF*, buscando entender a filogenia do grupo de *Methylobacterium* associada a plantas assim como o papel dessa diversidade na interação com a planta.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Isolados de *Methylobacterium*

Foram utilizados 60 isolados endofíticos do gênero *Methylobacterium* spp. (Tabela 2.1), pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismo (Esalq, Usp, Piracicaba). Estes isolados foram obtidos de *Coffea arabica* (8 isolados), *Saccharum* spp. (8 isolados), *Citrus* spp. (18 isolados), *Eucalyptus* spp. (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophyla*) (7 isolados), *Borreria verticillata* (12 isolados) e *Capsicum annuum* (7 isolados). Todos os isolados foram crescidos em meio CHOI 3 (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998) por 72 horas a 28°C a 150 rpm.

2.2.2 Extração de DNA total

Após o cultivo foi feita a extração de DNA total, as bactérias foram crescidas em 5 mL de meio CHOI 3 (1,5 g de $(NH_4)_2SO_4$; 1,305 g de KH_2PO_4; 4,02 g de $Na_2HPO_4.7H_20$; 0,45 g de $MgSO_4.7H_20$; 2,0 g de $CaCl_2$. H_20; 2,0 g de $FeSO_4.7$ H_20; 0,5 g de $MnSO_4$. H_20; 0,26 g de $Na_2MoO_4.2$ H_20; 80 mg de $CoCl_2.6H_20$; 60 mg de H_3BO_3, 125 mM de metanol em 1000 mL) líquido por 72 horas (150 rpm). Em seguida 2 mL da cultura foram centrifugados e lavados em tampão TE (1M de Tris-HCl pH 8 e 10M de EDTA). Ao precipitado de células foram adicionados 500 μL de TE, 30 μL de SDS 10% e 0,1 g de sílica (Sigma) e agitada em homogeneizador de células para romper a parede celular, deixando o DNA livre. Então, foi adicionando 1 volume de fenol, homogeneizado por inversão e centrifugando a 14000 g por 5 minutos.

O sobrenadante foi coletado, acrescentado um volume de clorofane (fenol 1:1 Clorofórmio) e centrifugado novamente a 14000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente coletado e a ele adicionado um volume de clorofórmio e novamente centrifugado a 14000 g por 5 minutos. Por fim, a fase aquosa foi coletada, adicionando um volume de isopropanol e 0,6 volume acetato de sódio, incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada a 14000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o DNA lavado com Etanol 70% gelado e secado a 37°C por 40 minutos. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (1,0%).

Tabela 2.1 - Identificação de isolados de *Methylobacterium* spp. de diferentes plantas hospedeiras a partir da seqüência parcial dos genes 16S *rRNA* e *mxaF*

Isolado	Planta hospedeira	Local do isolamento	Identificação*	Grupo Filogenético	
				16 S *rRNA*	*mxaF*
TC3-5	Café	Piracicaba, SP	*M. populi*	5	IV
TC3-6	Café	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	5	IV
TC3-7	Café	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
TC3-10	Café	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
TC3-11	Café	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
TC3-13	Café	Piracicaba, SP	*M. extorquens*	5	IV
TC3-14	Café	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
MC3-1	Café	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	1c	II
F4	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	1c	I
F5	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*M. fujisawaense*	3	I
F7	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
F8	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
F9	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
F10	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	1c	I
F11	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	1c	I
D5	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
AR1.6/1	Citros	Novais, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
AR1.6/2	Citros	Novais, SP	*Methylobacterium sp.*	5	IV
AR1.6/8	Citros	Novais, SP	*Methylobacterium sp.*	5	IV
AR5/1	Citros	Colina, SP	*Methylobacterium sp.*	2	IV
AR5.1/5	Citros	Colina, SP	*Methylobacterium sp.*	2	I
ER1/21	Citros	Novais, SP	*M. mesophilicum*	4	V
ER1.6/2	Citros	Novais, SP	*Methylobacterium sp.*	5	III
SR1.6/2	Citros	Novais, SP	*Methylobacterium sp.*	1c	III
SR1.6/4	Citros	Novais, SP	*M. radiotolerans*	1b	II
SR1.6/6	Citros	Novais, SP	*Methylobacterium sp.*	4	VI
SR1.6/9	Citros	Novais, SP	*Methylobacterium sp.*	1c	I
SR1.6/13	Citros	Novais, SP	*Methylobacterium sp.*	2	IV
SR3/27	Citros	Catanduva, SP	*Methylobacterium sp.*	3	IV
SR5/3	Citros	Colina, SP	*M. fujisawaense*	3	IV
SR5/4	Citros	Colina, SP	*M. fujisawaense*	3	IV
PR1/3	Citros	Novais, SP	*M. mesophilicum*	4	V
PR3/10	Citros	Catanduva, SP	*Methylobacterium sp.*	2	VI
PR3/11	Citros	Catanduva, SP	*Methylobacterium sp.*	2	IV
TP2-1	Pimentão	Piracicaba, SP	*M. fujisawaense*	3	I
TP4-1	Pimentão	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*		IV
TP4-2	Pimentão	Piracicaba, SP	*M. hispanicum*	6	IV
TP5	Pimentão	Piracicaba, SP	*M. hispanicum*	6	IV
TP7	Pimentão	Piracicaba, SP	*Bactéria metilotrofica não cultivável*	1a	II
TP8	Pimentão	Piracicaba, SP	*M. hispanicum*	6	IV
MP2-3	Pimentão	Piracicaba, SP	*M. hispanicum*	6	IV
Aw04	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*Methylobacterium sp.*	6	VI
Aw05	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. radiotolerans*	1a	II
Aw06	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*Methylobacterium sp.*	1c	II
Aw08	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. radiotolerans*	1a	II
Aw09	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. radiotolerans*	1b	II
Aw10	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. radiotolerans*	1a	II
Aw11	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. radiotolerans*	1b	II
Aw12	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. radiotolerans*	1a	II
Aw13	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. radiotolerans*	1b	II
Aw15	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. radiotolerans*	1a	II
Aw16	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. hispanicum*	6	IV
Aw18	*Borreria verticillata*	Recife, PE	*M. radiotolerans*	1a	II
R1E	*Eucalyptus spp.*	Piracicaba, SP	*Methylobacterium spp.*	3	V
R2E	*Eucalyptus spp.*	Piracicaba, SP	*Methylobacterium spp.*	2	V
R3E	*Eucalyptus spp.*	Piracicaba, SP	*Methylobacterium spp.*	7	I
R10E	*Eucalyptus spp.*	Piracicaba, SP	*Methylobacterium spp.*	1c	I
R12E	*Eucalyptus spp.*	Piracicaba, SP	*Methylobacterium spp*	2	I
R14E	*Eucalyptus spp.*	Piracicaba, SP	*Methylobacterium spp.*	4	I
R16E	*Eucalyptus spp.*	Piracicaba, SP	*Methylobacterium spp.*	3	I

*Identificação baseada no banco de dados RDP (http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm) e na análise filogenética desse estudo

2.2.3 Análise da variabilidade genética de *Methylobacterium spp.*

2.2.3.1 Amplificação dos fragmentos dos genes 16S *rRNA* e *mxaF*

A variabilidade genética foi avaliada por meio da amplificação dos genes 16S do *rRNA* com os *primers* R1387 (5´ - CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3´) e P027F (5´-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3´) para a subunidade 16S do *rRNA*. Alternativamente, foi realizado a PCR direto de colônia com o volume de 50 μL contendo tampão da enzima 1 X, 3,75 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μM de cada *primer*, 0,1 $U.\mu L^{-1}$ de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). Foi realizada uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguidas de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 62,5°C e 1minutos à 72°C. Em seguida, a extensão final foi realizada por 7 minutos a 72°C.Após a amplificação, o produto de PCR foi avaliado em eletroforese em gel de agarose (1,2%).

A variabilidade genética foi avaliada por meio da amplificação do gene *mxaF*, a qual foi realizada com os *primers* mxa 1003f (5´ - GCGGCACCAACTGGGGCTGGT - 3´) e mxa 1561r (5´ - GGGCAGCATGAAGGGCTCCC - 3´) (MCDONALD; KENNA; MURRELL, 1995). Na PCR, foi utilizada reação com o volume final de 50 μL contendo 50 μg de DNA, 3,75 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 μM de cada *primer*, 0,1 $U.\mu L^{-1}$ de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). Após a amplificação, os produtos da PCR foram avaliados em eletroforese em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídeo e observado a luz ultra violeta.

2.2.3.2 Identificação de bactérias pela análise do gene 16S *rRNA* e *mxaF*

Os isolados amplificados de cada gene foram identificados por meio do seqüenciamento parcial dos genes 16S *rRNA* e *mxaF*. Para isso, os produtos da PCR dos respectivos genes foram purificados (GFX purification kit, Amershan-Pharmacia), seqüenciados com os *primers* R1387 e mxa1003f para os genes 16S *rRNA* e *mxaF*, respectivamente (MegaBACE 1000). Foram utilizadas apenas os cromatogramas com seqüências de alta qualidade (80% das bases nitrogenadas com alta qualidade > 20) e as seqüências foram comparadas com o banco de dados Ribosomal Data Project (para o gene 16S *rRNA*) e o banco de dados GenBank (nr/nt) (para o gene *mxaF*).

Esta análise permite a avaliação das espécies presentes na população amostrada. Após comparação, as seqüências tipo do gênero *Methylobacterium* foram utilizadas para o alinhamento

e a análise filogenética com o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) baseado na máxima parcimônia (MP). As seqüência obtidas foram depositadas no banco de dados do GenBank com os número de acesso EU789466 a EU789518 para 16S *rRNA* e EU789406 a EU789465 para *mxaF*.

2.3 Resultados e Discussão

O gênero *Methylobacterium* está distribuído em ambientes naturais explorados pelo homem, como solo, ar, poeira, água doce e salgada, sedimentos e ambientes urbanos (VAN AKEN, 2004), e recentemente têm sido descritos colonizando ativamente a superfície (CHANPRAME; TODD; WIDHOLM, 1996; ANDREOTE et al., 2006) e o interior de diferentes espécies vegetais ou em nódulos (SY et al., 2001; YATES et al., 2007). Em associação com a planta, esta bactéria poderia fixar nitrogênio (SY et al., 2001) e/ou induzir diversos efeitos benéficos à plantas de soja (HOLLAND; POLLACO, 1994), cana de açúcar e algodão (MADHAIYAN et al., 2006a).

Esse quadro pode ser resultado de uma co-evolução íntima entre *Methylobacterium* spp. e a planta hospedeira. Um exemplo desse processo de co-evolução foi descrito por Cervantes-Martinez, Lopez-Diaz e Rodriguez-Garay (2004), que atribuí ao endófito *Methylobacterium* sp. o aumento da atividade fotossintética em plantas, mediado pelo aumento do número de estômatos, aumento da concentração de clorofila e o teor de ácido málico na planta hospedeira. Devido a essas interações, espera-se que as plantas constituam um nicho importante para avaliar a diversidade do gênero *Methylobacterium*.

Árvores filogenéticas foram construídas usando 16S *rRNA* (690-1387, de acordo com a posição de *Escherichia coli*) e uma seqüência parcial do gene *mxaF*. A árvore do gene 16S *rRNA* formou pelo menos 7 grupos distintos (Figura 2.2). Baseado nessa filogenia, o grupo 1 consiste em isolados obtidos de todos os hospedeiros desse estudo. Esse grupo é dividido em três subgrupos: 1a, 1b e 1c (Tabela 2.1), com subgrupos 1a e 1c se encontram próximos a espécie tipo *Methylobacterium radiotolerans*, sugerindo que os subgrupos 1a e 1c represente genótipos divergentes. Além disso, foram encontrados isolados divergentes no grupo 2, sugerindo a presença de espécies ainda não descritas. Ao longo da árvore, outro posicionamento pode indicar uma espécie distinta; e.g. o grupo 6, onde o *bootstrap* de 99 separa a espécie tipo *M. hispanicum* do isolado Aw04. Esses resultados sugerem que a diversidade dessa espécie nesse gênero não foi explorada totalmente, podendo existir ainda espécies não descritas. Neste contexto, foi observado

que 16 novas espécies de *Methylobacterium* foram descritas recentemente (KATO et al., 2008), mostrando que a intensificação dos estudos nesse grupo tem permitido essa melhor compreensão da diversidade desse gênero.

Pequenos fragmentos desse gene representam eficientemente a filogenia bacteriana (LIU et al., 2007). É importante ressaltar que o fragmento analisado é representativo para identificar bactérias, visto que engloba regiões representativas do gene 16S *rRNA*, como as regiões hipervariáveis V6 e V7. Além disso, recentemente foi relatado que o fragmento que compreende as regiões V6 e V7 do gene 16S *rRNA* apresenta resultados semelhantes aos obtidos com fragmento de todo o gene (YOUSSEF et al., 2009).

Todos os grupos contém isolados de dois ou mais hospedeiros diferentes, mostrando que os genótipos de *Methylobacterium* colonizam diferentes hospedeiros (exceto o grupo 7, que apresenta apenas um isolado). Porém, os isolados de *Borreria verticillata* foram encontrados principalmente no grupo 1. Indicando que parte da diversidade de *Methylobacterium* spp. dentro da planta hospedeira é determinada por associações especificas, porém eventos estocásticos podem ocorrer.

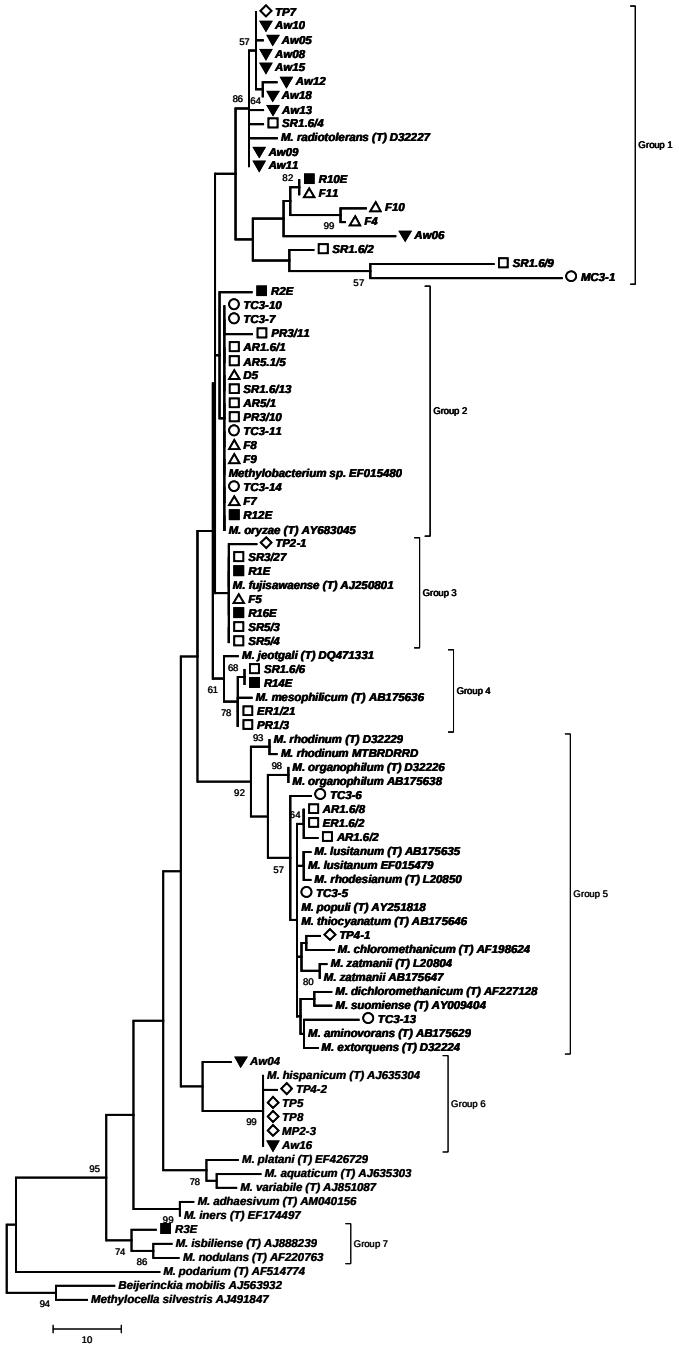

Figura 2.2 - A árvore filogenética construída pelo método de máxima parcimônia com seqüências de 700 bp do gene *16S rRNA* de *Methylobacterium* spp. disponível no banco de dados do RDP database, e *Beijerinckia mobilis* e *Methylocella sylvestris* foram usadas como *outgroup.* Os valores de *Bootstrap* superiores a 50 são mostrados nos internodes (*n* = 1000 replicatas). Os símbolos representam isolados dos seguintes hospedeiros: ○ café, △ cana-de-açúcar, □ citros, ◇ pimentão, ▼ *Borreria verticillata* ■ eucalipto. As barras indicam a divergência das seqüências

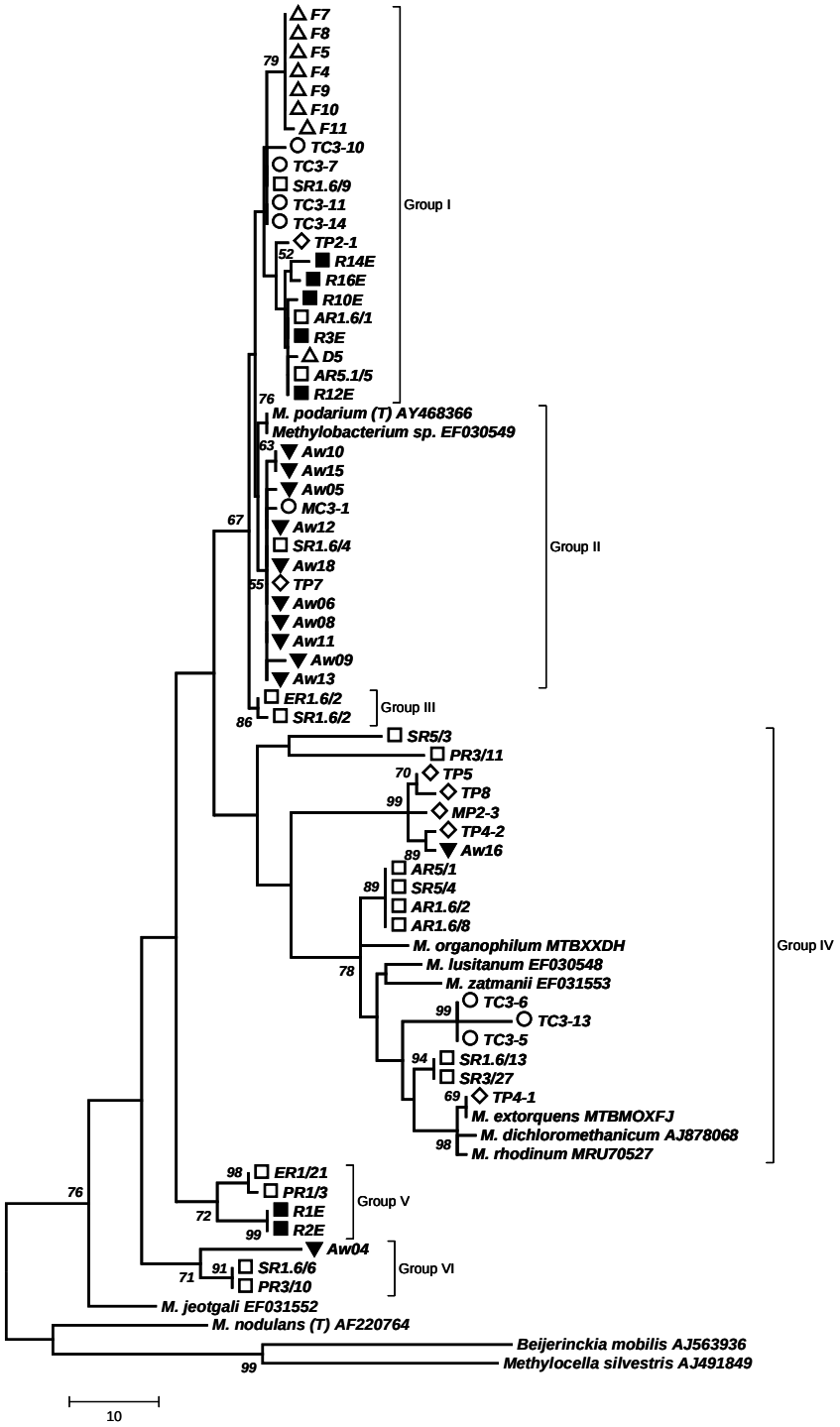

Figura 2.3 - A árvore filogenética construída pelo método de máxima parcimônia com seqüências de 520 bp do gene *mxaF* de Methylobacterium spp. disponível no banco de dados do GenBank. *Beijerinckia mobilis* e *Methylocella sylvestris* foram usadas como *outgroup*. Os valores de *Bootstrap* superiores a 50 são mostrados nos internodes (n = 1000 replicatas). Os símbolos representam isolados dos seguintes hospedeiros: ○ café, △ cana-de-açúcar, □ citros, ◇ pimentão, ▼ *Borreria verticillata* ■ eucalipto. As barras indicam a divergência das seqüências

Por meio da análise da seqüência parcial (530pb) do gene *mxaF* foi obtida uma árvore filogenética para alguns isolados, e embora não tenha sido observada uma congruência completa com a árvore gerada pela análise da seqüência parcial gene 16S *rRNA*, algumas observações podem ser feitas. A analise do BLASTn contra o banco de dados nr/nt no GenBank classificou a maioria dos isolados como "*bactéria metilotrófica não cultivável* ou *Methylobacterium* sp." (Figura 2.3). A baixa sensibilidade dessa identificação se deve ao número limitado de seqüências de *mxaF* disponível no banco de dados (total de 15). Com isso, o estudo presente contribui significativamente para a descrição de diversidade desse gene ubíquo para *Methylobacterium*. Além disso, a árvore filogenética obtida com as seqüências do gene *mxaF* também ocorreu a formação de seis grupos (Figura 2.3). O grupo I contem apenas isolados obtidos de diferentes hospedeiros (exceto os isolados de *B. verticillata*). É importante notar que na base de dados do GenBank não estão depositadas seqüências do gene *mxaF* das espécies *M. fujisawaense*, *M. radiotolerans*, *M. oryzae* e *M. mesophilicum*. O grupo II agrupou principalmente bactérias isoladas de *B. verticillata*, mostrando a diversidade limitada do gene *mxaF* encontrada em isolados associados a esta planta.

