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

Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros

Andréa Cristina Bogas

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Andréa Cristina Bogas
Bióloga

Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros

Orientador:
Prof. Dr. **WELINGTON LUIZ DE ARAÚJO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
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**

Bogas, Andréa Cristina

Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros / Andréa Cristina Bogas. - -
Piracicaba, 2010.
151 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bactérias 2. Citricultura 3. Clorose variegada dos citros 4. Crescimento vegetal
5. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDD 634.3
B674a

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

*Aos meus pais, Neide e Antonio
pelo amor, incentivo e apoio
durante toda a minha formação
pessoal e acadêmica*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo pela oportunidade dada, pela confiança depositada em meu trabalho, amizade e colaboração na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela sua amizade e exemplo profissional.

À Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pela amizade e colaboração profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava, pela amizade, colaboração e discussões durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, que gentilmente disponibilizou seu laboratório para a realização das pesquisas e também por seus ensinamentos.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética e do curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Ao Zezo, pela amizade e serviços técnicos prestados.

Ao Dr. Carlos Aguilar-Vildoso, pela amizade, pelos contatos profissionais para a realização dos trabalhos de promoção de crescimento no viveiro de produção de mudas, e por seus conselhos.

À Dra. Priscilla de Barros Rossetto, pela amizade, conversas, e pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Dra. Maria Carolina Quecine, e também à Manuella e Marise, pela amizade, discussões e ajuda nos trabalhos.

À Fernanda e Juliana do Laboratório Max Feffer, pela amizade e por tudo que me ajudaram durante a realização dos experimentos de proteômica.

A todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, pela amizade e convivência durante esses quatro anos.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA) e ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, por possibilitarem as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Dr. Humberto (Beto) do Laboratório de Genética de Leveduras/ESALQ pela disponibilização de equipamentos em seu laboratório e pela amizade.

À Dra. Salete Gaziola e ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas/ESALQ, pela disponibilização dos equipamentos do laboratório.

À Universidade de Mogi das Cruzes, por intermédio do Núcleo Integrado em Biotecnologia, e aos professores Dr. Luiz Roberto Nunes e Dra. Regina Batista da Costa Oliveira, pela disponibilização do laboratório para a realização dos experimentos de expressão gênica.

Ao Engenheiro Agrônomo Vítor José Betim Cicolin, proprietário do Viveiro de Mudas Horticitrus, que gentilmente permitiu a realização dos experimentos em condições comerciais, e também a todos os seus funcionários que colaboraram para a execução do trabalho.

Ao CNPq pela concessão de bolsa e financiamento das pesquisas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

*“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério.
Essa é a fonte de toda arte e ciências verdadeiras ”.*

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Revisão Bibliográfica	25
1.1.1 Interação bactéria-planta.....	25
1.1.1.1 Aspectos gerais	25
1.1.1.2 Sensoriamento populacional em bactérias.....	28
1.1.1.3 Biofilmes bacterianos	30
1.1.2 Bactérias endofíticas	32
1.1.3 O gênero <i>Methylobacterium</i> : aspectos gerais e sua importância como endófito..	36
1.1.4 Produção de mudas cítricas em viveiros	40
Referências	41
2 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CITROS POR <i>Methylobacterium</i> spp.....	56
Resumo	56
Abstract	57
2.1 Introdução	58
2.2 Desenvolvimento	60
2.2.1 Material e Métodos	60
2.2.1.1 Linhagens bacterianas e material vegetal	60
2.2.1.2 Testes de promoção de crescimento de limão-cravo e tangerina sunki por <i>Methylobacterium</i> spp.	61
2.2.1.2.1 Experimento 1	61
2.2.1.2.2 Experimento 2	63
2.2.1.2.3 Experimento 3	63
2.2.1.2.3.1 Teste de estabelecimento de <i>Methylobacterium</i> spp. no substrato	63
2.2.1.2.3.2 Amplificação do gene 16S rRNA	64
2.2.1.2.3.3 Análise de Restrição do gene 16s rRNA (ARDRA)	65