Explorando a seleção pela planta hospedeira, a análise do gene *mxaF* evidencia que os isolados de cana-de-açúcar se encontram todos no grupo I, os isolados de *B. verticillata* foram agrupados no grupo II (apenas 2 isolados pertencem aos grupos IV e VI), os isolados de eucalipto se encontram no grupo I (apenas dois isolados no grupo V), os isolados de pimentão no grupo IV (apenas dois isolados nos grupos I e II). Já os isolados de citros foram encontrados em todos os grupos (I-VI). Não se conhece os mecanismos necessários para a interação da planta com o produto do gene *mxaF* (metanol desidrogenase) dessa bactéria, fato este que poderia orientar no entendimento da interação de *Methylobacterium* spp. com plantas de interesse agrícola. A literatura sugere que essa resposta adaptativa é um mecanismo adicional a resposta a mudanças ambientais (KONSTANTINIDIS et al., 2006). O gene *mxaF* é ubíquo em *Methylobacterium* spp. e está associado a metilotrofia, metabolismo vantajoso a *M. extorquens* durante a colonização epifítica da planta na competição com outros microrganismos (SY et al., 2005). Além disso, a colonização epifítica é a primeira etapa para o desenvolvimento de uma interação mais forte, como a associação endofítica (ANDREOTE et al., 2006), sugerindo que alguns genótipos de *mxaF* possam ser selecionados durante o desenvolvimento da planta.

Contudo, como *mxaF* é um gene ubíquo em *Methylobacterium* spp., a discrepância filogenética encontrada entre os isolados deve ser considerada como uma pequena aberração que ocorre durante o processo de colonização induzido pela coexistência da bactéria e da planta hospedeira. Por isso, tem que ser salientada a recente descrição de isolados do gênero *Methylobacterium*, pela análise do gene 16S *rRNA*, que não apresentam o gene *mxaF* no seu genoma (ARDLEY et al., 2009). Esses autores mostram que essas estirpes não são capazes de utilizar compostos de C_1 carbono, e também demonstram que isso não impede a colonização e nodulação de raízes de *Lotononis* spp. No presente estudo pode ser observado que genótipos do gene *mxaF* podem ser selecionados pela planta, reforçando a idéia de que o produto deste gene participa da interação desta bactéria com a planta hospedeira.

Analisando os resultados, é possível observar uma congruência parcial quando foi comparada a arquitetura das árvores filogenéticas de 16S *rRNA* e *mxaF*. Porém, algumas exceções são observadas, tais como a posição de alguns isolados. Essa diferença de posição pode ser devido a: (i) diferenciação ecológica do isolado no ambiente em que se desenvolveu (KONSTANTINIDIS et al., 2006); ou (ii) a ocorrência de transferência horizontal de genes (HGT) (HEYER; GALCHENKO; DUNFIELD, 2002). A ocorrência de transferência horizontal é evidenciada por, entre outros fatores, a discrepância do conteúdo G+C de regiões de transferência quando comprado com outras regiões ao longo do genoma. Essa estimativa foi realizada nesse estudo, porém não foi encontrada nenhuma evidência, principalmente devido a limitação da análise realizada em apenas um gênero bacteriano, em que a variação do conteúdo de G+C é limitado.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram uma diversidade genética da comunidade de *Methylobacterium* spp. associados a planta, sugerindo, com base na seqüência parcial dos genes 16S *rRNA* e *mxaF*, a possibilidade de aumentar o conhecimento sobre a filogenia desse grupo com estudos baseado em *Methylobacterium* spp. associados a planta. Além disso, foi sugerido que parte da associação de *Methylobacterium* spp. com a planta deve ser determinado pelo genótipo da planta, e parte ocorre devido a eventos estocásticos.

Referências

ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, R.T.; SALLES, J.F.; MARCON, J.; LABATE, C.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culture-independent assessment of rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic *eucalyptus*. **Microbial Ecology**, Menlo Park, v.57, p.82-93, 2009.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; OVERBEEK, L.S.V.; ELSAS, J.D.V.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **National Research Council of Canada Research Press**, Ottawa, v.52, p.419-426, 2006.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.4906-4914, 2002.

ARDLEY, J.K.; O'HARA, G.W.; REEVE, W.G.; YATES, R.J.; DILWORTH, M.J.; TIWARI, R.P.; HOWIESON, J.G. Root nodule bacteria isolated from South African *Lotononis bainesii*, *L. listii* and *L. solitudinis* are species of *Methylobacterium* that are unable to utilize methanol. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.191, p.311-318, 2009.

CERVANTES-MARTINEZ, J.; LOPEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ-GARAY, B. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, Amsterdam, v.166, p.889-892, 2004.

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

DORRELL, N.; HINCHLIFFE, S.J.; WREN, B.W. Comparative phylogenomics of pathogenic bacteria by microarray analysis. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.8, p.620-626, 2005.

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.287, p.8-14, 2008.

HEYER, J.; GALCHENKO, V.F.; DUNFIELD, P.F. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. **Microbiology,** Reading, v.148, p.2831-2846, 2002.

HOLLAND, M.A.; POLACCO, J.C. PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.45, p.197-209, 1994.

INAGAKI, F.; TSUNOGAI, U.; SUZUKI, M.; KOSAKA, A.; MACHIYAMA, H.; TAKAI, K.; NUNOURA, T.; NEALSON, K.H.; HORIKOSHI, K. Characterization of C_1 - metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, Southern Ryukyu Arc, by analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxaF*, *mcrA* and 16S *rRNA* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.70, p.7445-7455, 2004.

JEONG, J.H.; KIM, S.W.; YOON, S.M.; PARK, J.K.; LEE, J.S. Characterization of the Conserved region of the *mxaF* gene that encodes the large subunit of methanol dehydrogenase from a Marine *Methylotrophic Bacterium*. **Molecules and Cells**, Seoul, v.13, p.369-376, 2002.

KATO, Y.; ASAHARA, M.; GOTO, K.; KASAI, H.; YOKOTA, A. *Methylobacterium persicinum* sp. nov., *Methylobacterium komagatae* sp. nov., *Methylobacterium brachiatum* sp. nov., *Methylobacterium tardum* sp. nov. and *Methylobacterium gregans* sp. nov., isolated from freshwater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, p.1134-1141, 2008.

KNIEF, C.; RAMETTE, A.; FRANCES, L.; ALONSO-BLANCO, C.; VORHOLT, J.A. Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. **International Society for Microbial Ecology Journal**, New York, 2010, In press. Disponível em: <http://www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/pdf/ismej20109a.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2010.

KONSTANTINIDIS, K.T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Toward a more robust assessment of intraspecific diversity, using fewer genetic markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.72, p.7286-729, 2006.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JÚNIOR, 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.

LIU, Z.; LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; BUSHMAN, F.D.; KNIGHT, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v.35, p.120-130, 2007.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T.M. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Environmental and Experimental Botany,** Oxford, v.57**,** p.168-176, 2006a.

MADHAIYAN, M.; REDDY, B.V.S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T.M. 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, 2006b.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; KWON, S.W.; SA, T.M. *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p.22-27, 2009.

MCDONALD, I.R.; KENNA, E.M.; MURRELL, J.C. Detection of methanotrofic bacteria in environmental samples with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.61, p.116-121, 1995.

MCDONALD, I.R.; RADAJEWSKI, S.; MURRELL, J.C. Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v.36, p.779-787, 2005.

MOOSVI, S.A.; MCDONALD, I.R.; PEARCE, D.A.; KELLY, D.P.; WOOD, A.P. Molecular detection and isolation from Antarctica of methylotrophic bacteria able to grow with methylated sulfur compounds. **Systematic and Applied Microbiology,** Stuttgart, v.28, p.541-554, 2005.

PIRTTILA, A.M.; LAUKKANE, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLÃ, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in buds of scoth pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridisation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.66, p.3037-3077, 2000.

SAUNDERS, N.A.; UNDERWOOD, A.; KEARNS, A.M.; HALLAS, G. A virulence-associated gene microarray: a tool for investigation of the evolution and pathogenic potential of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, Reading, v.150, p.3763-3771, 2004.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; de LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylotrophic *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. Methylotrophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during Colonization of *Medicago truncatula* under Competitive Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, p.7245-7252, 2005.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution,** Chicago, v.24, p.1596-1599, 2007.

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

WANG, P.; WANG, F.; XU, M.; XIAO, X. Molecular phylogeny of methylotrophs in deep-sea sediment from a tropical west Pacific Warm Pool. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.47, p.77-84, 2004.

WEON, H.Y.; KIM, B.Y.; JOA, J.H.; SON, J.A.; SONG, M.H.; KWON, S.W.; GO, S.J.; YOON, S.H. *Methylobacterium iners* sp. nov. and *Methylobacterium aerolatum* sp. nov., isolated from air samples in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, p.93-96, 2008.

YATES, R.J.; HOWIESON, J.G.; REEVE, W.G.; NANDASENA, K.G.; LAW, I.J.; BRA, U.L.; ARDLEY, J.K.; NISTELBERGER, H.M.; REAL, D.; O'HARA, G.W. *Lotononis angolensis* forms nitrogen fixing, lupinoid nodules with phylogenetically unique, fast-growing, pink-pigmented bacteria, which do not nodulate *L. bainesii* or *L. listii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.39, p.1680-1688, 2007.

YOUSSEF, N.; SHEIK, C.S.; KRUMHOLZ, L.R.; NAJAR, F.Z.; ROE, B.A.; ELSHAHED, M.S. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S *rRNA* gene-based environmental survey. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v**.**16, p.5227-5236, 2009.

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, metane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoids* x *nigra* DN34). **Microbiology**, Reading, v.54, p.1191-1196, 2004.

ZHANG, M.; LIDSTROM, M.E. Promoters and transcripts for genes involved in metanol oxidation in Methylobacterium extorquens AM1. **Microbiology**, Reading, v.149, p.1039-1040, 2003.

3. EXPRESSÃO GÊNICA NA INTERAÇÃO DE *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 COM ARROZ E EUCALIPTO PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL

Resumo

Bactérias do gênero *Methylobacterium* apresentam a capacidade de utilizar metanol como única fonte de carbono, sendo metilotróficas facultativas. Além disso, tem sido descrito que estas bactérias também apresentam a capacidade de interagir de forma mutualística com a planta hospedeira, a qual necessita desta associação para o seu crescimento e estabelecimento em diferentes ambientes. Para que ocorra a colonização, há uma comunicação entre a planta e o microrganismo, onde a bactéria reconhece compostos específicos exsudados pela raiz das plantas e esta reconhece moléculas produzidas pela bactéria. Teoricamente, a planta se comunica simultaneamente com microrganismos comensalistas, mutualistas e patógenos por compostos exsudados pela raiz e atrai apenas os que beneficiam a planta. Portanto, este trabalho visou estudar genes de diferentes classes, que poderiam estar envolvidos na interação *Methylobacterium*-planta. Foram selecionados genes relacionados à diferença no metabolismo da bactéria (gene *mxaF*), ao transporte e reconhecimento de compostos (genes *phoU* e *sss*), a resposta a estresse (gene *crtI*), a interações com o metabolismo da planta (gene *acdS*) e patogênese de bactérias (gene *patatin* e *phoU*). Foi observado que a expressão do gene *mxaF* não foi alterada. Já a expressão dos genes *crtI* e *acdS* associados à resposta ao estresse foi reprimida quando em associação com a planta. A expressão dos genes relacionados a patogênese da bactéria *patatin* e *phoU* não foi alterada, confirmando que *M. mesophilicum* SR1.6/6, embora apresente esses genes, é um endófito que não causa danos às plantas e portanto não apresenta um aumento na sua expressão. Os resultados sugerem que, nas condições avaliadas, a bactéria reconhece o ambiente da planta como um local de pouco estresse, provavelmente sugerindo que a planta não ativa o seu sistema de defesa contra esta bactéria endofítica.

Palavras-Chave: Interação bactéria-planta; Endófito; Virulência

GENE EXPRESSION ON THE *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 WITH RICE AND EUCALIPTUS INTERACTION BY QUANTITATIVE PCR

Abstract

Bacteria of *Methylobacterium* genus interacts symbiotically with different plant species, and can use methanol as only source of carbon, they are PPFMs - *pink-pigmented facultative methylotrophic*. The plants need the association with the bacteria for their own growth and establishment in different ecosystems, as occurs with the endophytes associations, that are mainly from the soil and enters in the plant by intercellular spaces or by cracks on the roots. To occur colonization, there is a communication between plant and microorganism. The bacterium recognizes specific compounds exuded by the plant roots. Theoretically, the plant communicates simultaneously with commensalists, mutualists and pathogens by compounds exuded by the root and attracts only microorganisms that will benefit them ecologically. Therefore, this research aimed to study different gene classes, that could be involved in *Methylobacterium*-plant interaction. It was selected genes related to different bacteria metabolism (*mxaF* gene), to compounds transport and recognition (*phoU* and *sss* genes), to bacteria adaptation to stressful environment (*crtI* gene), and interactions with plant metabolism (*acdS* gene) and bacteria pathogenicity (*patatin* and *phoU* genes). It was observed that genes related to different metabolism *mxaF* were not amended. The genes *crtI* and *acdS* related to stress had their expression reduced with the plant, the genes related to bacteria pathogenicity *patatin* and *phoU* were not amended, confirming that *M. mesophilicum* SR1.6/6, although present these genes, is an endophyte that do not cause damage to plants and therefore do not increase the gene expression. The results suggests that, in the evaluated conditions, the bacteria recognizes the plant environment as a place with not much stress, probably suggesting that the plant do not activate its defense system against the endophyte bacteria.

Keywords: Plant bacteria Interaction; Endophyte; Virulence

3.1 Introdução

O gênero *Methylobacterium* é composto por bactérias metilotróficas que podem interagir de forma mutualística com diferentes espécies vegetais. Na área agrícola, tem sido descrito que *M. nodulans* está envolvida na fixação de nitrogênio e na formação de nódulos (SY et al., 2001), enquanto outras espécies podem promover crescimento ou induzir resistência sistêmica na planta hospedeira (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; MADAHAIYAN et al., 2006). Além disso, em citros, trabalhos têm mostrado que *Methylobacterium* pode apresentar interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da CVC (clorose variegada dos citros) (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004). Tendo em vista esta íntima associação de *Methylobacterium* spp. com a planta hospedeira, pode ser sugerido que essa bactéria seja capaz de atuar no interior e na superfície da planta, influenciando o equilíbrio microbiano na planta hospedeira, e participando ativamente no estabelecimento e desenvolvimento vegetal.

Bactérias metilotróficas utilizam compostos contendo um carbono, tais como metanol e metano, como fonte carbono e energia. Também são capazes de converter compostos C_1 em produtos importantes, como biopolímeros, ácidos orgânicos, coenzimas e vitaminas. Essas bactérias desempenham um papel importante no ciclo do carbono (JEONG et al., 2002).

Endófitos são na sua maioria proveniente do solo e entram na planta por espaços intercelulares ou por pequenas fissuras da raiz. Para que ocorra a colonização há o estabelecimento de uma comunicação entre a planta e o microrganismo, onde a bactéria reconhece compostos específicos exsudados pela raiz das plantas. Teoricamente, a planta é capaz de estabelecer uma comunicação simultânea com microrganismos comensalistas, mutualistas e patógenos por meio da liberação de compostos pela raiz e atrai apenas os microrganismos que as beneficiam ecologicamente (HARDOIM; OVERBEECK; VAN ELSAS, 2008).

Dessa forma, tendo em vista que existem diferentes grupos de genes envolvidos na interação bactéria-planta, este trabalho visou avaliar a expressão de diferentes genes possivelmente envolvidos na interação *Methylobacterium*-planta. Foram selecionados 6 genes que foram descritos na literatura como expressos diferencialmente durante a interação bactéria-planta: *mxaF*, *phoU*, *sss*, *crtI*, *acdS* e *patatin*.

O gene *mxaF* é importante durante o metabolismo metilotrófico, codificando a subunidade α da enzima dehidrogenase do metanol (MDH) (ZHANG; LIDSTROM, 2003) e a sua expressão confere vantagens adaptativas em condições competitivas na superfície da planta (SUDTACHAT

et al., 2009), já que a planta produz metanol (durante a síntese da parede celular) nas folhas e libera pelos estômatos (SY et al., 2005) e há o aumento da atividade metilotrófica durante a simbiose (JOURAND et al., 2005).

Já os genes *phoU* e *sss* estão associados ao transporte e reconhecimento de compostos do ambiente (LAMARCHE et al., 2008; SCIER, 1998), o gene *phoU* é responsável pela regulação da homeostase do fosfato, porém, além disso, também controla e interfere na expressão de genes de estresse, produção de antibióticos (GRISTWOOD et al., 2009; LI; ZHANG, 2007) e virulência (CHENG et al., 2009a) e o gene *sss* (*sodium solute symporter*) realiza o transporte simpórtico do soluto juntamente com o sódio (pantotenato/Na^+, prolina/Na^+, glicose ou galactose/$Na^{+)}$ (SCIER, 1998).

Enquanto os genes gene *crtI*, *acdS* estão associados à respostas à estresse (SANDMANN, 2009) e ao metabolismo da planta (HARDOIM; OVERBEECK; VAN ELSAS, 2008), o gene fitoeno desidrogenase *crtI* codifica a enzima que catalisa a reação de desnaturação resultando na síntese do licopeno, que protege a célula contra danos oxidativos, diferentes tipos de radiações e dissecação (XU et al., 2007) e o gene *acdS* codifica a enzima ácido carboxílico aminociclopropano deaminase que degrada ACC (1-carboxilato 1-aminociclopropano), precursor do etileno na planta (HARDOIM; OVERBEECK; VAN ELSAS, 2008). As bactérias contendo o gene *acdS* promovem o crescimento vegetal pela (i) diminuição da inibição de vários processos da planta pelo etileno e (ii) permitindo que AIA estimule a proliferação celular e elongação sem o efeito negativo do aumento dos altos níveis do etileno vegetal (GLICK et al., 2007).

O gene *patatin* é normalmente associado à bactérias patogênicas e é ativado durante o processo de patogênese (CAMERA et al., 2009), os genes da família *patatin* codificam fosfolipases que hidrolisam fosfolipídios, utilizada por bactérias patogênicas na colonização eficaz do hospedeiro hidrolisando os fosfolipídios da membrana, resultando na perda da integridade da membrana e citotoxicidade (BANERJI; AURASS; FLIEGER, 2008). Quanto maior o número de genes da família *patatin*, maior a virulência da bactéria, isso ocorre provavelmente devido a vantagem que os genes da família *patatin* conferem a bactéria na (i) interação com o hospedeiro, (ii) adaptação aos vários ambientes e (iii) competição com outros microrganismos (BANERJI; FLIEGER, 2004). O gene *phoU* também esta envolvido no processo de patogênese da bactéria (CHENG et al., 2009a).

Há poucos estudos utilizando a técnica do PCR quantitativo para avaliar a expressão dos genes de interação microrganismo-planta. A maioria dos trabalhos avaliam os genes diferencialmente expressos da planta em resposta a um microrganismo patogênico, e não a diferença de expressão dos genes do microrganismo. Alguns exemplos são as interações planta-fungo patogênico como *Puccnia striiformis* (WANG et al., 2010), *Sclerotinia sclerotiorum* (WANG et al., 2009), *Pyrenophora teres* (BOGACKI; OLDACH; WILLIAMS, 2008) entre outros. Há também um menor número de trabalhos de interação planta-bactéria, que também priorizam o estudo da planta, tais como o estudo da interação entre batata e *Ralstonia solanacearum* (GAO et al., 2009) ou a validação do experimento de microaranjo que avalia os genes diferencialmente expressos em mandioca (*Manihot esculenta*) infectada por *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis (LOPEZ et al., 2005).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos genes *mxaF*, *acdS*, *crtI* e *patatin*, *phoU e sss* na interação da bactéria endofítica *M. mesophilicum* SR1.6/6 com a planta hospedeira arroz e eucalipto e na condição com etanol, visto que esses genes podem ser responsáveis pela colonização da bactéria na planta e interferir no desenvolvimento vegetal.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Isolado de *Methylobacterium mesophilicum* e condições de cultivo

Nos ensaios de interação entre *Methylobacterium*-planta foi utilizada a linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum*, previamente isolada de *Citrus sinensis* (ARAÚJO et al., 2002). Essa bactéria foi cultivada em meio CHOI3 (TOYAMA et al., 1998) a 28ºC por 96 horas, para a obtenção de um inóculo inicial de 10^8 células mL^{-1}, com a $D.O._{600}$ a 1,0.

3.2.2 Material Vegetal

Foram utilizadas plântulas de arroz (*Oriza sativa*) e de eucalipto (*Eucaliptus citriodora*). As plântulas axênicas de arroz e de eucalipto foram obtidas a partir de sementes previamente desinfetadas superficialmente (com álcool 70% e hipoclorito) e germinadas sobre meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e cultivadas *in vitro* sob condições axênicas.

3.2.3 Inoculação de *M. mesophilicum*

As plântulas com aproximadamente 10 cm de altura receberam o inóculo de *M. mesophilicum* pela aplicação de alíquotas de 5 mL da suspensão bacteriana (10^8 UFC mL^{-1}) em

meio de cultura CHOI3 (TOYAMA; ANTHONY; LINDSTROM, 1998). A inoculação foi realizada em meio MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sobre o sistema radicular da planta. Os tratamentos foram: (1) controle SR1.6/6 em CHOI3 (a fonte de carbono desse meio de cultura é o metanol); (2) SR1.6/6 em CHOI3 (substituindo a fonte de carbono pelo etanol); (3) SR1.6/6 inoculada no meio de cultura MS com arroz e (4) SR1.6/6 inoculada no meio de cultura MS com eucalipto. Todos os tratamentos foram compostos por 3 repetições e o período de incubação antes da extração do RNA foi de 48 horas.

3.2.4 Extração de RNA total

Células bacterianas foram coletadas do meio de cultura líquido por centrifugação (15 minutos a 6000 g), e a partir do *pellet* bacteriano o RNA foi extraído de acordo com o protocolo de extração da Invitrogen modificado (TRIzol®, Invitrogen). Foi adicionado 1 mL do reagente TRIzol® (Invitrogen), foi centrifugado a 12000 g por 15 minutos a 4ºC, coletou-se o sobrenadante que foi transferido para novo tubos de eppendorf de 2 mL. Ao material coletado, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (puro) em cada tubo, centrifugou-se novamente a 12000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi, então, transferida para novo eppendorf de 1,5 mL já contendo o mesmo volume de isopropanol absoluto gelado (4°C). A amostra foi centrifugada a 12000 g e o *pellet* formado foi lavado uma vez com etanol 75% gelado e seco. Ao final, o RNA foi ressuspendido em 30 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) e estocado a -80°C.

3.2.5 Avaliação da qualidade do RNA obtido

A integridade e quantificação do RNA extraído foi verificado em gel desnaturante de agarose 1,2% em tampão FA 10X (MOPS 200 mM, acetato de sódio 50 mM e EDTA 10 mM), contendo formaldeído (0,7%) e brometo de etídio (0,3 $\mu g.mL^{-1}$ de gel) e comparação com o marcador de 2 Kb. O gel foi equilibrado por 30 minutos em tampão FA 1X antes da corrida e 2 µg de RNA mais 6 µL de Loading buffer 5X foram aquecidos a 65°C por 5 minutos antes de serem aplicados no gel e após a eletroforese o gel foi fotodocumentado em luz UV. O RNA também foi quantificado por $D.O._{260}$, medida em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Todo o material utilizado para a obtenção e tratamento de RNA foi esterilizado e/ou tratado com DEPC para eliminação de RNAse.

3.2.6 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada com 1 μg do RNA por meio do *kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil) utilizando os *primers* randômicos, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2.7 Detecção de *M. mesophilicum* SR1.6/6

A fim de confirmar a presença do isolado SR1.6/6 foram utilizados os *primers* MMC1 e MMC2 que amplificam um fragmento exclusivo de 390 pb do gene 16S *rRNA* desse isolado (LACAVA et al., 2006). Na PCR, foi utilizada reação com o volume final de 25 μL contendo 50 μg de DNA, 3,75 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 μM de cada *primer*, 0,1 $U.\mu L^{-1}$ de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). Após a amplificação, os produtos da PCR foram avaliados em eletroforese em gel de agarose (1,2%).

3.2.8 Desenho de *primers*

O desenho dos *primers* para os genes alvo deste estudo foi realizado com base nas seqüências dos seis genomas do gênero *Methylobacterium* recentemente seqüenciados, anotados e depositados no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), além das seqüências gênicas obtidos em trabalhos anteriores (Capítulo 2 deste trabalho). Todas as seqüências obtidas foram alinhadas, buscando-se desenhar *primers* que se anelem em uma região conservada do gene, para que amplifique diferentes espécies do gênero *Methylobacterium.* Para isso foi utilizado o programa *Primer 3* (v. 0.4.0) (http://frodo.wi.mit.edu/) resultando na obtenção de *primers* com as características desejáveis, as seqüências dos *primers* utilizados se encontram na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Seqüências de *primers* utilizados

Primer	**Gene alvo**	**Seqüência**	**Tamanho do fragmento**	**Referência**
MxaFqPCRAF	*mxaF*	5'-CGTCAACGTCATGATGCT(C/G)T-3'	250pb	Este estudo
MxaFqPCRAR		5'- GATGTCCTTGGCGAG(A/G)TG - 3'		Este estudo
ACC Met1 f	*acdS*	5'- GACCGGGTCGGCAACATC - 3'	200pb	Este estudo
ACC Met2 r		5'- AGCCCGCCGTACTTGTGC - 3'		Este estudo
*Patatin*F	*patatin*	5'-CTTCAACGCCAACCTGATG - 3'	250pb	Este estudo
*Patatin*R		5'- CCGATCCGCTCGTAGTTCT - 3'		Este estudo
PhyF	*crtI*	5'- AATACTTCAAGCCGGTGCTG - 3'	186pb	Este estudo
PhyR		5'- GACATGCCGAGGTACTTGGT - 3'		Este estudo
*sss*F	*sss*	5'- ATCGACGCCCTGTACAATTC - 3'	221pb	Este estudo
*sss*R		5'- ACCGTCGCGTAGTTCGAC - 3'		Este estudo
*phoU*F	*phoU*	5'- TTCGACGGGCTGATCTACTC - 3'	189pb	Este estudo
*phoU*R		5'- GATCAGGTAGAAGGCCACCA - 3'		Este estudo
RecAF	*recA*	5' - CGAACTGCATGGTC(G)ATCTTC-3'	232pb	Este estudo
RecAR		5' - ATGTCGAACTCGACCTGCTT - 3'		Este estudo
ZwfrF	*zwf*	5'- AGCAGCTGGAACATGTGGTT - 3'	231pb	Este estudo
ZwfrR		5'- CGACGAGAGCCAGTTCTACC- 3'		Este estudo
rpoDrF	*rpoD*	5'- ACGACCTCGAGAACAACGTC- 3'	229pb	Este estudo
rpoDrR		5'- ACGACCTCGAGAACAACGTC- 3'		Este estudo
proCF	*proC*	5'- CCAGCAGGAAGACGTAGGC- 3'	282pb	Este estudo
proCR		5'- ACACGCTCCTCGTCTCGAT- 3'		Este estudo
MMC1	16S *rRNA*	5'- TACGTGGAGAGATTCACGGTC- 3'	390pb	Lacava et al. (2006)
MMC2		5'- GTACAAGGCCCGGGAACGTAC- 3'		Lacava et al. (2006)

Na PCR, para de validação dos *primers* desenhados neste trabalho, foi utilizada reação com o volume final de 25 μL contendo 50 μg de DNA, 3,75 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 μM de cada *primer*, 0,1 U μL^{-1} de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). Após a amplificação, os produtos da PCR foram avaliados em eletroforese em gel de agarose (1,2%). Foram testadas as especificidades dos *primers* em nível de espécies, isolados ou gênero de 16 isolados do gênero *Methylobacterium* (Tabela 3.2), e isolados representantes dos gêneros *Rhizobium* sp., *Sinorizobium* sp. e *Bacillus* sp.

Tabela 3.2 - Identificação de isolados de Methylobacterium spp. de diferentes plantas hospedeiras a partir da seqüência parcial dos genes 16S *rRNA*

Isolado	**Planta hospedeira**	**Local do isolamento**	**Identificação***
TC3-6	Café	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*
TC3-7	Café	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*
F5	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*M. fujisawaense*
F7	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*
F8	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*
F9	Cana-de-açúcar	Piracicaba, SP	*Methylobacterium sp.*
SR3/27	Citros	Catanduva, SP	*Methylobacterium sp.*
PR1/3	Citros	Novais, SP	*M. mesophilicum*
PR3/11	Citros	Catanduva, SP	*Methylobacterium sp.*
TP7	Pimentão	Piracicaba, SP	*Bactéria Metilotrófica não cultivável*
TP8	Pimentão	Piracicaba, SP	*M. hispanicum*
R3E	*Eucalyptus* spp.	Piracicaba, SP	*Methylobacterium spp.*
MA2.9	*Laguncularia racemosa*	Bertioga, SP	*Methylobacterium spp.*
MA3.1	*Aviscenia shaueriana*	Bertioga, SP	*Methylobacterium spp.*
MB1.1	*Rhizophora mangle*	Bertioga, SP	*Methylobacterium spp.*
MB1.3	*Rhizophora mangle*	Bertioga, SP	*Methylobacterium spp.*

*Identificação baseada no banco de dados RDP (http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm) e na análise filogenética desse estudo (Capítulo 2)

3.2.9 Análise por PCR quantitativo (PCR em tempo real)

A reação de amplificação por qPCR foi conduzida em termociclador iQ™5 (Bio-Rad) programado para uma desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 62°C. Na reação de qPCR a especificidade dos *primers* foi avaliada por meio de uma curva de desnaturação com o gradiente de 60 a 96°C variando 1°C a cada 30 segundos. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μL, contendo 2 μL de cDNA (100 ng), 10 μM de cada *primer* e 12,5 μL da solução do kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). A eficiência da reação foi calculada utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003).

A quantificação da expressão gênica por meio de qPCR foi baseada na expressão de um gene alvo em relação a um gene de referência (gene com expressão reconhecidamente constitutiva) pelo modelo matemático de Pfaffl que calcula a razão da expressão relativa de um gene alvo baseado na eficiência da reação de qPCR (*E*) e no ponto em que a fluorescência ultrapassa satisfatoriamente a fluorescência de *background* (Ct) de uma amostra desconhecida *vs.*

um controle, e é expresso em relação a um gene referência, de acordo com a seguinte equação (PFAFFL, 2001).

$$\text{Razão (RER)} \quad \frac{(E_{alvo})^{\Delta CP\,alvo\ (controle\ -amostra)}}{(E_{ref.})^{\Delta CP\,ref.\ (controle\ -\ amostra)}} \qquad (1)$$

3.3 Resultados e Discussão

O RNA total de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi extraído de células crescidas em diferentes condições, como descritas nas 4 condições (tratamentos) estudadas. A presença das bandas referentes ao RNA 23S e 16S no gel de agarose desnaturante 1% mostra que o RNA estava íntegro e de qualidade. A relação da absorbância do comprimento de onda 260/280 foi próximo a 2, indicando que não havia impurezas no RNA total obtido.

Foram testados 16 isolados do gênero *Methylobacterium* com os *primers* utilizados nesse estudo, a fim de avaliar a especificidade dos mesmos a um determinado isolado, gênero ou família bacteriana (Tabela 3.3). Todos os *primers* desenhados foram específicos para o gênero *Methylobacterium*, e não amplificaram seqüência no genoma de *Sinorhizobium* sp., *Rhizobium* sp. e *Bacillus cereus*. A única exceção foi o *primer* para o gene *acdS* (ACC deaminase), o qual amplificou este gene em bactérias do gênero *Rhizobium.*

Tabela 3.3 - Amplificação do genes de diferentes gêneros bacterianas pelos *primers* utilizados neste estudo

Gene	Gêneros bacterianos			
	Methylobacterium spp	*Rhizobium sp.*	*Sinorhizobium sp.*	*Bacillu sp.*
mxaF	16 (100%)	-	-	-
acdS	14 (87,5%)	+	-	-
patatin	10 (62,5%)	-	-	-
crtI	4 (25%)	-	-	-
phoU	15 (93,75%)	-	-	-
sss	15 (93,75%)	-	-	-
recA	14 (87,5%)	-	-	-

Todos os produtos da amplificação dos sete genes (*mxaF*, *acdS*, *crtI*, *patatin*, *phoU*, *sss e recA*) foram purificados, seqüenciados e comparados com o banco de dados do GenBank via BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) confirmando a identidade do fragmento amplificado (ANEXO A). Os *primers* foram avaliados inicialmente por meio de PCR tradicional antes da avaliação por PCR quantitativo.

Para utilização como gene endógeno foram testados diferentes genes (16S *rRNA*, *rec*A, *zwf*, *rpo*D e *pro*C) que poderiam apresentar expressão constante em todos os tratamentos (STEVENSON; WEIMER, 2005; HOLMES et al., 2005). Dessa forma, tendo em vista os resultados observados, onde o gene *recA* apresentou o menor ΔCt e a maior eficiência, este gene foi utilizado como controle endógeno nas condições avaliadas.

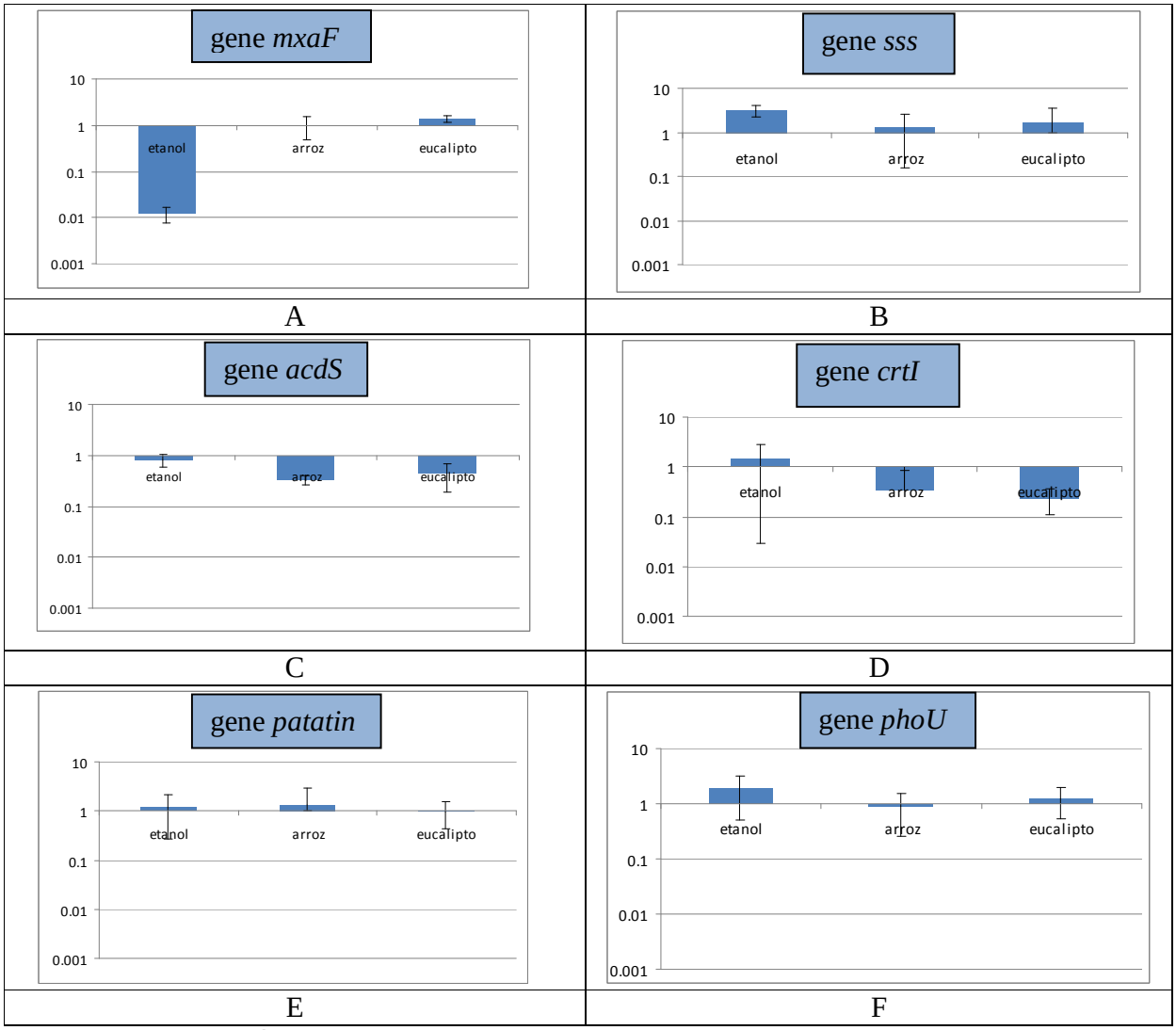

Figura 3.1 - Expressão gênica dos genes (A) *mxaF*, (B) *sss*, (C) *acsS*, (D) *crtI*, (E) *patatin*, (F) *phoU* comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *recA* e as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica

A expressão do gene *mxaF* foi reprimida apenas durante crescimento de *M. mesophilicum em* meio de cultura apresentando etanol como única fonte de carbono, mas não apresentou variação significativa em relação ao controle (crescimento em meio de cultura apresentando metanol como única fonte de carbono) e aos tratamentos onde esta bactéria foi co-cultivada na presença da planta hospedeira (Figura 3.1A). O gene *mxaF* codifica a enzima responsável pela transformação do metanol em formaldeído (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005; ZHANG; LIDSTROM, 2003), portanto, como esperado na presença de metanol contido no meio

de cultura CHOI3 a expressão deste gene foi ativada. Tendo em vista que não houve diferença significativa entre o controle com metanol e a planta hospedeira, pode ser sugerido que durante o crescimento da planta, ocorre a produção e liberação de metanol que é prontamente metabolizado por *Methlobacterium mesophilicum*, fato este que poderia conferir à bactéria vantagem competitiva em relação a outras bactérias que não apresentam este metabolismo. De fato, trabalhos recentes têm demonstrado que o produto do gene *mxaF* pode conferir vantagem à bactéria durante a associação com a planta hospedeira em condições de competição com outros microrganismos (SUDTACHAT et al., 2009; SY et al., 2005) e portanto é induzido durante a simbiose (JOURAND et al., 2005), neste estudo *M. mesophilicum* foi retirada do meio líquido, não estando diretamente em interação com a planta hospedeira, bem como não havendo competição com outros microrganismos reforçando a hipótese de que a expressão desse gene é estimulada por metabólitos produzidos pela planta, mas que confere vantagem diante de outras bactérias. Esse fato sugere que a planta pode de forma direta ou indireta selecionar a população bacteriana que se manterá em associação com folhas, caules e raízes.

A expressão do gene *acsS* não apresentou diferença significativa durante cultivo em meio de cultura com etanol ou metanol como fonte de carbono, mas foi reprimida nas bactérias em contato com as plantas de arroz e eucalipto (Figura 3.1C). O gene *acdS* codifica a enzima ACC deaminase que seqüestra o 1-carboxilato 1-aminocyclopropano (ACC), o precursor do etileno, da planta utilizando como fonte de carbono, quebrando em amônia (NH_3) e alfa-cetobutirato (HARDOIM; OVERBEECK; VAN ELSAS, 2008). Tendo em vista que este gene está associado a um aumento da capacidade da planta em suportar estresse físico e biológico, a repressão da expressão deste gene em *M. mesophilicum* durante a interação com a planta hospedeira pode sugerir que este isolado não apresenta esta habilidade nas condições avaliadas. Tittabutr et al. (2008) mostraram que a introdução de múltiplas cópias do gene *acdS* aumentou a atividade da enzima ACC deaminase de *Rhizobium sp.*. Além disso, foi demonstrado que em algumas estirpes de *Rhizobia* o gene *acdS* é regulado pelo promotor responsável pela ativação da transcrição de todos os genes de fixação de nitrogênio *nif* (GLICK et al., 2007). Portanto, na presença da enzima ACC deaminase há um maior crescimento da planta (CHENG et al., 2009b). Neste contexto, Madahaiyan et al. (2006) descreveram que *Methyhlobacterium* é capaz de induzir resistência sistêmica em arroz e cana de açúcar. Entretanto, tendo em vista que nas condições avaliadas, houve repressão da expressão do gene *acdS*, pode ser sugerido que se *M. mesophilicum* induz

resistência sistêmica nas plantas utilizadas, isso ocorre apenas enquanto a bactéria coloniza o interior da planta ou esta característica deve ser determinada pela expressão de outros genes.

Nas condições avaliadas a expressão do gene *crtI* não apresentou diferenças significativas em relação ao controle no tratamentos com etanol, tendo apresentado uma variação muito grande durante o cultivo de *M. mesophilicum* em meio CHOI3 com etanol. Entretanto, em associação com a planta hospedeira, foi observado que houve repressão da expressão desse gene, principalmente durante a interação com plantas de eucalipto (Figura 3.1D). O gene *crtI* codifica a enzima fitoeno desidrogenase precursora do licopeno, que é responsável pela biossíntese de carotenóides, responsáveis pela proteção da bactéria contra danos oxidativos causados por estresses ambientais (SANDMANN, 2009; XU et al., 2007). A repressão da expressão do gene *crtI* resulta na ausência do pigmento e afeta a radioresistência e reduz a sobrevivência do microrganismo na presença de H_2O_2 e raios γ, assim, os carotenos (antioxidantes) contribuem para o sistema de defesa da bactéria (XU et al., 2007). Dessa forma, os resultados apresentados sugerem que a repressão desse gene nas condições avaliadas, está associada ao fato de que durante esta interação a planta hospedeira não ativa o seu sistema de defesa e portanto, a bactéria não reconhece a planta como um ambiente estressante. Outro ponto importante é que nas condições avaliadas a expressão do gene bacteriano foi avaliada de células que, embora estejam crescendo em contato com a planta hospedeira, não estão no interior da planta, fato este que também poderia alterar o padrão de expressão desses genes.

Dessa forma, tendo em vista resultados anteriores que descrevem que a expressão dos genes *crtI* e *acdS* estão relacionados a resposta da bactéria ao estresses oxidativos (XU et al., 2007) ou resposta ao estresse da planta hospedeira (HARDOIM; OVERBEECK; VAN ELSAS, 2008), pode ser sugerido que nas condições avaliadas, a bactérias não percebeu estresse ambiental, fato este que poderia ocorrer se houvesse avaliação do padrão de expressão de células obtidas do interior da planta hospedeira.

O gene da família *patatin* PLP (*patatin like protein*) codifica fosfolipases que quebram fosfolipídios da membrana celular da planta, apresentando um papel importante na patogênese bacteriana (CAMERA et al., 2005). Bactérias que super expressam esse gene no hospedeiro são geralmente intracelulares, secretando as PLP produzidas pelo sistema de secreção tipo IV, degradando sua membrana celular (BANERJI; AURASS; FLIEGER, 2008). No presente trabalho, foi observado que a expressão do gene *patatin* não apresenta diferença significativa nas condições

avaliadas. Este resultado, confirma estudos anteriores que demonstraram que *M. mesophilicum* é um endófito, não patogênico e que no interior da planta coloniza preferencialmente os espaços intercelulares (ANDREOTE et al., 2006), indicando que não apresenta atividade lipolíticas, como ocorre em patógenos.

Similarmente, a expressão do gene *phoU* também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (com etanol e plantas). O gene *phoU* tem como função principal regular a homeostase do fosfato na célula, mas também interfere na expressão de genes de estresse, produção de antibióticos e virulência (CHENG et al., 2009a; GRISTWOOD et al., 2009; LI; ZANG, 2007). A ausência de variação na expressão desse gene nos diferentes tratamentos mostra que essa bactéria endofítica não expressa genes de virulência, confirmando assim como observado para o gene *patatin*, uma limitada capacidade de patogênese nas condições avaliadas.