2.2.1.2.3.4 Teste de promoção de crescimento de tangerina sunki por <i>Methylobacterium</i> spp. via inoculação no substrato	65
2.2.1.3 Reisolamento de <i>Methylobacterium</i> spp. das mudas cítricas e análise por ARDRA	65
2.2.1.4 Mecanismos envolvidos na produção de crescimento vegetal	66
2.2.1.4.1 Produção de AIA (Ácido-Indol-Acético).....	66
2.2.1.4.2 Solubilização de fosfato inorgânico.....	67
2.2.1.4.3 Fixação de nitrogênio.....	67
2.2.1.5 Isolamento de bactérias endofíticas de sementes de limão-cravo e tangerina sunki	67
2.2.1.5.1 Identificação das colônias reisoladas.....	68
2.3 Resultados e Discussão	68
2.3.1 Testes de promoção de crescimento de limão-cravo e tangerina sunki por <i>Methylobacterium</i> spp.	69
2.3.1.1 Efeitos da inoculação de <i>Methylobacterium</i> spp. sobre a germinação de sementes	69
2.3.1.2 Efeitos de <i>Methylobacterium</i> spp. sobre o crescimento das mudas cítricas	71
2.3.1.2.1 Experimentos 1 e 2: promoção de crescimento de limão-cravo e tangerina sunki via bacterização de sementes	72
2.3.1.2.2 Experimento 3: promoção de crescimento de tangerina sunki via inoculação de <i>Methylobacterium</i> spp. no substrato	79
2.3.1.2.2.1 Estabelecimento de <i>Methylobacterium</i> spp. no substrato	79
2.3.1.2.2.2 Promoção de crescimento de tangerina sunki via inoculação no substrato	83
2.4 Análise de características funcionais envolvidas na promoção de crescimento vegetal	87
2.5 Reisolamento de <i>Methylobacterium</i> spp. das mudas cítricas e análise por ARDRA	88
2.6 Isolamento de bactérias endofíticas de sementes de limão-cravo e tangerina sunki	90
Referências.....	93

3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE β -1,4-ENDOGLICANASE EM <i>Methylobacterium extorquens</i> E COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE <i>Catharanthus roseus</i>	101
Resumo	101
Abstract	101
3.1 Introdução	102
3.2 Desenvolvimento	106
3.2.1 Material e Métodos	106
3.2.1.1 Meios de cultura, linhagens bacterianas e plasmídeo	106
3.2.1.2 Preparo de células competentes e transformação de <i>M. extorquens</i>	107
3.2.1.3 Estabilidade do plasmídeo <i>in vitro</i>	108
3.2.1.4 Atividade de endoglicanase.....	108
3.2.1.5 Experimentos de colonização.....	109
3.2.1.5.1 Cultivo de <i>C. roseus</i>	109
3.2.1.5.2 Colonização de <i>C. roseus</i> por <i>Methylobacterium</i>	109
3.2.1.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	110
3.2.2 Resultados e Discussão	110
3.2.2.1 Transformação de <i>M. extorquens</i> AR1.6/2 e estabilidade do plasmídeo <i>in vitro</i>	110
3.2.2.2 Detecção da atividade de endoglicanase por AREGLA	111
3.2.2.3 Colonização de <i>C. roseus</i> pela bactéria endofítica <i>M. extorquens</i>	112
Referências	120
4 AÇÃO DA N-ACIL-HOMOSERINA LACTONA NA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO ENTRE <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6-PLANTA HOSPEDEIRA.....	128
Resumo	128
Abstract	129
4.1 Introdução	130
4.2 Desenvolvimento	132
4.2.1 Material e Métodos	132
4.2.1.1 Linhagem bacteriana, cultivo e tratamento.....	132
4.2.1.2 Extração de RNA total	133