A expressão do gene *sss* (*sodium solute symporter*) não apresentou diferenças significativas em relação ao controle com metanol e ao co-cultivo com plantas de arroz e eucalipto, mas apresentou indução na presença de etanol (Figura 3.1B). O gene *sss* realiza o transporte simpórtico de diferentes solutos (açúcares, aminoácidos, vitaminas, ânions ou inositol) juntamente com o sódio (LOLKEMA; SLOTBOOM, 2008; SCIER, 1998; SEVERI et al., 2010). Esse resultado sugere que os exsudados das plantas testadas não interferem nesse sistema de transporte bacteriano, que provavelmente utiliza a mesma fonte de carbono nos tratamentos com plantas e controle. Já na presença de etanol há a super expressão desse gene, aumentando o transporte de solutos por esse transportador, indicando alterações metabólicas nutricionais nas bactérias nesta condição.

Os genes *phoU* e *sss* estão relacionados ao transporte de compostos, apresentando padrões de expressão semelhantes. A única diferença é que no tratamento com etanol foi super expresso o gene *sss* e não alterou a expressão de *phoU*. Isso mostra que o etanol pode utilizar especificamente o sistema de transporte *sss* e não o *phoU* para entrar nas células da linhagem SR1.6/6. Este estudo permitiu compreender melhor o papel dos genes *mxaF*, *acdS*, *crtI*, *patatin*, *phoU* e *sss* na interação bactéria-planta. Foi observado que o gene *mxaF* relacionados ao metabolismo diferencial não foi alterado já que a bactéria utiliza a mesma fonte de carbono (metanol) nos tratamentos (exceto com etanol), sugerindo que a planta pode induzir a expressão desse gene e de forma indireta aumentar o *fitness* desta bactéria durante a interação com a planta hospedeira. Este resultado pode ser confirmado pela repressão dos genes *crtI* e *acdS* durante a

interação com a planta hospedeira. Tendo em vista que estes genes *crtI* e *acdS* estão associados à resposta ao estresse, este resultado indica que este ambiente gera um estresse reduzido para a bactéria endofítica *M. mesophilicum.* Os genes *patatin* e *phoU*, relacionados a patogenicidade, não foram alterados, confirmando que *Methylobacterium* é um endófito que não possui características similares à bactérias fitopatogênicas. Os resultados apresentados no presente trabalho mostra que a linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum* apresenta uma íntima associação com plântulas de arroz e eucalipto, onde a planta hospedeira pode aumentar o *fitness* desta bactéria, favorecendo-a durante a interação. Em contrapartida, a bactéria reprime genes associados ao estresse e não expressa genes que podem estar associados à patogênese, mostrando que a interação *M. mesophilicum* deve ocorrer sem estresse para ambas as partes envolvidas. Tendo em vista que a planta seleciona esta bactéria endofítica, estudos devem ser focados para entender o papel desta bactéria na planta hospedeira.

Referências

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; OVERBEEK, L.S.V.; ELSAS, J.D.V.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **National Research Council of Canada Research Press**, Ottawa, v.52, p.419-426, 2006.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; ELSAS, J.D.V.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.4906-4914, 2002.

BANERJI, S.; FLIEGER, A. *Patatin*-Like Proteins: A New Family Of Lipolytic Enzymes Present In Bacteria? **Microbiology**, Reading, v.150, p.522-525, 2004.

BANERJI, S.; AURASS, P.; FLIEGER, A. The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. **International Journal of Medical Microbiology**, Hamps, v.298, p.169-181, 2008.

BOGACKI, P.; OLDACH, K.H.; WILLIAMS, K.J. Expression profiling and mapping of defense response genes associated with the barley-*Pyrenophora teres* incompatible interaction. **Molecular Plant Pathology**, London, v.9, p.645-60, 2008.

CAMERA, S.; GEOFFROY, P.; SAMAHA, H.; NDIAYE, A.; RAHIM, G.; LEGRAND, M.; HEITZ, T. A pathogen-inducible *patatin*-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in Arabidopsis. **The Plant Journal,** Oxford**,** v.44, p.810-825, 2005.

CAMERA, S.; BALAGUÉ, C.; GÖBEL, C.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FEUSSNER, I.; ROBY, D.; HEITZ, T. The *Arabidopsis Patatin*-Like Protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v.22, p.469-481, 2009.

CHENG, C.; TENNANT, S.M.; AZZOPARDI, K.I.; BENNETT-WOOD, V.; HARTLAND, E.L.; ROBINS-BROWNE, R.M.; TAUSCHEK, M. Contribution of the *pst-phoU* operon to cell adherence by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and virulence of *Citrobacter rodentium*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.77, p.1936-1944, 2009a.

CHENG, Z.; DUAN, J.; HAO, Y.; MCCONKEY, B.J.; GLICK, B.R. Identification of Bacterial Proteins mediating the interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and *Brassica napus* (Canola). **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v.22, p.686-694, 2009b.

GAO, G.; JIN, L.P.; XIE, K.Y.; QU, D.Y. The potato StLTPa7 gene displays a complex Ca-associated pattern of expression during the early stage of potato-*Ralstonia solanacearum* interaction. **Molecular Plant Pathology,** London**,** v.10, v.15-27, 2009.

GLICK, B.R.; TODOROVIC, B.; CZARNY, J.; CHENG, Z.; DUAN, J.; MCCONKEY, B. Promotion of plant growth by bacterial ACC Deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.26, p.227-242, 2007.

GRISTWOOD, T.; FINERAN, P.C.; EVERSON, L.; WILLIAMSON, N.R.; SALMOND, G.P. The PhoBR two-component system regulates antibiotic biosynthesis in *Serratia* in response to phosphate. **BioMed Central Microbiology**, London, v.9, 2009. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/112>. Acesso em: 22 mar. 2010.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.16, p.463-471, 2008.

HOLMES, D.E.; NEVIN, K.P.; O'NEIL, R.A.; WARD, J.E.; ADAMS, L.A.; WOODARD, T.L.; VRIONIS, H.A.; LOVLEY, D.R. Potential for quantifying expression of the *Geobacteraceae* Citrate Synthase gene to assess the activity of *Geobacteraceae* in the subsurface and on current-harvesting electrodes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, p.6870-6877, 2005.

JEONG, J.H.; KIM, S.W.; YOON, S.M.; PARK, J.K.; LEE, J.S. Characterization of the Conserved region of the *mxaF* gene that encodes the large subunit of methanol dehydrogenase from a marine methylotrophic bacterium. **Molecules and Cells**, Seoul, v.13, p.369-376, 2002.

JOURAND, P.; RENIER, A.; RAPIOR, S.; FARIA, S.M.; PRIN, Y.; GALIANA, A.; GIRAUD, E.; DREYFUS, B. Role of methylotrophy during symbiosis between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa.* **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v.18, p.1061-1068, 2005.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; 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.; LI, W.B.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; HARTUNG, J.S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.65, p.535-541, 2006.

LAMARCHE, M.G.; WANNER, B.L.; CRÉPIN, S.; HAREL, J. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.32, p.461-473, 2008.

LI, Y.; ZHANG, Y. *PhoU* is a Persistence Switch Involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.51, p.2092-2099, 2007.

LOLKEMA, J.S.; SLOTBOOM, D.J. The major amino acid transporter superfamily has a similar core structure as Na^+-galactose and Na^+-leucine transporters. **Molecular Membrane Biology**, Abingdon, v.25, p.567-570, 2008.

LOPEZ, C.; SOTO, M.; RESTREPO, S.; PIÉGU, B.; COOKE, R.; DELSENY, M.; TOHME, J.; VERDIER, V**.** Gene expression profile in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis infection in cassava using a cDNA microarray. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.57, p.393-410, 2005.

MADAHAIYAN, M.; REDDY, B.V.S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T.M. 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.

MCDONALD, I.R.; RADAJEWSKI, S.; MURRELL, J.C. Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v.36, p.779-787, 2005.

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

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v.29**,** e.45, 2001.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; LEKANNE DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time PCR data. **Neuroscience Letters**, Clare, v.339, p.62-66, 2003.

SANDMANN, G. Evolution of carotene desaturation: The complication of a simple pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** New York, v.483, p.169-174, 2009.

SCIER, M.H. Proposed independent evolution of different channel and carrier families. In: POOLE, R.K. (Ed.) **Advanced in microbial physiology.** Academic press: London, 1998. p.81-136.

SEVERI, E.; HOSIE, A.H.F.; HAWKHEAD, J.A.; THOMAS, G.H. Characterization of a novel sialic acid transporter of the sodium solute symporter (*SSS*) family and *in vivo* comparison with known bacterial sialic acid transporters. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, p.1-8, 2010.

STEVENSON, D.M.; WEIMER, P.J. Expression of 17 Genes in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during fermentation of cellulose or cellobiose in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, p.4672-4678, 2005.

SUDTACHAT, N.; ITO, N.; ITAKURA, M.; MASUDA, S.; EDA, S.; MITSUI, H.; KAWAHARADA, Y.; MINAMISAWA, K. Aerobic vanillate degradation and C1 compound metabolism in *Bradyrhizobium japonicum.* **Applied And Environmental Microbiology**, Baltimore, v.75, p.5012-5017, 2009.

SY, A; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylotrophic *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. Methylotrophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, p.7245-7252, 2005.

TITTABUTR, P.; AWAYA, J.D.; LI, Q.X.; BORTHAKUR, D. The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.31, p.141-150, 2008.

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

WANG, X.; LIU, W.; CHEN, X.; TANG, C.; DONG, Y.; MA, J.; HUANG, X.; WEI, G.; HAN, Q.; HUANG, L.; KANG, Z. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. **BioMed Central Plant Biology**, London, v.10, 2010. Disponível em: <http://www.biocentral.com/1471-2229/10/9>. Acesso em: 22 mar. 2010.

WANG, X.; LI, Q.; NIU, X.; CHEN, H.; XU, L.; QI, C. Characterization of a canola C2 domain gene that interacts with PG, an effector of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Experimental Botany**, Oxoford, v.60, p.2613-2620, 2009.

XU, Z.; TIAN, B.; SUN, Z.; LIN, J.; HUA, Y. Identification and functional analysis of a phytoene desaturase gene from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. **Microbiology**, Reading, v.153, p.1642-1652, 2007.

ZHANG, M.; LIDSTROM, M.E. Promoters and transcripts for genes involved in metanol oxidation in *Methylobacterium extorquens* AM1. **Microbiology**, Reading, v.149, p.1039-1040, 2003.

4. EXPRESSÃO GÊNICA DE *Xylella fastidiosa* EM CO-CULTIVO COM A BACTÉRIA ENDOFÍTICA *Methylobacterium mesophilicum*

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, tanto *in natura* como industrializado. Entretanto, a sua produção tem apresentado uma redução devido à incidência de doenças nos pomares de laranja (*Citrus sinensis*). Entre essas doenças, destaca-se a Clorose Variegada dos Citros (CVC), a qual produz lesões cloróticas nas folhas e frutos, maturação precoce dos frutos com uma redução do tamanho dos mesmos e enrijecimento da casca que pode causar danos às máquinas utilizadas na produção de suco. A CVC é resultado da interrupção do xilema da planta hospedeira devido a presença da bactéria *Xylella fastidiosa*. Entretanto, sabe-se que o aparecimento dos sintomas também está associado a fatores ambientais, pois plantas resistentes à CVC, também chamadas de assintomáticas ou escapes, já foram relatadas, mas estas são geneticamente iguais às plantas susceptíveis, reafirmando a hipótese da importância das variações ambientais. Até o presente momento, pouco é conhecido sobre todos os possíveis fatores envolvidos nesse fenômeno. Bactérias endofíticas são definidas como aquelas que podem ser isoladas do interior de tecidos vegetais desinfetados superficialmente, e que não causam danos às plantas. Estas bactérias colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos e, portanto, podem ser importantes candidatas para o controle dos mesmos. Em estudos prévios, *Methylobacterium* spp. foram isoladas endofiticamente de plantas assintomáticas de *Citrus* spp. e a correlação entre a presença desta bactéria endofítica e a intensidade dos sintomas da CVC já foi proposta. Para melhor entender essa relação, este trabalho teve por objetivos identificar genes de *X. fastidiosa* diferencialmente expressos quando associados à bactéria endofítica *M. mesophilicum*, a qual está associada a redução do crescimento de *X. fastidiosa*. Por meio da análise de expressão gênica *in vitro* de *X. fastidiosa* em co-cultivo com *M. mesophilicum*, foi observado que esse fitopatógeno vascular apresentou diminuição da expressão de genes envolvidos com o crescimento e a formação de biofilme. Esses resultados podem explicar parcialmente o fato de que *X. fastidiosa* estar presente em algumas plantas, sem no entanto manifestar os sintomas da CVC.

Palavras-chave: Microarranjo; Expressão gênica; Endofítico; *Quorum sensing*; Biofilme

STUDY OF GENE EXPRESSION OF *Xylella fastidiosa* IN CO-CULTIVE WITH ENDOPHITIC BACTERIUM *Methylobacterium mesophilicum*

Abstract

Brazil has the world's greatest citrus production (*in natura* and industrializated). However, the production can decrease due to the high incidence of diseases on the *Citrus sinensis* fields. The citrus clorosis variegated (CVC) is an important citrus disease, that produces clorotic injuries, on leaves and fruits, fruits colostomy reducing its size and the peel stiffening, that can damage the machines used to produce the orange juice. The CVC occurs due to the presence of the *Xylella fastidiosa* bacteria in the affected plant xylem, causing interruption of this vessel. The symptoms occur depending on environmental factors, since CVC resistant plants, also called asymptomatic were described and are genetically the same as the as diseased plants, reaffirming the importance of environmental changes. However, until now, not much is known about the possible factors involved in it. Endophyte bacteria are defined as those microorganisms that can be isolated from the vegetal inner tissues superficially disinfected, and that do not cause any damage to the plant. This bacterium occupies the same ecological niche of the phytopathogen and, therefore, can be important candidates to control them. In previous studies, the bacterium *M. mesophilicum* was endophyticaly isolated from asymptomatic plants of *Citrus* spp. and was observed a correlation between this endophytic bacteria and the reduction of the growth of *X. fastidiosa* in asymptomatic plants. To a better understanding of this relation, this work had the aim of identify the *X. fastidiosa* differentially expressed genes in association to the endophytic bacteria *M. mesophilicum*. Using a genetic expression analysis of *X. fastidiosa in vitro* in co-cultive with *M. mesophilicum*, it was seen that this phytopathogen presented the reduction growth and biofilm formation gene expression. This result can explain why *X. fastidiosa* can be in some plants and, therefore, not express CVC symptoms.

Keywords: Microarray; Gene expression; Endophyte; *Quorum sensing*; Biofilm

4.1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, sendo responsável por mais de 35% desta produção, 53% de suco de laranja e 80% de suco concentrado distribuído no mercado mundial (DE SOUZA et al., 2003), gerando divisas de 1,2 bilhões de dólares anuais, provenientes principalmente da exportação de suco de laranja concentrado congelado (NEVES, 2008). Entretanto, dados de 2009 mostraram que 46,8% dos pomares no estado de São Paulo e no triângulo mineiro, maior área de produção, apresentam sintomas da Clorose Variegada dos Citros (CVC), conhecida também por "amarelinho" e causada pela bactéria *X. fastidiosa*, totalizando 74 a 79 milhões de plantas infectadas (FUNDECITROS, 2009). No estado de São Paulo, cerca de cinco milhões de árvores sintomáticas são destruídas anualmente (BRLANSKY; HARTUNG, 2002). Em pomares de laranja doce afetadas por CVC as perdas de produção podem chegar a 60-80% (BOVÉ; AYRES, 2007). Em citros, os sintomas da CVC incluem clorose internerval, redução no tamanho da folha, frutos duros e menores. Em folhas maduras, são observados ainda pequenos pontos marrons na face inferior, na região correspondente à área clorótica na face superior. Esta área pode, com a evolução da doença, tornar-se marrom escura ou necrótica (ALVES, 2003; ROSSETI et al., 1990). Os aspectos econômicos mais importantes da CVC dizem respeito à maturação precoce dos frutos com a redução do tamanho dos mesmos, e principalmente o enrijecimento da casca, que pode causar danos às máquinas utilizadas na produção de suco, tornando tais frutos não comercializáveis (BRLANSKY; HARTUNG, 2002).

O fitopatógeno *X. fastidiosa* é uma bactéria Gram negativa, sem motilidade e limitada ao xilema (ROSSETI et al., 1990; BRLANSKY; HARTUNG, 2002; CHEN et al., 2005). Ela é transmitida naturalmente por insetos sugadores (Hemíptera: Cicadellidae) que se alimentam da seiva bruta do xilema (PURCELL; HOPKINS, 1996; ROBERTO et al., 1996). Diferentemente de outras bactérias patogênicas tais como *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum* e *Pantoea stewartii*, as quais se espalham por toda a planta via vaso xilemático, a *X. fastidiosa* vive exclusivamente nos vasos xilemáticos, por isso os fatores de virulência são diferentes de outros patógenos vasculares que também interagem com tecidos vegetais (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008). Em citros essa bactéria é capaz de infectar especialmente laranja doce, mas é encontrada também em outros hospedeiros como tangerina, tangor, tangelo e limão (LARANJEIRA et al., 1998).

Segundo Alves (2003), ainda há divergências no que diz respeito ao modo de ação de *X. fastidiosa* causando patogênese em citros. Contudo, a hipótese mais aceita foi proposta por Hopkins (1989), o qual sugere que a infecção por *X. fastidiosa* leva a disfunções no sistema condutor de água em plantas de citros. O principal mecanismo de patogênese seria a falta de translocação de água e nutrientes resultando na oclusão de vasos do xilema por agregados bacterianos, devido à deposição de pectina e de goma fastidiana (SOUZA, 2002), em conjunto com reações de resistência da própria planta. A reação de resistência mais comum das plantas de citros à CVC é a formação de tiloses pelo hospedeiro, resultando em estresse hídrico (ALVES, 2003; FRY; MILHOLLAND, 1990). Outras reações também observadas de resistência da planta à entrada do patógeno bacteriano são: (a) formação de cristais de cálcio em vasos, que possivelmente levariam à destruição das membranas da pontuação, causando cavitação nos vasos com embolia (ALVES, 2003; SHULTZ; MATTHEWS, 1988); e (b) formação de agregados de células de *X. fastidiosa* com liberação de polissacarídeos extracelulares que facilitariam a adesão célula-célula (COSTERTON; IRVIN, 1981). De acordo com Alves (2003) e Leite, Leite Júnior e Ceresini (2002), a ocorrência de plantas com deficiências nutricionais, ainda que apresentem poucos vasos oclusos, pode ser devida à própria presença de agregados de *X. fastidiosa*. Tais agregados poderiam funcionar como uma rede atraindo íons nutrientes para si nessas plantas afetadas.

Os sintomas normalmente aparecem muitas semanas após a inoculação do patógeno e são visíveis no campo no fim do verão, quando há uma maior demanda de água pela planta que não é suprida devido à oclusão dos vasos. O desenvolvimento da doença depende da capacidade de disseminação do patógeno a partir do ponto de infecção. Em muitos casos, a disseminação da *X. fastidiosa* é mínima e esta se comporta como um endófito. A habilidade de disseminação do patógeno e a susceptibilidade do hospedeiro determinam a manifestação da doença (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008). Souza et al. (2005) apontam que a formação de biofilme por *X. fastidiosa* dentro dos vasos e o bloqueio no sistema de captação de água é a causa da patogênese dessa bactéria em citros. Outros autores sugerem que a interação entre *X. fastidiosa* e bactérias endofíticas pode resultar nos sintomas típicos da CVC (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; SANTOS, 2005).

Pesquisadores têm definido endófitos de várias formas, as quais dependem da perspectiva de onde esses organismos têm sido isolados e estudados (TAN; ZOU, 2001; LODEWYCKX et

al., 2002). De acordo com Strobel e Daisy (2003), bactérias endofíticas são aquelas isoladas de tecidos vegetais internos e que não causam dano imediato ao hospedeiro. Mais recentemente, Azevedo e Araújo (2007) definem endófitos como todos os microrganismos que habitam o interior da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou produzir estruturas externas visíveis.

O estudo da interação entre bactérias endofíticas e patógenos de citros teve início com pesquisas sobre a comunidade bacteriana de porta-enxerto de citros. As principais bactérias endofíticas isoladas foram *Alcaligenes* sp., *Bacillus* spp., *Burkholderia cepacia, Curtobacterium flaccumfaciens, Enterobacter cloacae, Methylobacterium extorquens,* e *Pantoea agglomerans* (ARAÚJO et al., 2001). Posteriormente, a associação entre a comunidade bacteriana endofítica de *C. sinensis* (laranja natal) e a presença de plantas resistentes a CVC, foi também avaliada por técnicas moleculares e microbiológicas (ARAÚJO et al., 2002). Os autores observaram que as bactérias endofíticas *C. flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* foram isoladas principalmente de plantas resistentes (assintomáticas ou escapes), enquanto que o gênero *Methylobacterium spp*. foi isolado principalmente de plantas afetadas pela CVC, sendo assim, pela primeira vez, foi cogitada a possibilidade do controle biológico da CVC por meio de bactérias isoladas de plantas assintomáticas, como a *M. mesophilicum* (isolado SR1.6/6). Recentemente, foram estabelecidas hipóteses a respeito da interação entre bactérias endofíticas e *X. fastidiosa* suportadas por experimentos *in silico, in vitro,* e *in planta* (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; SANTOS, 2005). Segundo os autores, a *X. fastidiosa* causando a CVC poderia influenciar no estabelecimento de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira. Essa hipótese seria endossada pela análise da diversidade de *Methylobacterium* spp. pois este gênero foi o mais freqüentemente isolado de plantas sintomáticas e em menor freqüência em plantas assintomáticas. Além disso, foi observado um efeito sinergístico de *Methylobacterium* spp. no crescimento de *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2004). Por outro lado, a presença das bactérias endofíticas *C. flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* em tecidos internos de plantas assintomáticas de citros, que hospedam *X. fastidiosa,* poderia estimular a produção de compostos ou elicitar, de alguma forma, um aumento na resistência destas plantas a *X. fastidiosa.* Assim, esses endófitos poderiam limitar o estabelecimento de *X. fastidiosa* em plantas assintomáticas. Contudo são necessários mais estudos para compreender os mecanismos envolvidos neste processo.