4.2.1.3 Síntese de cDNA	134
4.2.1.4 Detecção de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	134
4.2.1.5 Avaliação da expressão de genes de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	135
4.3 Resultados e Discussão	136
Referências.....	142
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	149

RESUMO

Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros

A interação bactéria-planta é um processo complexo que envolve diversos fatores bióticos e abióticos, podendo resultar em interações neutras, benéficas ou patogênicas. O gênero *Methylobacterium* tem sido descrito como endófito em diferentes plantas hospedeiras, podendo beneficiá-las por meio da promoção de crescimento vegetal e do controle de fitopatógenos. Em citros, este endófito coloniza o mesmo nicho que patógenos, e, assim, muitas espécies desse gênero são interessantes candidatas ao controle simbiótico contra *Xylella fastidiosa*. É conhecido que o processo de interação *Methylobacterium*-bactéria é coordenado por genes cuja expressão é regulada pelo sistema *Quorum Sensing* (QS), o qual utiliza N-acil-homoserina lactonas (AHLs) como moléculas sinalizadoras, importantes, entre outras coisas, para a formação de biofilme, encontrado em muitas plantas como estratégia de colonização bacteriana. No entanto, os mecanismos envolvidos na interação *Methylobacterium*-planta são ainda pouco compreendidos. Dessa forma, o presente trabalho buscou estudar, de diferentes maneiras, a interação entre *Methylobacterium* spp. e citros, avaliando os efeitos dessas bactérias sobre o crescimento de plântulas e a variação da expressão gênica. Neste contexto, foi verificado que a especificidade da interação bactéria-planta e a escolha do método de inoculação das bactérias são importantes para a geração de resultados benéficos sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento da planta hospedeira. Possivelmente, a produção de AIA e a fixação biológica de nitrogênio foram os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de citros por *Methylobacterium* spp. neste estudo. Com relação à origem, essas bactérias parecem ser transmitidas horizontalmente em plantas cítricas. Visando empregar *Methylobacterium* spp. no controle de fitopatógenos em citros, *M. extorquens* AR1.6/2 foi geneticamente modificada para expressar uma endoglicanase A (EglA). Por meio de microscopia eletrônica de varredura, foi verificado que a bactéria modificada colonizou a superfície e o interior de *Catharanthus roseus*, planta modelo para experimentos com bactérias endofíticas e *X. fastidiosa*. Além disso, quando inoculada junto com *X. fastidiosa*, essas bactérias compartilharam o xilema das plântulas, sugerindo que durante a colonização e estabelecimento no hospedeiro estas bactérias poderiam interagir. Estudando a ação de uma AHL sobre a expressão de genes envolvidos na interação entre *M. mesophilicum* SR1.6/6-planta, foi observado que a presença dessa molécula foi importante na ativação da expressão dos genes *mxoF*, relacionado ao estabelecimento e metabolismo metilotrófico da bactéria; *pat*, relacionado a vantagens adaptativas e competitivas durante a colonização da planta; e *acdS*, envolvido com o metabolismo bacteriano e modulação de níveis hormonais na planta. A expressão dos genes *crtI* e *sss*, envolvidos com respostas a estresse e transporte de compostos, respectivamente, e do gene *phoU*, relacionado com patogenicidade, não foram alterados na presença da AHL nas condições avaliadas. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que *Methylobacterium* spp. interagem com plântulas de *Citrus* spp., demonstrando especificidade entre a espécie de planta e da bactéria endofítica. Foi observado também que esta interação ocorre não somente com a planta, mas possivelmente com outras bactérias que habitam o xilema de citros. Além disso, esta interação *Methylobacterium*-citros-bactérias do xilema pode ser regulada por AHLs.

Palavras-chave: *Methylobacterium* spp.; *Citrus* spp; Promoção de crescimento; AHL

ABSTRACT

Evaluation of the interaction between *Methylobacterium* spp. and citrus

The bacterium-plant interaction is a complex process that involves several biotic and abiotic factors that may result in neutral, beneficial or harmful interactions. The *Methylobacterium* genus has been described as endophytic bacterium in different host plants. It could benefit the plants by growth promotion and control of phytopathogens. In citrus, this endophyte colonizes the same pathogen-niche, and therefore many species of this genus are interesting candidates to symbiotic control against *X. fastidiosa*. It is known that the process of *Methylobacterium*-bacteria interaction is coordinated by genes whose expression is regulated by the Quorum Sensing (QS), which uses N-acyl homoserine lactones (AHLs) as signaling molecules. Its importance is associated with the biofilm formation, found in many plants as a strategy for bacterial colonization. However, the mechanisms in *Methylobacterium*-plant interactions are still poorly understood. Thus, this work studied in different ways, the interaction between *Methylobacterium* spp. and citrus, evaluating the effects of these bacteria on the seedling growth and the variation of gene expression. In this context, it was found that the specificity of bacteria-plant interactions and the bacterial inoculation methods are important to generate beneficial results on seed germination and host plant development. Possibly, IAA production and nitrogen biological fixation were the major involved mechanisms in citrus growth promotion by *Methylobacterium* spp. These bacteria seem to be transmitted horizontally in citrus plant. Aiming to employ *Methylobacterium* spp. to control phytopathogens in citrus plant, *M. extorquens* AR1.6/2 was genetically modified to express an endoglucanase A (EglA) enzyme. Using scanning electron microscopy was observed that the modified bacteria colonized the surface and interior of the *Catharanthus roseus*, a model plant for experiments with endophytic bacteria and *X. fastidiosa*. Furthermore, when inoculated with *X. fastidiosa*, these bacteria shared the seedlings xylem, suggesting that during the colonization and establishment in the host, these bacteria could interact. Studying the action of a AHL on the expression of genes involved in the interaction between *M. mesophilicum* SR1.6/6-plant it was observed that the presence of this molecule was important in the activation of genes expression *mxoF* (related to the establishment and methylotrophic metabolism); *pat* (related to adaptive and competitive advantages during the plant colonization); *acdS* (involved in bacterial metabolism and modulation of hormone levels in the plant). Expression of *crtI* and *sss*, involved in bacterial stress and transport of compounds, respectively, and *phoU*, related with pathogenicity were not altered in the presence of AHL in the evaluated conditions. The results of this study demonstrated that *Methylobacterium* spp. interact with seedlings of *Citrus* spp., showing specificity between plant species and endophytic bacteria. Also, it was observed that this interaction occurs not only with the plant molecular modification levels, but possibly with other bacteria that inhabit the xylem of citrus. Also, this interaction *Methylobacterium*-citrus-xylem bacteria may be regulated by AHLs.

Keywords: *Methylobacterium* spp.; *Citrus* spp.; Growth-promotion; AHL

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Passos para a produção de porta-enxertos de citros em viveiro comercial. Preparo do substrato (A,B); Semeadura em tubetes (C); Desenvolvimento das mudas (D,E,F).....62
- Figura 2.2 - Efeito de *Methylobacterium* spp. na germinação de sementes de limão-cravo (A) e tangerina sunki (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)70
- Figura 2.3 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento da parte aérea das mudas de limão-cravo aos 2 meses (A), 3 meses (B) e 4 meses (C) de desenvolvimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)73
- Figura 2.4 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre a parte aérea de mudas de limão-cravo aos 4 meses de desenvolvimento. A) plantas tratadas com AR1.6/11; B) plantas tratadas com TP4/2; C) comparação dos efeitos gerados nas mudas tratadas com AR1.6/11 e TP4/2 em viveiro comercial74
- Figura 2.5 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento das mudas de limão-cravo aos 4 meses de desenvolvimento. A) Aumento do peso fresco das raízes das mudas tratadas com SR1.6/6 e AR1.6/11; B) Aumento do peso seco das raízes das mudas tratadas com SR1.6/6. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)75
- Figura 2.6 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento da parte aérea das mudas de tangerina sunki aos 2 meses (A), 3 meses (B) e 4 meses (C) de desenvolvimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)77