Em citros, *Methylobacterium* spp. têm sido consistentemente isoladas como endófitos (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004). Lacava (2000) e Lacava et al. (2004), em estudos

de interação *in vitro* entre *X. fastidiosa* e *Methylobacterium* spp. e *M. mesophilicum* isoladas endofiticamente de plantas assintomáticas de *Citrus* spp., observaram uma redução no crescimento desse fitopatógeno vascular. Estes resultados de interação *in vitro*, assim como os dados de isolamento de bactérias endofíticas de citros, realizados por Araújo et al. (2002) e Lacava et al. (2004), sugerem que a presença de *M. mesophilicum* e *X. fastidiosa* e suas concentrações dentro das plantas pode ser resultado de uma interação onde *X. fastidiosa* é inibida por *Methylobacterium* spp. durante o desenvolvimento de sintomas em plantas. Uma das hipóteses é a inibição da formação de biofilme por *X. fastidiosa* pela *M. mesophilicum* durante a colonização da planta.

Estudos de expressão gênica diferencial são de grande importância, pois permitem identificar quais genes são mais expressos ou suprimidos em uma determinada condição. Esses conhecimentos foram inicialmente adquiridos através de técnicas que analisavam as diferenças de expressão dos genes individualmente. A técnica de arranjos de DNA surgiu como ferramenta para monitorar a expressão gênica em larga escala, uma vez que permite avaliar simultaneamente o nível de expressão de milhares de genes, possibilitando a inferência de funções gênicas a partir da análise das variações globais observadas no transcriptoma da célula, revelando também interações entre diferentes vias de sinalização (HOFMANN, 2005).

Microarranjos de DNA têm sido úteis para desvendar os mecanismos de patogenicidade de bactérias fitopatogênicas (OKINAKA et al., 2002; SHI et al., 2009) e também para o estudo de interações benéficas entre bactérias e plantas (BECKER et al., 2004; VAN RIJ et al., 2005; YAN et al., 2010). No caso de *X. fastidiosa*, microarranjos de DNA têm sido importantes para comparar estirpes e espécies desse gênero mostrando diferenças entre espécies patogênicas e não patogênicas (KOIDE et al., 2004) e a ocorrência de transferência lateral de genes (DA SILVA et al., 2007; NUNES et al., 2003), além de caracterizar funções gênicas e rotas metabólicas envolvidas na virulência e formação de biofilme (SHI et al., 2007; SHI et al., 2009; DA SILVA NETO et al., 2008). No entanto, nenhum trabalho até o momento avaliou por meio de técnicas moleculares baseadas em expressão gênica, as respostas de bactérias fitopatogênicas à presença de bactérias endofíticas. Assim sendo, tendo em vista estudos anteriores, o presente trabalho busca avaliar a resposta de *X. fastidiosa* (9a5c) a *M. mesophilicum* (SR1.6/6), com o objetivo de propor mecanismos genético-moleculares envolvidos nesta interação no interior da planta hospedeira, preenchendo uma lacuna no conhecimento sobre as interações bacterianas no interior das plantas,

e em especial, a importância destas interações no desenvolvimento da CVC. Dessa forma, este projeto teve por objetivo identificar genes de *X. fastidiosa* expressos diferencialmente em co-cultivo com a bactéria endofítica *M. mesophilicum*, por meio da técnica de microarranjos de DNA e assim avaliar a resposta de *X. fastidiosa* (9a5c) a *M. mesophilicum* (SR1.6/6).

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

A linhagem 9a5c de *X. fastidiosa*, previamente isolada de *C. sinensis* (L.) Osbeck., foi crescida em meio PW (DAVIS; FRENCH; SCHAAD, 1981) enquanto que a linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum*, previamente isolada de *C. sinensis* (ARAÚJO et al., 2002), foi cultivada em meio SPW modificado (ARAÚJO et al., 2002). Ambas as bactérias foram cultivadas a 28ºC sob agitação (150 rpm) por até 96 horas.

4.2.2 Co-cultivo de *X. fastidiosa* e *M. mesophilicum*

Foi montado um experimento com 3 tratamentos: (1) SR1.6/6; (2) 9a5c; e (3) co-cultura de SR1.6/6- 9a5c. No tratamento de co-cultura o mesmo volume de cultura líquida de 9a5c e SR1.6/6 foram misturados (Figura 4.1) com aproximadamente o mesmo número de células em cada cultura, cerca de 10^8 células mL^{-1}. Sendo a densidade óptica $D.O._{600}$ de SR1.6/6 0,5 e a de 9a5c 0,3. Os três tratamentos foram mantidos por 24 horas a 28^oC com agitação de 150 rpm.

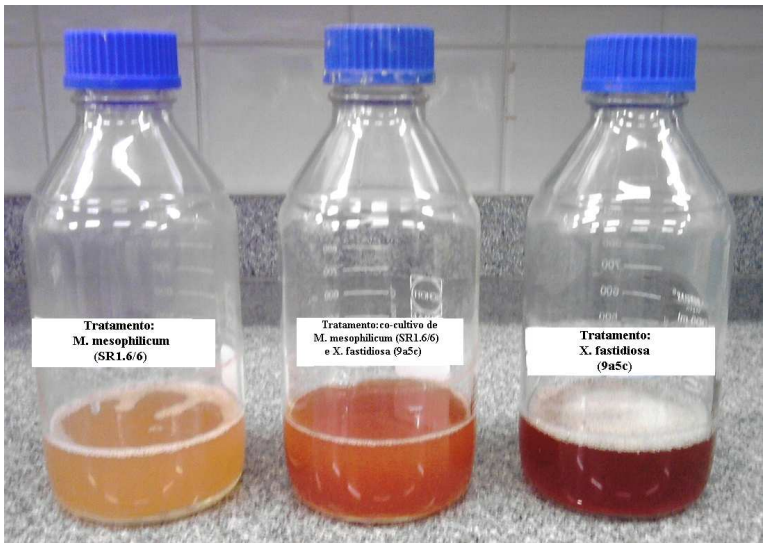

Figura 4.1 - Experimento montado um 250 mL de cultura líquida nos 3 tratamentos: (1) SR1.6/6; (2) co-cultura de SR1.6/6- 9a5c e (3) 9a5c

4.2.3 Extração de RNA total

Células bacterianas foram coletadas por centrifugação (15 minutos a 10000 g), e o RNA total foi extraído com 1 mL do reagente TRIzol® (Invitrogen), a mistura foi centrifugada a 12000 g por 15 minutos a 4ºC, coletou-se o sobrenadante e transferiu-se para novo tubos de eppendorf de 2 mL, foi adicionado 200 µL de clorofórmio (puro) em cada tubo, centrifugou-se novamente a 12000 g por 15 minutos a 4ºC. A fase aquosa foi, então, transferida para novo eppendorf de 1,5 mL já contendo o mesmo volume de isopropanol absoluto gelado. A amostra foi centrifugada a 12000 g e o *pellet* formado foi lavado uma vez com etanol 75% gelado e seco. Ao final, o RNA foi ressuspendido em 30 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) e armazenado a 80°C.

4.2.4 Avaliação da qualidade do RNA obtido

A integridade e quantificação do RNA extraído foram verificadas em gel desnaturante de agarose 1,2% em tampão FA 10X (MOPS 200 mM, acetato de sódio 50 mM e EDTA 10 mM), contendo formaldeído (0,7%) e brometo de etídio (0,3 µg mL^{-1} de gel) e comparado com o marcador. O gel foi equilibrado por 30 minutos em tampão FA 1X antes da corrida e 4 µL da suspensão de RNA mais 1 µL de *loading buffer* 5X foram aquecidos a 65°C por 5 minutos antes de serem aplicados no gel, e após a eletroforese, o gel foi fotodocumentado em luz UV. O RNA também foi quantificado por $D.O._{260}$, medida em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Todo o

material utilizado para a obtenção e tratamento de RNA foi esterilizado e/ou tratado com DEPC para eliminação de RNAse.

4.2.5 Purificação do RNA

Após a extração, o RNA foi purificado utilizando RNeasy Mini Kit (Quiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Essa etapa é necessária para a eliminação de pequenas quantidades de proteínas que possam ter permanecido na amostra, isolando apenas o RNA, o qual foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Nessa leitura, foi utilizada a razão das leituras 260nm/280nm como parâmetro para avaliação do grau de contaminação do RNA por proteínas, e as amostras que apresentaram razão entre 1,9 e 2,0 foram utilizadas para a obtenção de cDNA marcado com os fluoróforos (descrição abaixo).

4.2.6 Síntese de cDNA marcado com Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP para hibridação competitiva

A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada com 30 μg do RNA total de *X. fastidiosa* (9a5c) e do co-cultivo *X. fastidiosa* + *M. mesophilicum* pela incorporação de dCTP acoplado a um fluoróforo (Cy3 ou Cy5) na síntese da primeira fita de cDNA. A este RNA foi acrescentado um controle positivo, o RNA de lambda Q, juntamente com o *primer* de lambda Q e o *primer* randômico (dN6). O RNA foi desnaturado a 70ºC por 10 minutos, em seguida foram acrescidos tampão, dNTP com menos citosina, o fluoróforo (Cy3 ou Cy5) e a enzima SuperScript II (Invitrogen), a síntese da primeira fita ocorreu a 42°C por 2 horas, após a síntese do cDNA, o RNA restante foi degradado com 1M de NaOH. A purificação do cDNA para retirar os fluoróforos não incorporados foi realizada com o kit CyScribe GFX Purification (Amersham).

4.2.7 *Chip* do microarranjo de DNA

Foi utilizado o *biochip* Xf9a5c foi previamente construído no laboratório de Genômica do Núcleo Integrado de Biotecnologia-Universidade de Mogi das Cruzes. Foram espotados na lâmina de microarranjo 2205 fragmentos representativos do cromossomo de Xf9a5c e do plasmídeo pXF51 em duplicata, carregando cerca de 90% das ORF mais relevantes desse fitopatógeno. Como controle externo positivo, o gene Q do fago λ foi amplificado e distribuído em locais específicos por toda o *biochip*, como controle negativo foram utilizadas amostras constituídas apenas de solvente (sem DNA) (COSTA DE OLIVEIRA et al., 2002).

4.2.8 Hibridação de microarranjo de DNA em câmara úmida

As amostras de cDNA marcadas com Cy3 ou Cy5-dCTP, provenientes de duas condições experimentais testadas, foram ressuspendidas em 40µL de solução de hibridização 6X SSC (1X SSC contendo 0,15M NaCl e 0,015M citrato de sódio), 5X Solução de Denhardt's, 25 $mg.mL^{-1}$ de DNA de esperma de salmão, e 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS) e submetidas a hibridação com a lâmina de microarranjo a 42°C, por um período de 20 horas.

Foram realizadas duas marcações independentes nesse experimento, com inversão de fluoróforo ("Dye Swap"), ou seja, na primeira marcação foi utilizado Cy3 para amostra controle (*X. fastidiosa)* e Cy5 para o tratamento (*X. fastidiosa* em co-cultura com *M. mesophilicum*) e na segunda marcação foi utilizado Cy5 na amostra controle e Cy3 na tratada. Além disso, foi realizada a marcação do RNA de *M. mesophilicum* na lâmina de *X. fastiodiosa* para verificar se poderia ocorrer hibridação.

Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas, no qual cada etapa é repetida duas vezes. A primeira etapa foi realizada a 42°C em solução de média estringência contendo 0,5X SSC, 0,01% SDS, a etapa seguinte foi realizada com solução de alta estringência contendo 0,06X SSC, 0,01% SDS, a etapa final foi feita com 0,06X SSC. Cada etapa de lavagem foi constituída por 2 minutos e 30 segundos de incubação, de maneira que a lâmina permaneceu em contato com a solução de lavagem durante cinco minutos. Ao final da lavagem a lâmina foi seca por centrifugação a 106 g durante 2 minutos.

4.2.9 Aquisição e análise de imagens

O *biochip* hidratado foi submetido à detecção de fluorescência em *scanner* óptico GMS 418 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA), nos comprimentos de onda 532 nm e 635 nm para os fluoróforos Cy3 e Cy5, respectivamente, sendo que imagens independentes foram geradas para cada fluoróforo. Como os genes estão presentes em duplicata no *chip*, foram totalizadas 8 leituras para cada *spot*, sendo 4 leituras de cada condição (controle ou tratamento). Para a leitura, a potência do laser e o ganho do fotomultiplicador foram ajustados para minimizar o *background* e evitar a saturação de sinal em diferentes *spots* por excesso de mRNA da bactéria na amostra.

A quantificação dos valores de intensidade de cada *spot* foi realizada por meio de um processo de segmentação de histograma com o programa TIGR Spotfinder (v.3.1.1), o qual delimita a área dos *spots* a partir de uma imagem bruta. Um *grid* de identificação foi definido e

spots foram delimitados pela medida do raio (mínimo 15 e máximo 20). Os pontos pertencentes a cada *spots* foram identificados e quantificados, gerando para cada marcação (representado por um fragmento de DNA) um valor integrado de intensidade, descontando a fluorescência de fundo (background), descartando todos os sinais que apresentem valores medianos de intensidade inferiores ao observado para a fluorescência de fundo acrescido de dois desvios-padrão. Dados relativos a experimentos diferentes foram salvos em planilha gerada pelo programa TIGR Spotfinder (arquivo.MEV), para anotação de intensidade das leituras e controle de qualidade de cada hibridização.

Os arquivos.MEV produzidos para cada experimento foram compilados em um banco de dados e analisados pelo programa *Multi-Experiment Viewer - TIGR MEV* (v.3.1.1) que permite trabalhar simultaneamente com os resultados de várias hibridações, sejam elas réplicas de um mesmo experimento ou de múltiplos experimentos diferentes. Todos os programas utilizados neste projeto foram obtidos em http://www.tgr.org/software.

A variação do tratamento em relação ao controle foi mostrada em função do logaritmo na base 2 da razão das médias das intensidades de fluorescência entre Cy5 e Cy3. As diferentes réplicas do experimento foram normalizadas para que a intensidade de fluorescência em Cy3 corresponda ao controle e a intensidade de Cy5 ao tratamento. Dessa forma, quando o logaritmo é menor do que zero (Cy3>Cy5), indica um gene com sua expressão diminuída (ou sub-regulada) pelo tratamento, a representação na cor verde, sendo mais intensa quanto maior for a sub-regulação do gene, quando o logaritmo é maior que zero (Cy3<Cy5), indica um gene com sua expressão aumentada (ou super expresso) e é representada na cor vermelha, aumentando de intensidade proporcionalmente ao aumento da superexpressão do gene.

Os genes que apresentaram modulação estatisticamente significativa foram agrupados de acordo com o seu perfil de expressão. Inicialmente para definir o número ideal de grupos ("*clusters*") foi feita a análise por meio de um algoritmo conhecido como figura de mérito (FOM - "Figure Of Merit"). O algoritmo FOM é calculado considerando a variação média entre os valores de cada linha de super expressão ou sub regulação de um *cluster*. O operador indica no programa o número máximo de agrupamentos a serem calculados. O algoritmo divide os genes em números crescentes de *clusters*, começando por um e chegando ao número máximo fornecido pelo operador, agrupando-os por suas semelhanças na variação da expressão. Cabe ao operador

selecionar o número ideal de grupos, a partir da variação média da expressão entre os genes não diminui significativamente.

4.3 Resultados e Discussão

Em experimentos de microarranjos, a obtenção de RNA de boa qualidade é indispensável. Para os três tratamentos investigados neste trabalho (SR1.6/6, 9a5c e co-cultura SR1.6/6- 9a5c), as amostras apresentaram qualidade satisfatória, como pode ser observado a partir da integridade das bandas do RNA ribossômico 16S e 23S (Figura 4.2).

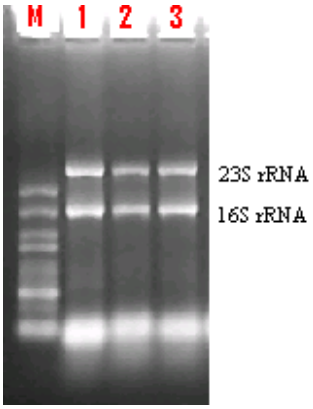

Figura 4.2 - Padrão de migração de RNA total de *X. fastidiosa* em eletroforese em gel de agarose desnaturante. M - Marcador 2 Kb. 1 - RNA de SR1.6/6. 2 - RNA de 9a5c. 3 - RNA da co-cultura de SR1.6/6- 9a5c

Foi observado que não ocorreu hibridação do RNA de *M. mesophilicum* marcado na lâmina de *X. fastiodiosa*, mostrando que os RNA de *M. mesophilicum* transcritos nessa condição não apresentam similaridade com as seqüências de DNA de *X. fastidiosa* utilizadas para a obtenção da lâmina de microarranjo. Os dados obtidos da hibridação de *X. fastidiosa* (com e sem *M. mesophilicum*) permitiram a identificação de 49 genes com expressão estatisticamente diferentes (análise por meio do Teste t) durante o co-cultivo *X. fastidiosa-M. mesophilicum*, sugerindo que podem estar associados à resposta de *X. fastidiosa* à presença da bactéria endofítica *M. mesophilicum*. Por meio da figura de mérito (Figura 4.3A), os genes diferencialmente expressos devem ser agrupados em 7 *clusters*, em seguida, foi realizada a clusterização hierárquica com o auxílio do algoritmo “K-means”, o qual gerou 7 *clusters* divididos de acordo com o padrão de expressão dos 49 genes (Figura 4.3B).

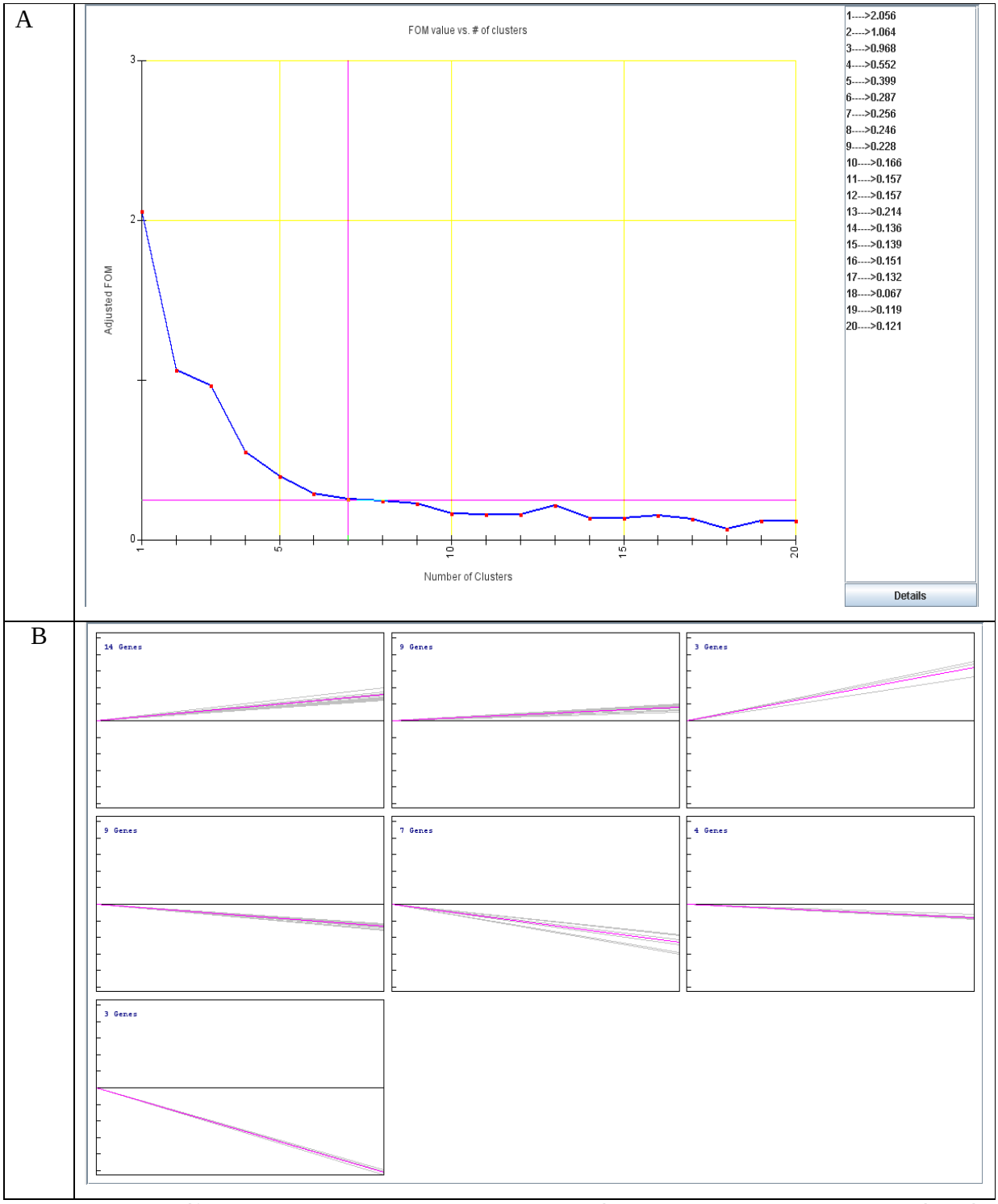

Figura 4.3 – (A) Gráfico gerado pelo algoritmo FOM – Figura de mérito. O valor representado no eixo y é a média entre as variações de expressão dos genes locados em cada cluster. No eixo x, está o número de *clusters* de 1 a 20. Na coluna à direita, é representada uma lista com os números de *clusters* em ordem crescente, e o valor médio obtido da variação de expresso entre os genes de cada um. O número de cluster selecionado pelo operador é mostrado no gráfico pelo cruzamento das ordenadas em rosa e (B) Agrupamento de 49 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 7 *clusters*

A seqüenciamento do genoma da *X. fastidiosa* 9a5c, agente causal da CVC, facilita a análise da interação desse patógeno com microrganismos endofíticos potenciais moduladores dos sintomas da CVC. A seqüência completa do genoma da estirpe *X. fastidiosa* 9a5c é composta de 2,679305 bp de cromossomo circular, com 52,7% de conteúdo GC, e dois plasmídeos de 51,158 bp e 1285 bp. Das 2904 *open reading frames* (ORF) descritas, 47% apresentam homologia a proteínas conhecidas e são descritas 147 ORF com funções de patogenicidade, virulência e adaptação (SIMPSON et al., 2000; LAMBAIS et al., 2000). Nesse trabalho foi utilizado um *chip* com cerca de 80% das ORF de *X. fastidiosa* (NUNES et al., 2003).