- Figura 2.7 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento das mudas de tangerina sunki aos 4 meses de desenvolvimento. Observa-se o aumento do peso fresco da parte aérea estimulado por SR1.6/6 e AR1.6/2. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)78
- Figura 2.8 - Perfil dos ribotipos obtidos pela digestão do gene 16S rRNA com a enzima de restrição *Mbol*. M = Marcador de peso molecular 100 pb; 1 = perfil de restrição do gene 16S rRNA da linhagem AR1.6/2; 2 = perfil de restrição do gene 16S rRNA da linhagem SR1.6/6; 3 = perfil de restrição do gene 16S rRNA da linhagem PR 1/3.....81
- Figura 2.9 - Densidade bacteriana presente no substrato ao longo do tempo. A) População bacteriana no tempo zero; B) População bacteriana após 30 dias do inóculo de *Methylobacterium* spp. Os dados foram transformados para Log (UFC+0,5). As barras maciças em azul representam as linhagens de *Methylobacterium* inoculadas individualmente no substrato; as partes maciças em preto, contidas nas barras azuis, representam outros ribotipos encontrados no substrato; as barras estilizadas representam as linhagens em competição (comp) ou outros ribotipos presentes no substrato82
- Figura 2.10 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento da parte aérea das mudas de tangerina sunki aos 2 meses (A), 3 meses (B) e 4 meses (C) de desenvolvimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....84
- Figura 2.11 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento das mudas de tangerina sunki aos 4 meses de desenvolvimento. A) Aumento do peso fresco da parte aérea das mudas tratadas com AR1.6/2; B) Aumento do peso seco da parte aérea das mudas tratadas com SR1.6/6 e AR1.6/2. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....85

- Figura 2.12 - Perfil dos ribotipos obtidos pela digestão do gene 16S rRNA com a enzima de restrição *AluI*. M = Marcador de peso molecular 1 Kb; 1, 2, 3 e 4 = perfil de restrição do gene 16S rRNA das linhagens TP4/2; AR1.6/2; SR1.6/6; e AR1.6/11, respectivamente, inoculadas no início dos testes de promoção de crescimento vegetal; 1'; 2'; 3' e 4' = perfil de restrição do gene 16S rRNA das linhagens TP4/2, AR1.6/2; SR1.6/6; e AR1.6/11, respectivamente, reisoladas dos porta-enxertos ao final da produção das mudas89
- Figura 3.1 - Mapa de restrição plasmidial e estratégia usada para clonar o gene *eglA* no pCM160, gerando o vetor pEGLA160 para expressão heteróloga de genes em *Methyobacterium*. A parte em preto de *eglA* foi descartada e não clonada em pCM160. Na nova construção, *eglA* encontra-se sob regulação do promotor pEGLA de *B. pumilus*. Fonte: Ferreira Filho et al. (2010).....107
- Figura 3.2 - Atividade de endoglicanase visualizada pela formação de um halo de degradação ao redor da colônia. A) *M. extorquens* AR1.6/2; B) *M. extorquens* AREGLA.....112
- Figura 3.3 - Eletromicrografia da superfície de raiz de plântulas de *C. roseus* colonizada por AR1.6/2 (A: bar = 10 μ m, 1.00 KX, 20.00 KV) e AREGLA (B: bar = 10 μ m, 1.00 KX, 20.00 KV), formando biofilme maduro. Observa-se também AREGLA colonizando as radículas da região pilosa (C: bar = 20 μ m, 1,12 KX; 25.00 KV)114
- Figura 3.4 - Eletromicrografia da superfície de folha de plântulas de *C. roseus* colonizada por AR1.6/2 (A: bar = 20 μ m; 1.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (B: bar = 10 μ m; 3.00 KX; 20.00 KV)114
- Figura 3.5 - Eletromicrografia do caule de plântulas de *C. roseus* colonizado por AR1.6/2 (A: bar =10 μ m; 1.00 KX; 20.00 KV; B: bar = 10 μ m; 3.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (C: bar = 10 μ m; 1.00 KX; 20.00 KV; D: bar = 10 μ m; 3.00 KX; 20.00 KV)115

- Figura 3.6 - Eletromicrografia da superfície de raiz de plântulas de *C. roseus* colonizada por AR1.6/2 (A: bar = 20 μm ; 1.00 KX; 20.00 KV; B: bar = 10 μm ; 3.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (C: bar = 20 μm , 1.00 KX; 20.00 KV; e D: 10 μm ; 3.00 KX; 20.00 KV) coinoculadas com *X. fastidiosa* 117
- Figura 3.7 - Eletromicrografia da superfície de folha de plântulas de *C. roseus* colonizada por AR1.6/2 (A: bar = 10 μm ; 3.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (B: bar = 10 μm ; 3.00 KX; 20.00 KV) coinoculadas com *X. fastidiosa* 118
- Figura 3.8 - Eletromicrografia do caule de plântulas de *C. roseus* colonizado por AR1.6/2 (A: bar = 2 μm ; 5.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (B: bar = 10 μm ; 3.00 KX; 20.00 KV) coinoculadas com *X. fastidiosa*. Observar em (A) vaso xilemático obstruído com material com aspecto de goma. Em (C) é apresentada uma visão geral de um corte transversal de caule mostrando os vasos xilemáticos de plântulas coinoculadas com AREGLA e *X. fastidiosa* (bar = 200 μm ; 178 X; 20.00 KV) 118
- Figura 3.9 - Eletromicrografia do caule de plântulas de *C. roseus* colonizado por *X. fastidiosa*. Observa-se em A (100 μm ; 297 X; 20.00 KV); B (bar = 20 μm ; 1.00 KX; 20.00 KV); C (bar = 2 μm ; 5.00 KX; 20.00 KV) e D (2 μm ; 10.00 KX; 20.00 KV), vasos xilemáticos obstruídos. Em (D) também são observadas células individualizadas de *X. fastidiosa* 119
- Figura 4.1 - Influência da (S)-N-dodecanoil-HSL sobre a expressão dos genes *mxoF*, *acdS*, *crtI*, *pat*, *sss* e *phoU* em *M. mesophilicum* SR1.6/6. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *recA*; as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas 137

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Linhagens de <i>Methylobacterium</i> spp.....	61
Tabela 2.2 - Identificação das bactérias endofíticas isoladas de porta-enxertos de citros, realizada a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e comparação de sequências contra o banco de dados do NCBI	91
Tabela 3.1 - Bactérias e plasmídeo.....	106
Tabela 3.2 - Estabilidade do plasmídeo pEGLA160 em AREGLA. A porcentagem de colônias transformadas com o plasmídeo foi obtida pela contagem aleatória após 28, 56 e 84 horas de cultivo da bactéria crescendo em meio de cultura sem o antibiótico canamicina	111
Tabela 3.3 - Atividade de endoglicanase expressa por AR1.6/2	112
Tabela 4.1 - Primers utilizados para análise em qPCR.....	135

1 INTRODUÇÃO

Entender a natureza do estabelecimento das interações bactéria-planta é um constante desafio. Potencialmente, todas as plantas vivem em associação com bactérias, as quais podem colonizar os espaços intercelulares (colonização endofítica); a superfície vegetal (colonização epifítica); ou atacar os tecidos causando doenças (colonização patogênica), sendo que algumas populações podem flutuar entre esses estilos de vida. Embora com propósitos diferentes, bactérias simbiotes e patogênicas utilizam mecanismos em comum para se estabelecerem na planta, mas nenhuma dessas relações é totalmente compreendida, embora saibamos que essas comunidades podem ser afetadas por diversos fatores bióticos e abióticos.