Os genomas dos fitopatógenos geralmente são menores devido ao seu estilo de vida, provavelmente são provenientes de bactérias de vida livre que se adaptaram ao interior das plantas e perderam genes. Entretanto, esse processo de especialização ainda não é bem compreendido (MIRA; KLASSON; ANDERSSON, 2002; MERHEJ et al., 2009). Devido a existência de um ancestral comum, a comparação de seqüências de diferentes genomas bacterianos mostra que há rotas metabólicas conservadas entre diferentes gêneros, como o sistema de sinalização DSF que é conservado entre espécies de bactérias, como *Xanthomona*s *campestris* e *X. fastidiosa*, e que está associado a mecanismos de patogenicidade (HE; ZHANG, 2008). Estes dados da literatura permitem comparar mecanismos de sinalização, patogênese e de interação de *X. fastidiosa* com outras bactérias por meio de mecanismos já descritos para outras espécies.

Em videiras (principalmente na Califórnia), os sintomas da doença de Pierce, também causada por *X. fastidiosa*, só ocorrem quando há falta de água, normalmente a necessidade hídrica é máxima na metade para o fim do verão, e quando há um alto número de células da bactéria na planta, impedindo a passagem de água pelo xilema (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008). Essa colonização do xilema pela *X. fastidiosa* ainda não é bem compreendida e, portanto, o entendimento dos mecanismos envolvidos com colonização pode contribuir na elucidação do desenvolvimento da doença e conseqüentemente a encontrar métodos de controle. Já foram relatadas a existência de várias plantas assintomática na presença de *X. fastidiosa* (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008) e a interação microbiana foi sugerida como um dos fatores que inibem a colonização de *X. fastidiosa* (ARAÚJO et al., 2002). Além disso, este estudo de expressão gênica embasa a nível molecular trabalhos anteriores de Araújo et al. (2002) e Lacava et al. (2004), que isolaram *M. mesophilicum* (SR1.6/6) de plantas assintomáticas e

posteriormente comprovaram *in vitro* que *M. mesophilicum* pode interferir de forma negativa no crescimento desse fitopatógeno vascular. Dessa forma, tendo em vista estes resultados anteriores, o presente trabalho buscar avaliar a resposta de *X. fastidiosa* (9a5c) a *M. mesophilicum* (SR1.6/6), com o objetivo de propor mecanismos genético-moleculares envolvidos nesta interação no interior da planta hospedeira. Nesse contexto, foi observado que os genes diferencialmente expressos pertencem a diferentes famílias gênica, com diferentes funções. O maior número de genes diferencialmente expressos estão relacionados ao metabolismo de DNA, RNA e proteína, seguido de proteínas hipotéticas e logo de genes relacionados à patogenicidade, virulência e adaptação (Figura 4.5 e Tabela 4.1).

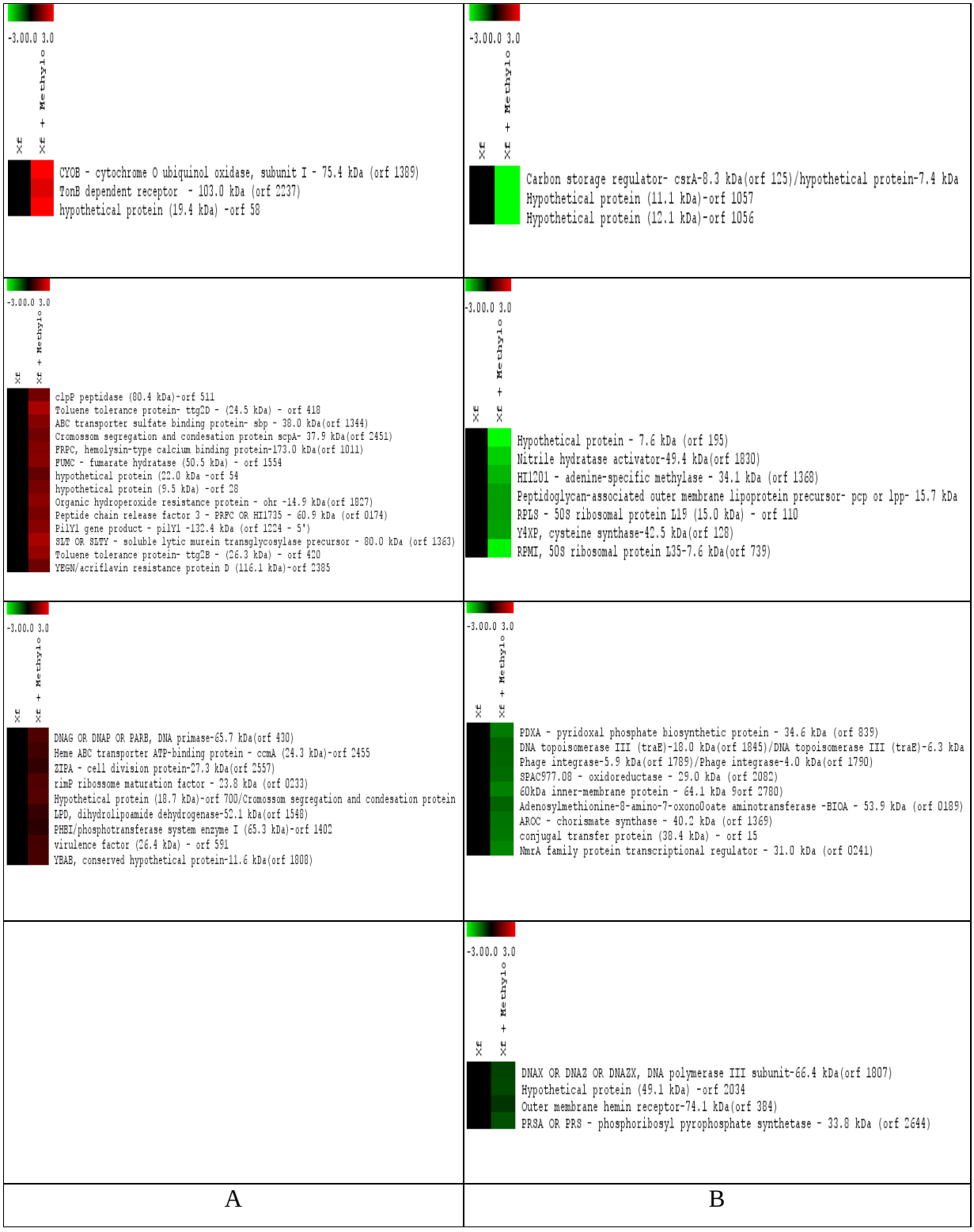

Figura 4.4 - Agrupamento de 49 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 7 "*clusters*". Cada "cluster" apresenta genes com padrão de expressão semelhantes. (A) Genes de *X. fastidiosa* super expressos no tratamento com *M. mesophilicum* e (B) genes de *X. fastidiosa* reprimidos no tratamento com *M. mesophilicum*

Tabela 4.1 – Relação de 49 genes com variação estatisticamente significativa classificados em oito categorias gênicas de acordo com http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf/. Os genes em vermelho foram super expressos e os em verde reprimidos em *X. fastidiosa* no tratamento em co-cultivo com *M. mesophilicum* (continua)

Classes	**Categoria gênica**		**Genes**	**Razão Xf+Mm/Xf**
I Metabolismo intermediário				
	Metabolismo de Carbono – Energia	Ciclo TCA	FUMC - fumarato hidratase (50.5 kDa) - orf 1554	1.6194202
		Ciclo TCA	LPD, dihidrolipoamida desidrogenase-52.1 kDa(orf 1548)	0.6590899
		Transporte de elétrons	CYOB - cytochromo O ubiquinol oxidase, subunidade I - 75.4 kDa (orf 1389)	3.5746431
		Transporte de elétrons	SPAC977.08 - oxidoreductase - 29.0 kDa (orf 2082)	-1.2750703
	Função regulatória		Regulador do estoque de carbono - csrA-8.3 kDa(orf 125)	-4.954483
			Atividor da hidratase da nitrila-49.4 kDa(orf 1830)	-2.4510627
II Biossintese de Pequenas Moléculas				
	Cofator	Biotina	8-amino-adenosilmetionina-7-oxonolato aminotransferase - BIOA - 53.9 kDa (orf 0189)	-1.1853067
		Piridoxina	PDXA -proteína biosintética de fosfato piridoxal - 34.6 kDa (orf 839)	-1.4434927
	Biossíntese de aminoácidos	amiacido aromático	AROC - chorismato sintase - 40.2 kDa (orf 1369)	-1.3695219
		Familia Glicina-serina	Y4XP, cisteina sintase-42.5 kDa(orf 128)	-1.9135294
	Biossíntese de nucleotídeos	Purinas	PRSA ou PRS - fosforibosil pirofosfato sintetase - 33.8 kDa (orf 2644)	-0.94446343
III Metabolismo de Macromoléculas				
	Metabolismo de DNA	Restrição/Modificação	HI1201 - metilase especifica de adenina - 34.1 kDa (orf 1368)	-2.148348
		Replicação	DNAG ou DNAP ou PARB, DNA primase-65.7 kDa(orf 430)	0.9398372
		Replicação	Segregação cromossomica e condensação da proteína scpA - 37.9 kDa(orf 2451)	1.3481789
		Replicação	DNA topoisomerase III (traE)-3.8 kDa(orf 1847)	-1.171989
		Replicação	DNAX ou DNAZ ou DNAZX, DNA polymerase III -66.4 kDa(orf 1807)	-0.78765035
	Metabolismo de RNA	Proteinas Ribossomais	RPLS - 50S proteína ribossomal L19 (15.0 kDa) - orf 110	-1.8595717
		Proteinas Ribossomais	RPMI, 50S proteína ribossomal L35-7.6 kDa(orf 739)	-2.8989055
		Transcrição do DNA	NmrA regulador transcripcionnal - 31.0 kDa (orf 0241)	-1.5789075
		Maturação e modificação dos ribossomos	rimP fator de maturação ribossomal - HI1282- 23.8 kDa (orf 0233)	0.9591459
	Metabolismo de proteina	Modificação e translação	Cadeia de liberação de peptídeo fator 3 - PRFC OR HI1735 - 60.9 kDa (orf 0174)	1.4547925
		Degradação da proteína	clpP peptidase (80.4 kDa)-orf 511	1.3658125
		Degradação da proteína	Proteína de transferência conjugal (38.4 kDa) - (orf 0015)	-1.408684

Tabela 4.1 – Relação de 49 genes com variação estatisticamente significativa classificados em oito categorias gênicas de acordo com http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf/. Os genes em vermelho foram super expressos e os em verde reprimidos em *X. fastidiosa* no tratamento em co-cultivo com *M. mesophilicum* (conclusão)

Classes	**Categoria gênica**		**Genes**	**Razão Xf+Mm/Xf**
IV Estrutura Celular				
	Estrutura de superfície		PilY1 produto genico- pilY1 -132.4 kDa (orf 1224 - 5')	1,6189611
	Componentes de Membrana	Outro constituinte de membrana	SLT ou SLTY - mureina litica solúvel precursor da transglicosilase - 80.0 kDa (orf 1363)	2,0029955
		Outro constituinte de membrana	Peptidoglicano- associado a receptor de membrana externa de lipoproteina - pcp or lpp- 15.7 kDa(orf 1547)	-1,8802352
		Outro constituinte de membrana	receptor hemina de membrana-74.1 kDa(orf 384)	-0,6212459
		Membrana interna	60kDa proteina de membrana interna - 64.1 kDa 9orf 2780)	-1,5237219
V Processos Celulares				
	Transporte	Ãnions	Transportador ABC proteina ligada ao sulfato- sbp - 38.0 kDa(orf 1344)	1,6055375
		Proteina, peptideos de secreção	Transportador Heme ABC/ proteina de ligação ATP - ccmA (24.3 kDa)-orf 2455	0,77919966
		Carboidrato/ácido organico/ alcoois	PHBI/sistema de fosfotransferase (65.3 kDa)-orf 1402	0,511184
	Divisão celular		ZIPA - proteina de divisão celular -27.3 kDa(orf 2557)	0,6199535
VI Elementos genéticos móveis				
	Funções relacionadas ao fago e profago		Phago integrase-5.9 kDa(orf 1789)	-1,2154113
VII Patogenicidade, virulencia e adaptação				
	Produção de toxinas e detoxificação	Transporte-outros	YEGN/proteina de resistência acriflavina (116.1 kDa)-orf 2385	1,3020734
			FRPC, proteína hemolisina-ligada ao cálcio-173.0 kDa(orf 1011)	1,5402875
			Proteína de resistência hidroperoxido orgânico- ohr -14.9 kDa(orf 1827)	1,6493855
			receptor dependente de TonB - 103.0 kDa (orf 2237)	2,6398678
	Adaptação, condição atípica		Proteína de tolerancia ao tolueno- ttg2B - (26.3 kDa) - orf 420	1,75569
			Proteína de tolerancia ao tolueno- ttg2D - (24.5 kDa) - orf 418	2,017376
	Outro		factor de virulência(26.4 kDa) - orf 591	0,81298685
VIII Proteína hipotética				
			Proteína hipotética- 7.6 kDa (orf 195)	-2,9974034
			Proteína hipotética (11.1 kDa)-orf 1057	-5,2903037
			Proteína hipotética (12.1 kDa)-orf 1056	-5,0500865
			Proteína hipotética (49.1 kDa)-orf 2034	-0,85833573
			Proteína hipotética (9.5 kDa) - orf 0028	1,4203246
			Proteína hipotética (18.7 kDa)-orf 700	1,010623
			Proteína hipotética (19.4 kDa) - orf 0058	3,4253116
			Proteína hipotética (22.0 kDa) - orf 0054	1,2025653
			Proteína hipotética-11.6 kDa(orf 1808)	0,85570693

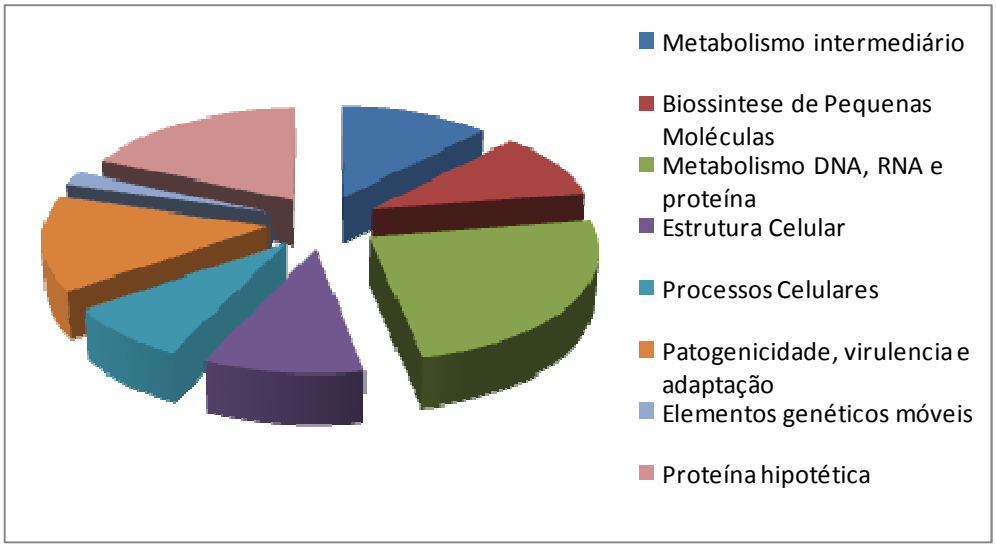

Figura 4.5 - Representação gráfica da distribuição das funções presumidas pelos genes estatisticamnete diferencialmente expressos de *X. fastidiosa* na presença de *M. mesophilicum*

Na presente análise, foi possível observar um aumento nos níveis de expressão de genes relacionados à geração de energia em *X. fastidiosa*, como por exemplo os genes codificadores de fumarato hidratase e dihidrolipoamido desidrogenase do ciclo de Krebs (Tabela 4.1 e Figura 4.4), durante o co-cultivo com *M. mesophilicum*. O ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido tricarboxílico, engloba uma sucessão de oxidações que resulta na geração de energia para a célula. Diferentes enzimas participam desse ciclo, entre elas, a enzima fumarato hidratase que cataliza reações envolvendo a captura de H_2 exógeno na redução do fumarato como aceptor de elétron exógeno (LIN; IUCHI, 1991), que cataliza a hidratação do fumarato a L-malato. Além disso, o fumarato ativa o motor do flagelo bacteriano, além de que em *Escherichia coli*, *Halobacterium salinarum* e *Salmonella typhimurium*, o fumarato é essencial na mudança da rotação flagelar do sentido anti-horário para o sentido horário (VAN VUGT-LUSSENBURG et al., 2009). A enzima dihidrolipoamido desidrogenase (LPD) também é essencial para o funcionamento adequado do ciclo de Krebs. Em mutantes do gene lipoamido desidrogenase, o nível de fumarase foi diminuído pela metade, indicando que LPD participa da produção de fumarato na célula (ROY; DAWES, 1987). Em contraste, genes de armazenagem de carbono tais como a ORF125 (gene regulador do estoque de carbono) foram reprimidos em *X. fastidiosa* durante o co-cultivo com *M. mesophilicum*. Este resultado sugere que, embora ocorra um aumento no metabolismo de *X.*

fastidiosa, durante a interação com *M. mesophilicum*, este fitopatógeno deve alocar esta energia para o metabolismo de proteção, diminuindo o seu armazenamento, provavelmente em resposta ao estresse causado pela presença da bactéria endofítica.

Foi observado também, como o resultado da interação com *M. mesophilicum*, ocorreu uma mudança nos níveis de expressão de genes que codificam proteínas associadas à formação de biofilmes. Em geral foi observado superexpressão do gene *clp* peptidase na presença da bactéria endofítica, fato este que pode resultar na diminuição da formação de biofilme. O produto de gene *clp peptidase* quebra a proteína CLP, a qual é um regulador com domínio de ligação de DNA e está associado à regulação de uma série de genes envolvidos com a formação de biofilme (Figura 4.6). Em *Xanthomonas campestris* foi descrito que a mutação no gene que codifica o CLP diminui a síntese de EPS (exopolissacarídeos) e celulase extracelular. Dessa forma, espera-se que *X. fastidiosa* com repressão do gene *clp peptidase* deve apresentar um menor crescimento na planta, visto que não deverá produzir EPS para formação de biofilmes. Tem sido observado que mutantes para o gene *clp* apresentam fenótipos similares aos mutantes relacionados ao sistema de sinalização -DSF (*diffusible signal factor*) (HE et al., 2007), visto que a expressão deste gene *clp* é influenciada pelos genes relacionados ao DSF e dependente do componente de dois sistemas sensor e regulador RpfC e RpfG, respectivamente, isso sugere que CLP desempenhe um papel fundamental na rota regulatória de DSF (Figura 4.6). Além disso, análises de microarranjo mostram que reguladores de DSF e CLP apresentam padrões de expressão similares (HE et al., 2007). Porém, não está claro como o CLP detecta e responde aos sinais do regulador RpfG. (HE; ZANG, 2008). Dessa forma, os resultados sugerem que no interior da planta, a presença de *M. mesophilicum* pode induzir uma menor formação de biofilme, com conseqüente maior disseminação na planta. Entretanto, tendo em vista que a patogênese de *X. fastidiosa* está associada à interrupção de água e íons no xilema da planta hospedeira (LAMBAIS et al., 2000; SOUZA, 2002), a presença de *M. mesophilicum* poderia diminuir a intensidade dos sintomas.

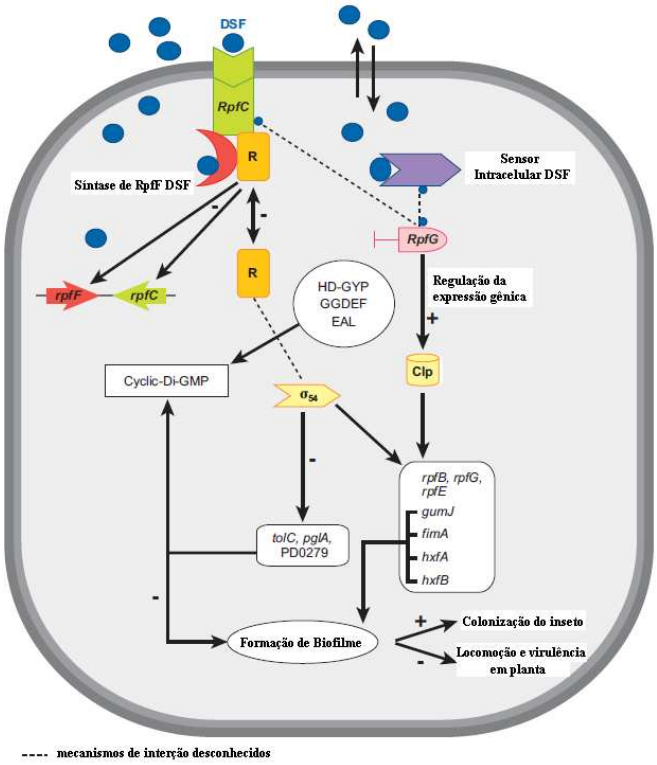

Figura 4.6 - Um modelo proposto para a sinalização celular DFS em *X. fastidiosa*. *rpfF* codifica o DSF sintase, *rpfC* codifica um híbrido de dois componente sensores de DSF. A concentração de DSF regula negativamente a expressão de *rpfF*. O DSF se liga ao sensor de dois componentes que induz a autofosforilação e fosforila o regulador de dois componentes, como RpfG, que regula positivamente os genes necessários para a adesão e formação de biofilme (*hxfA*, *hxfB*, *fimA* e *gumJ*) modulando reguladores transcricionais como -sigma 54 ou CLP. O repressor "R" possivelmente reprime genes de virulência tais como *tolC*, *pglA*, e PD0279 (codifica proteína do domínio GGDEF), que é necessária para colonização e a movimentação de *X. fastidiosa* na planta (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008)

Além disso, tendo em vista que foi observado repressão dos genes ribossomais 50S e topoisomerase III, envolvidos com o crescimento de *X. fastidiosa*, durante a interação com *M. mesophilicum* (Tabela 4.1 e Figura 4.4), pode ser sugerido que ocorra uma diminuição da densidade de *X. fastidiosa* na planta. As proteínas ribossomais 50S participam da síntese protéica da célula (BROUWER; PLANTA, 1973) e a enzima topoisomerase é essencial para a replicação do DNA circular, já que é responsável por evitar o superenrolamento gerado pela forquilha de replicação. Hiasa e Marians (1994) mostraram que apenas a topoisomerase III é capaz de suportar a elongação da cadeia nascente durante a replicação do DNA tão eficientemente quanto a enzima girase. Com base nisso, é possível sugerir que *M. mesophilicum* inibe o crescimento de *X. fastidiosa* e formação de biofilmes, resultando também em um menor nível de sintomas na planta hospedeira.

Newman et al. (2008) mostraram que a severidade de diferentes doenças (inclusive a doença de Pierce em videira que apresenta *X. fastidiosa* como agente causal) pode ser reduzida quando o patógeno é co-inoculado com uma bactéria que degrada DSF, mostrando o papel desta molécula para a ativação de genes de patogênese. Neste trabalho não foi estudado os genes de *M. mesophilicum* durante a interação, portanto não foi observado genes de *M. mesophilicum* responsáveis pela degradação de DSF produzidos pela *X. fastidiosa*, que poderiam ocorrer durante a interação *M. mesophilicum*- *X. fastidiosa*, além da superexpressão da *clp* petidase, que também resulta em um menor nível de expressão nesta via de formação de biofilmes.

Genes relacionados ao estresse ambiental foram superexpressos em *X. fastidiosa* na presença de *M. mesophilicum*, tais como os genes *pil*Y, *ton*B, da família de transportadores de membrana, de resistência a acriflavina e tolerância ao tolueno, todos são ativados pelo estresse ambiental (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008; CURSINO et al., 2009; HE et al., 2006; LAMBAIS et al., 2000; LLAMAS et al., 2009; SIMPSON et al., 2000). Dessa forma, pode ser sugerido que a presença de *M. mesophilicum* gera estresse em *X. fastidiosa*. Este fitopatógeno é uma bactéria não flagelada que coloniza o xilema de forma eficiente, para isso deve se movimentar pelos vasos xilemáticos (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008). A análise do genoma de *X. fastidiosa* revelou a presença de genes ortólogos que codificam proteínas envolvidas na biogênese e função do pili tipo IV que codifica um sistema de quimiotaxia relacionado ao direcionamento ou controle da motilidade em resposta a variação ambiental (LAMBAIS et al., 2000), esse pili está localizado em um pólo da célula. Além do pili longo, está relacionado à motilidade e migração, *X. fastidiosa* também apresenta o pili curto (pili tipo I) que está envolvido na adesão e formação de biofilme (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008).

Mutantes *pil*Y de *X. fastidiosa* apresentam motilidade reduzida (LI et al., 2007) demonstrando que *pilY* está envolvido na formação de pili longo do tipo IV, e este atua na motilidade bacteriana. No presente estudo, a expressão do gene *pil*Y de *X. fastidiosa* foi ativado quando este patógeno foi co-cultivado com *M. mesophilicum* (Tabela 4.1 e Figura 4.4), indicando que este gene pode participar da interação com outros microrganismos no interior da planta hospedeira. A ativação desse gene poderia provocar a dispersão do patógeno pelos vasos do xilema, fato este corroborado com a possível redução do biofilme bacteriano.

A homeostase de ferro é um fator importante para a regulação da expressão de genes envolvidos na patogenicidade da bactéria. Diferentes tipos de sideróforos são responsáveis pela

aquisição de ferro pelo patógeno (LAMBAIS et al., 2000). O produto do gene *ton*B é uma proteína de membrana que transporta ativamente complexos do sideróforos - ferro e vitamina B12 para dentro da célula de bactérias Gram negativas. O complexo TonB é formado pelas proteínas ExbB, ExbD e TonB. TonB é ancorado na região N-terminal da membrana citoplasmática e se estende ao periplasma, assumindo uma conformação energizada que interage com o receptor da membrana externa e leva a mudanças conformacionais que abrem o canal receptor para o transporte de ferro ou vitamina B12 (CURSINO et al., 2009). Recentemente, Schauer, Rodionov e Reuse (2008) relataram que outras moléculas como metais, açúcares e oligossacarídeos que necessitam de transporte ativo também utilizam o transportador TonB para ser internalizada.

Na análise do genoma de *X. fastidiosa*, apesar da anotação de vários homólogos a *ton*B, as funções não foram bem elucidadas. Cursino et al. (2009) descreveram que uma mutação no gene *ton*B1 de *X. fastidiosa* resultou na perda da motilidade e diminuição significativa na formação de biofilme quando comparada à linhagem selvagem; essa mutação afetou também a virulência da bactéria. Llamas et al. (2009) descreveram a proteína TonB receptor de membrana do sistema *cell-surface signaling* (CSS) um mecanismo regulatório de *quorum sensing* utilizado pela bactéria para perceber os sinais do meio extracelular no citoplasma. Entretanto, apenas as proteínas TonB dependente de transdutores estão envolvidas no sistema CSS. Portanto, além da função conhecida de captação de ferro, a proteína TonB é responsável pela transdução de sinal, efluxo de solventes orgânicos, motilidade e formação de biofilme pela bactéria e conseqüentemente pela virulência. Na presença de *M. mesophilicum*, a bactéria *X. fastidiosa* teve a expressão do gene codificador da proteína TonB aumentada (Tabela 4.1 e Figura 4.4) sugerindo que *X. fastidiosa*, durante a interação com *M. mesophilicum*, ativa genes de motilidade (como ocorreu também no aumento da expressão do gene *pilY* descrito acima) e genes relacionados ao transporte de moléculas, para a maior captação de nutrientes pelo patógeno, conferindo assim vantagens na competição por nutrientes.

Após a análise de diferentes estirpes de *X. fastidiosa*, curiosamente, foi observado que não há o maquinário do sistema de secreção do tipo III, esse sistema é muito diverso em patógeno, podendo não ser encontrados genes homólogos aos já descritos em *X. fastidiosa*. O papel principal desse sistema é o combate pelo patógeno do sistema de defesa da planta (SIMPSON et al., 2000). Buscando genes que poderiam desempenhar o papel do sistema de secreção do tipo III, Meidanis, Braga e Verjovski-Almeida (2002) analisaram os genomas de diferentes estirpes de *X. fastidiosa* e

encontraram 23 transportadores da superfamília ABC, do sistema de secreção do tipo I, que estão envolvidos em vias de resistência a múltiplas drogas, secreção de hemolisinas e até respostas de resistência de *X. oryzae* pv. *oryzae* à arroz, mas ainda não se sabe se é utilizado o sistema de secreção tipo I para secreção de efetores ou toxinas que desencadeiem sintomas da doença ou modulem o sistema de defesa da planta (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008). Neste contexto, as ORF 1344 e 2455 da superfamília de transportadores ABC foram superexpressas na *Xylella* em co-cultivo com *M. mesophilicum*. Estes transportadores estão presentes em diferentes formas e usam a energia liberada pela hidrólise do ATP para promover o transporte ativo de substâncias pela membrana citoplasmática, sendo que alguns sistemas capturam enquanto outros exportam moléculas. Os sistemas ABC de captura foram classificados em nove sistemas: membros para importar o açúcar, o glutamato e outros aminoácidos polares, aminoácidos hidrofóbico, sulfato, fosfato, vitamina B12, níquel e bicarbonato (MEIDANIS; BRAGA; VERJOVSKI-ALMEIDA, 2002). Portanto, quatro genes do sistema de transporte celular foram superexpressos em *Xylella* na presença do endófito (Tabela 4.1 e Figura 4.4), sugerindo que haja um aumento na produção de moléculas de resistência a múltiplas drogas (como o tolueno e a acriflavina, descritos a seguir), a secreção de hemolisinas e respostas de resistência da *X. fastidiosa* a *M. mesophilicum*.

O sistema fosfotransferase (a qual pertencem a ORF1402) e outros transportadores relacionados a ligação fosfato (ORF1224-5´) também foram super expressos no tratamento em co-cultivo com endófito. O sistema fosfotransferase tem sido descrito em diferentes bactérias e é utilizado principalmente para importar carboidratos para dentro das células (MEIDANIS; BRAGA; VERJOVSKI-ALMEIDA, 2002), reforçando a hipótese de aumento do metabolismo de *X. fastidiosa* em interação com *M. mesophilicum*. O reconhecimento do patógeno pela planta ativa um conjunto de mecanismos de defesa, que incluem a superexpressão de genes de estresse. Neste contexto, foi observado um aumento da expressão de genes de resistência a acriflavina (proteína YEGN), tolueno (genes *ttg2*B e *ttg2*D) e hidroxiperóxido (*ohr*) (Tabela 4.1 e Figura 4.4). Esses genes são ativados por sinais mediados pela molécula DSF, a qual possui um papel fundamental na adaptação da bactéria no ambiente estressante dentro da planta (HE et al., 2006). Bactérias Gram negativas, como *Pseudomonas* e *E. coli* apresentam mecanismos de tolerância a solventes orgânicos como tolueno, tais como: (1) modificações no envelope celular que aumentam a rigidez da membrana celular e diminuem a permeabilidade como (a) isomerização *cis-trans* da membrana

dos ácidos graxos pela isomerase *cis-trans*, (b) diminuição da hidrofobicidade da superfície celular e (c) mudanças na composição e proporção de lipídeos e proteínas na membrana; (2) aumento da taxa de enzimas reparadoras de membranas; (3) solvente que inativa enzimas; (4) efluxo ativo de solventes por bombas de solventes (genes *tol C/mar/rob/sox S/acr AB*); (5) liberação de vesículas da membrana com solventes e (6) produção de proteínas fagos de choque (proteínas de estresse em *E. coli*) (SARDESSAI; BHOSLE, 2002). O padrão de expressão do patógeno *Xylella* na presença de *Methylobacterium* é semelhante ao padrão de expressão da *Xylella* na presença de tolueno, já que o aumento da demanda de energia devido ao estresse causado pelo tolueno resulta em mudanças transcricionais, genes envolvidos na armazenagem de açúcar são reprimidos, enquanto genes envolvidos na geração de energia são ativados na presença de tolueno, genes relacionados a flagelos tem sua expressão aumentada (VOLKERS et al., 2009). Assim, o endófito apresenta o mesmo efeito que o estresse causado pelo tolueno, diferindo apenas em relação à expressão de genes transportadores em que na presença de *Methylobacterium* esses genes tem sua expressão aumentada (Tabela 4.1 e Figura 4.4) e na presença de tolueno reprimida. Isso indica que *M. mesophilicum* induz um resposta de *X. fastidiosa*, semelhante àquela observada em resposta ao solvente orgânico tolueno, sugerindo um mesmo padrão de resposta. Os transportadores da família ABC, também superexpressas na presença de *M. mesophilicum*, está relacionada à resistência ao tolueno, esse é capturado pelo sistema de transporte da família ABC (VOLKERS et al., 2009), corroborando a hipótese proposta.

Portanto, a análise da expressão dos genes diferencialmente expressos em *X. fastidiosa* sugere que *M. mesophilicum* induz a expressão de um conjunto de genes de defesa, superexpressando genes do ciclo de Krebs e reprimindo genes relacionados ao estoque de carbono, ribossomos e topoisomerases, diminuindo assim seu crescimento e direcionando grande parte de sua energia para o sistema de defesa da bactéria. Além disso, a superexpressão dos genes que codificam proteínas transportadoras, proteína PILY, proteína TONB, proteínas de resistência a acriflavina e proteínas de tolerância ao tolueno mostram que a bactéria *M. mesophilicum* induz também uma resposta de estresse. Também foi observado uma ativação da expressão do gene *clp*P, o qual pode interferir na via de formação de biossíntese de *X. fastidiosa*, sugerindo que deve haver uma redução da formação de biofilme e por conseguinte a virulência do patógeno. Estes resultados confirmam a hipótese, sugerida por Araújo et al. (2002) e Lacava et al. (2004) de que

M. mesophilicum pode inibir o crescimento de *X. fastidiosa* e, conseqüentemente reduzindo os sintomas da CVC na planta hospedeira.

Referências

ALVES, E. ***Xylella fastidiosa*: Adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno.** 2003. 146p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JÚNIOR, 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 JÚNIOR, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial population and interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.4906-4914, 2002.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Eds.) **Fungi:** multifaceted microbes, New Delhi: CRC Press, 2007. p.189-207.

BECKER, A.; BERGÈS, H.; KROL, E.; BRUAND, C.; RÜBERG, S.; CAPELA, D.; LAUBER, E.; MEILHOC, E.; AMPE, F.; DE BRUIJN, F.J.; FOURMENT, J.; FRANCEZ-CHARLOT, A.; KAHN, D.; KÜSTER, H.; LIEBE, C.; PÜHLER, A.; WEIDNER, S.; BATUT, J. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021under microoxic and symbiotic conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.17, p.292-303, 2004.

BOVÉ, J.M.; AYRES, A.J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **IUBMB life**, Oxorfd, v.59, p.346-354, 2007.

BRLANSKY, R.H.; HARTUNG, J.S. Transmission of the citrus variegated chlorosis bacterium *Xylella fastidiosa* with the sharpshooter *Oncometopia nigricans.* **Plant Disease,** Saint Paul, v.86, p.1237-1239, 2002.

BROUWER, J.; PLANTA, R.J. Structural heterogeneity of 30s and 50S ribosomal subunits in *Bacillus licheniformis.* **Molecular Biology Reports,** Dordrecht, v.1, p.135-142, 1973.

CHEN, J.; CIVEROLO, E.L.; JARRET, R.L.; VAN SLUYS, M.A.; OLIVEIRA, M.C. Genetic discovery in *Xylella fastidiosa* through sequence analysis of selected randomly amplified polymorphic DNAs. **Current Microbiology**, New York, v.50, p.78-83, 2005.

COSTA DE OLIVEIRA, R.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; LEITE, D.B.; DE SOUZA, A.A.; COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; NUNES, L.R. Competitive hybridization on

spotted microarrays as a tool to conduct comparative genomic analyses of *Xylella fastidiosa* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.216, p.15-21, 2002.

COSTERTON, J.W.; IRVIN, R.T. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.35, p.299-324, 1981.

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R.P.P.; LINDOW, S. Living in twoWorlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.46, p.243-271, 2008.

CURSINO, L.; LI, Y.; ZAINI, P.A.; FUENTE, L.; HOCH, H.C.; BURR, T.J. Twitching motility and biofilm formation are associated with tonB1 in *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters,** Amsterdam, v.299, p.193-199, 2009.

DA SILVA, V.S.; SHIDA, C.S.; RODRIGUES, F.B.; RIBEIRO, D.C.; DE SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; NUNES, L.R.; DE OLIVEIRA, R.C. Comparative genomic characterization of citrus-associated *Xylella fastidiosa* strains. **BioMed Central Genomics,** London, v.8, 2007. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/474>. Acesso em: 22 mar. 2010.

DA SILVA NETO, J.F.; KOIDE, T.; ABE, C.M.; GOMES, S.L.; MARQUES, M.V. Role of sigma54 in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *Xylella fastidiosa*. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.189, p.249-261, 2008.

DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, New York, v.5, p.311-316, 1981.

DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G.H.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; DE OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.16, p.867-875, 2003.

FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, Lancaster, v.80, p.61-65, 1990.

FUNDECITROS, 2009. Disponível em: <http:// www.fundecitros.com.br>. Acesso em: 9 jan. 2009.

HE, Y.W.; XU, M.; LIN, K.; NG, Y.J.A.; WEN, C.M.; WANG, L.H.; LIU, Z.D.; ZHANG, H.B.; DONG, Y.H.; DOW, J.M.; ZHANG, L.H. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. c*ampestris*: identification of novel cell-cell communication dependent genes and functions. **Molecular Microbiology,** Oxford, v.59, p.610-622, 2006.

HE, Y.W.; NG, A.Y.J.; XU, M.; LIN, K.; WANG, L.H.; DONG, Y.H.; ZHANG, L.H. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.64, p.281–292, 2007.

HE, Y.W.; ZHANG, L.H. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.32, p.842-857, 2008.

HIASA, H.; MARIANS, K.J. Topoisomerase III, but Not Topoisomerase I, can support nascent chain elongation during Theta-type DNA replication. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.269, p.32655-32659, 1994.

HOFMANN, B. DNA microarrays. **Nephron Physiology**, Basel, v.99, p.85-89, 2005.

HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.27, p.271-290, 1989.

KOIDE, T.; ZAINI, P.A.; MOREIRA, L.M.; VÊNCIO, R.Z.; MATSUKUMA, A.Y.; DURHAM, A.M.; TEIXEIRA, D.C.; EL-DORRY, H.; MONTEIRO, P.B.; DA SILVA, A.C.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DA SILVA, A.M.; GOMES, S.L. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.186, p.5442-5449, 2004.

LACAVA, P.T. **Isolamento, caracterização genética por RAPD e resistência a antibióticos em *Xylella fastisdiosa***. 2000. 108p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

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

LAMBAIS, M.R.; GOLDMAN, M.H.S.; CAMARGO, L.E.A.; GOLDMAN, G.H. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.3, p.459-462, 2000.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JÚNIOR, J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J.O.; CARVALHO, S.A.; COLLETA FILHO, H.D. Cultivares e espécies cítrica hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.147-154, 1998.

LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JÚNIOR, R.P.; CERESINI, P.C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v.22, p.54-57, 2002.

LLAMAS, M.A.; VAN DER SAR, A.; CHU, B.C.H.; SPARRIUS, M.; VOGEL, H.J.; BITTER, W. A Novel Extracytoplasmic Function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Public Library of Science Pathogens**, San Francisco, v.5, 2009. Disponível em:

<http://www.plospathogens.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000572>. Acesso em: 22 mar. 2010.

LI, Y.; HAO, G.; GALVANI, C.D.; MENG, Y.; FUENTE, L.; HOCH, H.C.; BURR, T.J. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. **Microbiology**, Reading, v.153, p.719-726, 2007.

LIN, E.C.C.; IUCHI, S. Regulation of gene expression in fermentative and respiratory systems in *Escherichia coli* and related Bacteria. **Annual Review of Genetics**, California, v.25, p.361-387, 1991.

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

MEIDANIS, J.; BRAGA, M.D.V.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Whole-Genome Analysis of transporters in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.66, p.272-299, 2002.

MERHEJ, V.; ROYER-CARENZI, M.; PONTAROTTI, P.; RAOULT, D. Massive comparative genomic analysis reveals convergent evolution of specialized bacteria. **Biology Direct**, London, v.4, 2009. Disponível em: <http://www.biology-direct.com/content/4/1/13>. Acesso em: 22 de mar. 2010.

MIRA, A.; KLASSON, L.; ANDERSSON, S.G. Microbial genome evolution: sources of variability. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.5, p.506-512, 2002.

NEVES, E.M. Situação atual e perspectivas da citricultura no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE CITRICULTURA, 3., 2008, Piracicaba. **Resumos…** Piracicaba: ESALQ, 2008, p.15-20.

NEWMAN, K.L.; CHATTERJEE, S.; HO, K.A.; LINDOW, S.E. Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.21, p.326–334, 2008.

NUNES, L.R.; ROSATO, Y.B.; MUTO, N.H.; YANAI, G.M.; DA SILVA, V.S.; LEITE, D.B.; GONÇALVES, E.R.; DE SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; LOPES, S.A.; DE OLIVEIRA, R.C. Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. **Genome Research**, Woodbury, v.13, p.570-578, 2003.

OKINAKA, Y.; YANG, C.H.; PERNA, N.T.; KEEN, N.T. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.15, p.619-629, 2002.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial pathogen. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p.131-151, 1996.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, S.E.O.; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarinhas *Dilobopterus costalimai, Acrogonia terminalis e Oncometopia fascialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v.21, p.517-518, 1996.

ROSSETI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. Présence des bactéries dans le xyléme dóranges atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Comptes Rendus de l'Academie des Science des Paris**, Paris, v.310, p.345-349, 1990.

ROY, D.J.; DAWES, I.W. Cloning and characterization of the gene encoding lipamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae.* **Journal of General Microbiology**, Reading, v.133, p.925-933, 1987.

SANTOS, L.C. **Produção de bacteriocinas por endófitos de citros e caracterização da endoficina de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofítico**. 2005. 121p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SARDESSAI, Y.; BHOSLE, S. Tolerance of bacteria to organic solvents. **Research in Microbiology**, Paris, v.153, p.263-268, 2002.

SCHAUER, K.; RODIONOV, D.A.; DE REUSE, H. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v.33, p.330-338, 2008.

SHI, X.Y.; DUMENYO, C.K.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; AZAD, H.; COOKSEY, D.A. Characterization of regulatory pathways in *Xylella fastidiosa*: genes and phenotypes controlled by *alg*U. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.73, p.6748-6756, 2007.

SHI, X.Y.; DUMENYO, C.K.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; AZAD, H.; COOKSEY, D.A. Characterization of regulatory pathways in *Xylella fastidiosa*: genes and phenotypes controlled by *gacA.* **Applied and Environmental Microbiology,** Baltimore, v.75, p.2275-2283, 2009.

SHULTZ, H.A.; MATTHEWS, M. A. Resistance to water transport in shoots of *Vitis vinifera* L. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, p.718-724, 1988.

SIMPSON, A.J.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature,** London, v.406, p.151–159, 2000.

SOUZA, L.A. **Produção e caracterização de mutantes do operon gum de *Xylella fastidiosa*.** 2002. 96p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; PEREIRA, E.O.; COLETTA-FILHO, H.; MACHADO, M.A. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa in vitro* and *in planta*. **Current Microbiology**, New York, v.50, p.223-228, 2005.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.67, p.491-502, 2003.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports,** Pittsburgh, v.18, p.448-459, 2001.

YAN, Y.; PING, S.; PENG, J.; HAN, Y.; LI, L.; YANG, J.; DOU, Y.; LI, Y.; FAN, H.; FAN, Y.; LI, D.; ZHAN, Y.; CHEN, M.; LU,W.; ZHANG, W.; CHENG, Q.; JIN,Q.; LIN, M. Global transcriptional analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. **BioMed Central Genomics**, London, v.11, 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/11>. Acesso em: 22 mar. 2010.