Estudos recentes têm mostrado que a comunicação bactéria-bactéria e/ou bactéria-planta pode ser regulada por meio de um sistema denominado *Quorum Sensing* (QS). Esse sistema é baseado na produção de sinais moleculares difusíveis que permitem às bactérias controlar mudanças adaptativas e fisiológicas na população. N-acil-homoserina lactonas (AHLs) são as moléculas sinalizadoras predominantes entre bactérias Gram-negativas, e são comuns àquelas que estabelecem associação com plantas. AHLs são importantes, entre outras coisas, para a formação de biofilmes, uma estratégia chave para a sobrevivência e dominância das bactérias na planta, favorecendo o estabelecimento de relações patogênicas ou simbióticas. Moléculas que mimetizam AHLs têm sido encontradas em plantas, e isso tem sido visto como uma estratégia de adaptação para comunicação com bactérias específicas ou ainda para proteção contra patógenos.

Nas últimas décadas os estudos sobre bactérias endofíticas têm aumentado, focando principalmente na utilização desses microrganismos como agentes de controle biológico de doenças, promotores de crescimento vegetal, fitoremediadores de áreas poluídas, e/ou vetores para a expressão de genes heterólogos em plantas.

Methylobacterium é um importante gênero de bactérias endofíticas que interagem de forma simbiótica com diferentes espécies de plantas. Em citros, tem sido consistentemente isolado como endófito, além de ser descrito como o principal gênero na interação entre a comunidade endofítica de citros e *X. fastidiosa*. A possibilidade de

modificar geneticamente *Methylobacterium* spp. e reintroduzi-las em seu nicho original, onde existe o problema ou acesso ao patógeno alvo, poderia se consistir de um ponto chave para o controle simbiótico por tais bactérias.

Além da possibilidade de *Methylobacterium* spp. atuarem como agentes de controle de fitopatógenos, através do qual também poderiam exercer efeitos indiretos sobre o crescimento vegetal, esses endófitos poderiam ainda favorecer a citricultura promovendo o crescimento vegetal de forma direta, possivelmente por meio da produção de fitohormônios e fixação de nitrogênio, melhorando, assim, a produtividade e/ou a qualidade dos pomares cítricos. Isso seria de grande importância à citricultura brasileira, uma vez que o Brasil destaca-se como o maior produtor de citros e também o maior exportador de suco de laranja do mundo.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivos: i) avaliar a capacidade de *Methylobacterium* spp. promoverem crescimento de citros; ii) modificar geneticamente *Methylobacterium* para expressão heteróloga visando o estudo da interação com *X. fastidiosa* e o controle simbiótico de fitopatógenos em citros; iii) avaliar o efeito da AHL sobre a expressão de genes envolvidos na interação *Methylobacterium*-planta.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Interação bactéria-planta

1.1.1.1 Aspectos Gerais

As plantas constituem um complexo ecossistema para diversas bactérias. As condições ambientais oferecidas por este ecossistema diferem entre a filosfera, um ambiente mais exposto a rápidas e frequentes mudanças de temperatura, umidade, radiação UV entre outras, e a rizosfera, que confere maior proteção contra essas alterações, além de ser mais abundante em fontes de carbono e minerais (BOTTON; FREDRIKSON; ELLIOT, 1992; WALKER et al., 2003). Mas mesmo um nicho dito mais hostil como a filosfera é habitado por uma diversa comunidade bacteriana (ANDREWS; HARRIS, 2000).