VAN RIJ, E.T.; GIRARD, G.; LUGTENBERG, B.J.J.; BLOEMBERG, G.V. Influence of fusaric acid on phenazine-1-carboxamide synthesis and gene expression of *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL139. **Microbiology**, Reading, v.151, p.2805-2814, 2005.

VAN VUGT-LUSSENBURG, B.M.A.; VAN DER WEEL, L.; HAGEN, W.R.; HAGEDOORN, P.L. Identification of two [4Fe-4S] cluster containing hydro-lyases from *Pyrococcus furiosus.* **Microbiology,** Reading, v.155, p.3015-3020, 2009.

VOLKERS, R.J.M.; BALLERSTEDT, H.; RUIJSSENAARS, H.; DE BONT, J.A.M.; DE WINDE, J.H.; WERY, J. TrgI, toluene repressed gene I, a novel gene involved in toluene-tolerance in *Pseudomonas putida* S12. **Extremophiles,** Tokyo, v.13, p.283-297, 2009.

5. CONCLUSÕES

O gênero *Methylobacterium* apresenta grande potencial biotecnológico, visto que tem sido descrito como agente de controle biológico de patógenos, produção de moléculas e fitohormônios. Entretanto, para que esta possibilidade se torne realidade, se faz necessário uma maior compreensão da diversidade desse gênero no ambiente, além de conhecer os mecanismos genéticos envolvidos nas interações da *Methylobacterium*-planta e *Methylobacterium*-patógeno.

O estudo a diversidade genética de *Methylobacterium* spp., por meio do seqüenciamento parcial dos genes 16S *rRNA* e *mxaF*, mostrou uma resposta adaptativa diferente de *Methylobacterium* spp. nas diferentes plantas. Porém, a clusterização de isolados de um mesmo hospedeiro foi observado em um subgrupo de isolados, sugerindo que essa diversidade se deve a eventos estocásticos, apesar de o genótipo vegetal contribuir para essa diversidade.

Na análise de alguns genes responsáveis pela interação da *Methylobacterium* com a planta hospedeira por meio da técnica de PCR quantitativo, foi observado que o gene *mxaF* é ativado na planta hospedeira, indicando que deve haver metanol na planta durante o seu crescimento. Os genes *crtI* e *acdS*, de resposta ao estresse, apresentaram repressão na presença da planta hospedeira, indicando que não houve condição de estresse para a bactéria em associação com a planta hospedeira. Os genes *patatin* e *phoU*, relacionados a patogenicidade, não foram alterados, confirmando que *Methylobacterium* é um endófito que não possui características similares à bactérias fitopatogênicas.

Com a análise de expressão gênica *in vitro* de *X. fastidiosa* (patógeno) em co-cultivo com *M. mesophilicum* (endófito), foi observado que este fitopatógeno responde à presença da bactéria endofítica expressando genes de resposta ao estresse, diminuindo crescimento, ativando o metabolismo e reduzindo a formação de biofilme. Estes resultados sugerem que pode ocorrer redução dos sintomas da CVC quando *X. fastidiosa* e *M. mesophilicum* estão no mesmo ambiente.

ANEXO

ANEXO A: Seqüências dos genes utilizados na análise por PCR quantitativo do isolado SR1.6-6 (*M. mesophilicum*)

>*patatin* SR1.6/6-1
TAGGCACGMTTCTCGACGGGCTGATCGAGGAGGGCGTCCTCGGTCAGGGCGAGTACCGCCGGGTCCTGGTG
CACCGGATCGACGGGACCGACGCGCTGGAGGACTACAACGCCGCCTCCAAGCTCGATGCCCGCTGGACCGT
GTTCAAGCGCCTGCGCGACAAGGGCCGCGGCGCCGCGCAGACCTGGCTCGCCGAGAACTACGAGGCGGATC
GGAACSTATAGGCGGACGGGCTAGCGGMTGTCGKCGMGGAGSGGCTTGARCACGGTCCAGCGGGACTYGAG
CTTGGTGGCAGAGTTCYAGCTGACTACCGCGTTCGAGCACCTATCAGARGYCCCRGGGATCGGAGGTCTCC
GTTCTCTAMGAGGCGGCACCCGTAGGTCAGYGGGTGGRAGGATTCTTCMCRTYGAWCKAAYACCCTCTGCC
RTTATTGCCRCCRGAGCATGCGACGGGGGGGGGGGGGCCACCATACCCTTAWTCMGATTACAATATATTG
GCAATAATTTAMCAATATTTTATTTCATTTCATTTCTCAACACACCACCACAACCAAYAACAAGCAAATCA
ACACCCAGCCAACAACACWATAACTAAAWAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAWTATATAAGAKTAKT
KT

>*patatin* SR1.6/6-2
TAGCACGMTTCTCGACGGGCTGATCGAGGAGGGCGTCCTCGGTCAGGGCGAGTACCGCCGGGTCCTGGTGC
ACCGGATCGACGGGACCGACGCGCTGGAGGACTACAACGCCGCCTCCAAGCTCGATGCCCGCTGGACCGTG
TTCAAGCGCCTGCGCGACAAGGGCCGCGGCGCCGCGCAGACCTGGCTCGCCGAGAACTACGAGGCGGATCG
GARACCTATGAGCGGASGGGACCGMGATTGTTGTAACGCAGGGGCTAGGACCCGGTCCMGTGGGCATCGAG
CCTGGAGTWGACGTTGCACTCGCTRAGCGCGTCGCTGTGGCCGATCAGGTGTACCTGGWCCGTGCAGGCAC
TCCTCCTTACCAAAAGACGCCSTACGCGWYCAGCTCGTTGTGGAAAATTARYCCAGCWATTARSGCATTAR
TAAAATTWAAA

>*mxaF* SR1.6/6-1
CGCAGMGCAGTGAGGAGCTCCTCACCCATCCGGACCGCAACGGCATCGTCTACACCCTCGACCGGACCGAC
GGCTCGCTGGTCTCGGCCAACAAGATCGACGACACCGTCAACGTGTTCAAGTCGGTCGATCTGAAGTCCGG
CACCCCGGTCCGCGATCCGGAATACGGCACGCGGATGGACCACCTCGCCAAGGACATCAMGRTCGACCGAC
TTGAACACGTTGACGGTGTCSTCGATSTTGTTGGCCGAGACCAGCGAGCGTTSACGSCGTCGGCGRAYACG
GTGGATGRGRYTKGGGAGCGGTGAGGAGAGTCCCGTCTTCCTCCTGYSCTTCTGYTGGAACWGATATGACT
TTAACGAKGAATTGACGAGTCCCWTACAWAGCCGTSTTTTTTTTATTATACTCCMMCCTTTACCCCGSSTA
CACCASAAAGCGACACYCKGGGAGGGCGGGAGACAWTACCCCCCYA

>*mxaF* SR1.6/6-2
CKCAGMGCAGTGAGGAGCTCCTCACCCATCCGGACCGCAACGGCATCGTCTACACCCTCGACCGGACCGAC
GGCTCGCTGGTCTCGGCCAACAAGATCGACGACACCGTCAACGTGTTCAAGTCGGTCGATCTGAAGTCCGG
CACCCCGGTCCGCGATCCGGAATACGGCACGCGGATGGACCACCTCGCCAAGGACATCAAGATCGASCGAC
TTGAACACGTTGACGGTGTSSTCGGATCTTGTTGGCCGAGACCATGCGCGCGTTGCCGYCGKCGGTGWKYA
TGATGCCTTCCSTCCSGTGCGGTGGGGAGGTTCGCTTCTCCATCTTGTKCTTCTTTKGGATCGAKCTTGAA
CTTGACGAKGACTTGACGAGYTYCASAATACWCCCCCCTTCCCACTCCACWTTTAMKTTTMCTGGAGRTTT
GAKGAAGGGATATTTTTGGGGAGGGAGCWCMCCCCCCWGAGT

>acc SR1.6/6-1
GYTRGGCGCGCAGACCAGCTCGTGGATGACGGGTTCGACATCGGCATCCGCGATTCGTGGAAGCGGGCGCT
CGCCGAGGTCGAGGCCGAGGGCGGCAAGCCCTACGCGATCCCGGCCGGCGCCTCGGTGCACAAGTACGGCG
GGCTYGKGGAAGGKTCCGTGACTGCCCACGTGATTATCTGCKGGGAAATGASCCCCGCGCGCAACAGWWAG
TTCAAGCACCTGGCGTACTACTACTTCCACAACTTCGTCTATGAGTTAGTGTGGAATATCRACSAGCCCCG
SGGCTCCGAGCGCTACTCCYCCCAMGYGCTGCTGCACAAGTACGGAGGTGACGATGAMTTCCTGAGTGTCS
STTCCRATGATCGCTGGCCGACCGGAATCCGGTTGSATGAATTTCCATCCGTCAAGGATCTGCARTSAGTG
CGGTCCCCKCTGTGGCGACGGTCGGGATGGARGTGCGAGGTGCATGGTCGGCCACCAAAGCYATTGAAGTC
TGGTGGAGTAACGMTGCACATGGAACTTCCATGMCCAGCGCGGCACCGKTGGGACACAGYKATCGAWCAAC
YTAGCASGACGAAGATCAYGAGCTGATTGYTGCCGTCGGTAGCCTGTACTCGATGCGRTACWCTCATGAAR

WMATTGRCGATCTGACGMCTGCTGGCCMRCGGTYGATGGTGGKASMRGTMRGATGKAASASTCTGGCRAAM
ATGCGYKTMRAGWCCTSTATCGACCRYGSGACRTCCAGACCWSKCAGSKCGWASCMWGRKGWKYAGCRKRG
WCTCATACCYRSAAYTGAAGATGCYCSGTCGACGWGRCRTSKGCTTKTGCWTGSCATCRTGCAGTCAGMTG
MCMYKTWCKCTSMYYKRAYGTACGACGGMAGCGCATGTASTCGATYWCGAKTMCGCATTCAWKTGCGAACT
GGTGTGATCTTRMTCAWGCCAYGMGAGYCMSTGWGCACTRGATGCCGGCTYATCMAG

>acc SR1.6/6-2
GRCYRGGCGCGCAGACCAGCTCGTGGATGACGGGTTCGACATCGGCATCCGCGATTCSTGGAAGCGGGCGC
TCGCCGAGGTCGAGGCCGAGGGCGGCAAGCCCTACGCGATCCCGGCCGGCGCCTCGGTGCACAAGTACGGC
GGGCTAGKGGAAGGKTCCGTGTATGCCCACGTGATKATCTGCKAGGAAATGASGCCCGCGCGCAAGAGWWA
GTTCAAGCACCTGGCGTACTACTACTTCCACAACTTCGTCTATGAGTTAGTGTGGAARATCAACGTGCCCC
TGGGCTCCGAGCGCTACTCGACCCAAGAGCTGCTGCACAAGTACGGCGGGGTGATGAMTGATGAAGTGTCC
STTCCRATGATCGCTGGCCGWMCGGAAACGCATGSATGAATTTCCGTCCGTCAAGGATCTTCARTGAGTGC
GGTCCCCRCTGTGGCGACGTTCGGGATGGWGGTGCGATGTGTATGGTCGCYCACCAAAGCYATTGAAGTCT
GGTGGAGTAACGMTACACATGGAACCTCCATGMCSAGCATGACCACCGTTGGGACMACMGGTATCGAWCAA
CTTATGCSGACGAAGATTTMTGGCTGCATTGTTCCGGTCGGYAGCCTKTACTATGATCSWTACTCTCATGA
AATCATTGRCGACCAGACGACTGCTMGCCAGCGGGTGATGSTSAGWGSMRGKMRGATGKAASASTCTGGGM
AAMACGCGYKTMAAGWCCTSTATCGACCGGCGYGACGTCSAGACCWSTCRGGKCTASCWGGGGATYAGAGG
KGAWCTCATACYRSAACGAAMATGCTCSGCGACRWGASAKSKGCTKTGCTKGGMTATGCARTAAGMTGCAC
TWAGCTGMYKRAYGACGACGMAGGCGCAWTGWSTCGATWGCAKTCSCATCATGTGCCGAACTGGTGKGRTC
TRMTCATGCCAYGMAGAGCTCGTGWRSACTGRSTGCTGCT

>phy SR1.6/6-1
ARAGCTGCGCAGCATGGCGAGCCCGGCGATGCTGGCCGCCCTGCCCTACCTCCATCCCGGACGGAGCGTCG
ACCGCGACCTGAAACGCCACTTCGCCGACCCGCGGGTGCGCCTCGCCTTCTCATTCCAGACCAAGTACCTC
GGCATGTCCMGRGTACCTMGGCCGGGAGCAGCTGCMGGTTTCGGTGAACGTCTTGYGGACGAYSACGTTTT
GAGGGCCCTTACCCTGGGCTCGTGGGGGGWTCTCCCTCCCACCAGGTCGATCGGKTTCTGGGCATTTCTGA
GACGGCCATAGCCGGTCGTGCAAGTCTCCCCGGTTAAGTGGCCGGGGCCGCGCTCCAGGCAATTGATCACC
TTGCTGARGATCAAGCTCCGGATATACTTTTCGGGGTTTGGTTGGAGTTATRGSGATCGGCGCCGGGCGGA
ATTATTAGACSTKGACGCAGGTGACRKGATMGCCCGCCTCWWWCRAYCACGGCCTCTTCATGGSGSAGGAT
TAGCAGCAGGTGATTTGCGCGCTCAACTTSAAGGTSATGAACCTGGTTGAATGTTACAGCAACACCCASAT
GAASACTGWSMAGTTCATCGGCAATGCSATGGCKAATTCAGACAARCCCTTGSGCRTGSTGATCACGTCGY
GGGTCGMGTGCGCATCACTCTCKCCGGGTGTGSCGGYGATCRAGMTCACRAAAGCWCAGGACTTCTTTGAT
CACTASGCCGCCTTGWGTCAAGGGRGTCCWGGAGRSAYCAYGAAGCTGAYCWCTTGTAMACCAGMGMATTG
CTRCTRCACTCGACACRCARSTGRKMCMTMKGCTAAGGACTTCACTWKAMTTCAGSAAGSCATGCCCCAAG
WAASCTCGCSTTTCYYAKKCSCTWGCCWGCGKSAAKGRCTTAYMGRTCTGTMMTTRGCYTCRASCTTKMTA
RYAMTTMSCMAGAYSCGTGAAGTYGMCCRAMAWAGRACSMTGCGCCYYGWCRAGT

>phy SR1.6/6-2
CRAAGCTGCGCAGCATGACGAGCCCGGCGATGCTGGCCGCCCTGCCCTACCTCCATCCCGGACGGAGCGTC
GACCGCGACCTGAAACGCCACTTCGCCGACCCGCGGGTGCGCCTCGCCTTCTCATTCCAGACCAAGTACCT
CGGCATGTCCCGRGGACCCMGGCCGGGAGGRCCTGCMGGTCCTGGTMACCATTGATCAGGACGTCATGCAT
TTGAGGAAGGAATACCWGGGGCTGATTTTTGGTGTCTCCCGCCCCCTCGACWTGTCGGTGTCTGGGCATTT
CTGACCAGGCCTAAGCCGGTGGTGCARGTCATCGCGGTTGAATGGCCGGGGTAAWGCTCGAGGCCAATGAG
ACCTGGCKGAKGACCTGGGTCCGGAKAAACCGGTCGGGGAGAGGGGTGGAGTTATCGYCAATTAGCGCCGG
GCAGAAATCGTAGACCTGGACGCARGTGACAAAAAAGTCAGCCTCTTAGGAGGSGGCATTTTTATGGGGSA
GGATCAGCCGCAGYYGATATGCTCGMTSAACTTGARGGTGATGAACCAGGTTCGAACTGTTACGCAGCACC
CGCATGAASACTGASSAGCTCACCGKCAATGCCTTGCCWGTATAAGAGAASTACWTCGCWAGCTGACCAMG
TGAGGGGTCAAGTGARTGAKCACKTSKCCGGGCTGCAMGCYGGTCRASSTCACGATASCGMMCTGAAMTTC
TTTGATCACTACGKCGSGCKTAGASRTCAARGGRKTTCWTSACKGYMYCGYGRACATCGAKCTGCTTSTAC
ACSAGCRMCGTGCTRCTRCKCTCGACARYAASKTRTSMMTKWCTGCTAAGWCTTTATYRTMTMGSSATGCA

TGCCMAGTWMCCTSYKSRTTCYTWTGCTTGCTGCGGCAKGACTWCAGYTTGMCTWGCCTCAGMTGTACTRC
TGACTMCSAGGTCGTGAGTGGCCRAMAWGASCWCGCCTGGTMRKATGCMGCCG

>phy SR1.6/6-3
GTTMGCTGCGCAGCATGGCGAGCCCGGCGATGCTGGCCGCCCTGCCCTACCTCCATCCCGGACGGAGCGYC
GACCGCGACCTGAAACGCCACTTCGCCGACCCGCGGGTGCGCCTCGCCTTCTCATTCCAGACCAAGTACCT
CGGCATGTCACTGTACCTCGGCATGTCACCAAGTACCTCGGCWTGTCCCCAAGTACCTCGGCATGTMACCA
AGTACCTCGGCATGGCACCAAGTACCTTGGAATGCCACCAAGTACCTCGGAATGTCGGGGACAAAAAGGAA
TCTCCCCACTAAGAGTTCASAGATCCACKCTCTCCSGYGYTTGGGCTTTAGGCGGCGATCCGCCGCCCCAC
GTGTTCCTCGAMTAGTTGCAAARGTATTYTTGTCACATTATCRTCTATCACTAGAGCACCAGMCGMCAMAG
GARCAAGAGSRTGCTGTGGWGAGTCGGATCACCTCTCAGGATYTATYCRTACATGCTAGCGGGCTTATATR
TGCCA

>*phoU* SR1.6/6-1
GATCTGACTACATGATGGAGGTCCGCGCAACATCTCGTTCTGCACGCATCTCCTGTTCTGCGCCAAGAACG
TGGAGCGGATCGGCGACCACACGACCAACATCGCCGAGACCATCCACTACCTCGCCACCGGGGAGACCCTG
GCGGGCGACCGGCCGAAGAACGATGCGTCGAACTACGCGACGGTYAAGTARAACTTCGGCTTGGTGTTGYG
GATTGTACCCGACTTGATGGWCCTGGTGWTCACGCTGATCCACTGCATCGGGTGCCAGTAGGCTAAGCCGC
CCCGGTCGAACTACSCSACGGTATC

>*phoU* SR2
GATCTGACTAMTGATGGAGGTCCGCGCAACATCTCGTTCTGCACGCATCTCCTGTTCTGCGCCAAGAACGT
GGAGCGGATCGGCGACCACACGACCAACATCGCCGAGACCATCCACTACCTCGCCACCGGGGAGACCCTGG
CGGGCGACCGGCCGAAGAACGATGCGTCGAACTACGCGACGGTYRAGTAAGGCTTCRGTTTGGTGTTGMGG
ATTGTACCCGASTTGMTGGTCCTGGYGTTCACGCTGATCCACTGCATCGGGKGCCAGTAGGCTAASCCGCC
CCGGTCGAACTACGCMACGGTYTAWC

>sss SR1.6/6-1
AGAYGCTGTGATCGTGCTGTTCTCATCGCCGAGCGCCTGCGCAACCTCGGCAAGTTCACCTTCGCCGACGT
GGCGAGCTTCCGCCTCGACCAGACCGCCATCCGCATCATCTCGGCGGTGGGCACCCTCGTGGTGGTSGCCT
TCTACCTGATCAGGCGTAAGAATGAGTGATCAGTGGGGRGKCKAMWWRGSCRYAKATTATYGTGTGCAAGG
AACCGC

>sss SR1.6/6-2
ATGACGGCTGCGATCGTGCTGTTCTCATCGCCGAGCGCCTGCGCAACCTCGGCAAGTTCACCTTCGCCGAC
GTGGCGAGCTTCCGCCTCGACCAGACCGCCATCCGCATCATCTCGGCGGTGGGCACCCTCGTGGTGGTSGC
CTTCTACCTGATCAGGGTGGGTGGGGTGGCKGTGATCGGGTGTGGGGGGWYCGTWTAGWCCCCGCCCACTG
CCCGACAGATAAAGCAGAA

>recA SR1.6/6-1
GGGAGCCCCGAGACCACCACCGGCGGCAACGCGCTGAAGTTCTACGCCYCGGTGCGTCTCGATATCCGCCG
CGTCTCGACGCTGAAGGACCGGGACGAAGCCATCGGCAACTCGGTCCGCGTCAAGGTCGTCAAGAACAAGG
TCGCGCCGCCCTTCAAGCAGGTCGAGTTCRACAATGACATGTCGAGTTCGACATACGCAGGTCGAGTTCGA
GATAATGAGGTCGAGTTCGACTTAMTCGSRACCGGTTAGAGGGCGTCTGGAACGGCTGCAGCCACCCAGAT
CTTTCAGAMGCCGGCMTKGCTGMAAGGCCCCTCCCAAAACTTCATCGMTTSAGATTAC

>recA SR1.6/6-2
CMTGAGATCGGCGTGATGTACGGGAGCCCCGAGACCACCACCGGCGGCAACGCGCTGAAGTTCTACGCCYC
SGTGCGTCTCGATATCCGCCGCGTCTCGACGCTGAAGGACCGGGACGAAGCCATCGGCAACTCGGTCCGCG
TCAAGGTCGTCAAGAACAAGGTCGCGCCGCCCTTCAAGCAGGTCGAGTTCGACAACACTGCGAGTCGACTA
CGACGTCGMGTCGAATAGGGGGGGCGAGTTCTACTACTTCATTCGCGCACTGRSCTGAAGSCGGGACCAAC

132

CTCAGTATCCGTGCGTCCCGTCGKGAGAAAGGCCGGCCCTCCTTCAGGTTAATTGCATGAGGCGGYCCCTC
CCCCTGTCGGGGGMGCGAGACCAGCGACAAACGACAGAAAGAAAGAGACAACTAMCCACTCGACCCCCGCG
GCTTTCMACWTAAACAT