As bactérias se associam às plantas com diferentes graus de dependência, podendo resultar em interações neutras, benéficas ou patogênicas (HOLLAND; LONG; POLACCO, 2002). Embora muitas bactérias possuam potencial patogênico, quase todas as interações resultam em processos assintomáticos, devido principalmente ao fato das plantas possuírem um elaborado sistema de defesa que as permite reconhecer e responder à maioria dos patógenos (LIPKA; PANSTRUGA, 2005). Naquelas interações em que ocorre mutualismo, as bactérias fornecem nutrientes às plantas e/ou lhes contribuem com atividades bioquímicas que lhes faltam. Em contrapartida, a planta contribui com nutrientes gerados pelo processo fotossintético (GLENN; DILWORTH, 1985). O exemplo mais bem estudado de mutualismo ocorre entre rizóbio e leguminosas. Esta interação, assim como outras interações patogênicas, são caracterizadas pela sua complexidade e especificidade (SMITH, 1992).

Baseado nas interações que estabelecem com as plantas, as bactérias podem ser classificadas como endofíticas (colonizam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos aparentes ao hospedeiro); epifíticas (colonizam a superfície dos órgãos e tecidos vegetais); e patogênicas (atacam os tecidos vegetais causando doenças no hospedeiro) (ANDREWS; HARRIS, 2000; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; REINHOLD-HUREK; HUREK,

1998). Entretanto, a distinção entre bactérias endofíticas, epifíticas e patogênicas é meramente didática. Não existe um limite claro entre esses grupos, mas sim um gradiente entre eles, tornando-se muito difícil discriminá-los, visto que algumas populações bacterianas podem flutuar entre esses estilos de vida (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; HALLMANN et al., 1997; MONTESINOS et al., 2002). As condições ambientais ou o equilíbrio com outros microrganismos podem ser determinantes para que uma bactéria alterne entre diferentes ciclos biológicos. Assim, uma bactéria endofítica pode se tornar um patógeno, ou uma bactéria epifítica pode, eventualmente, penetrar a planta e lá permanecer por certo período como endófito ou ainda se tornar um fitopatógeno (ANDREWS; HARRIS, 2000; AZEVEDO et al., 2000; MONTESINOS et al., 2002).

Os mecanismos pelos quais as interações bactéria-planta ocorrem não são completamente entendidos, mas sabe-se que, embora o resultado das interações benéficas e patogênicas seja diferente, para colonizarem, penetrarem e se estabelecerem no hospedeiro, as bactérias utilizam mecanismos em comum (BARON; ZAMBRYSKI, 1995).

No processo inicial de interação há o reconhecimento do microrganismo pela planta, o qual ocorre através de interações físicas e/ou de sinais moleculares produzidos pela indução de genes específicos regulados por diversos fatores ambientais. Além disso, para que as bactérias invadam e sobrevivam de forma eficiente dentro do hospedeiro, precisam suprimir e/ou superar as respostas de defesa disparadas pela planta após o reconhecimento do microrganismo, um processo que também depende da coordenação da expressão gênica (SOTO; SANJUÁN; OLIVARES, 2006).

As bactérias podem penetrar as plantas através de estômatos, ferimentos, aberturas na epiderme provocadas pela emergência das raízes laterais, e ainda podem produzir enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular vegetal, sendo este um possível mecanismo de penetração (BACON; WHITE, 2000; McCULLY, 2001; QUADT-HALLMANN; BENHAMOU; KLOEPPER, 1997a; SHISHIDO; BREUIL; CHANWAY, 1999).

Com o objetivo de se verificar a colonização e a forma de infecção desses microrganismos em plantas hospedeiras, métodos citoquímicos e de microscopia

eletrônica foram desenvolvidos e utilizados (ANDREOTE et al., 2006; RUPPEL et al., 1992). A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) tem sido muito útil para o exame detalhado de superfícies internas fraturadas e expostas de amostras, facilitando, assim, a observação de tecidos vegetais, o que vem auxiliar o entendimento da interação planta-microrganismo. Recentemente, a técnica de MEV tem sido utilizada para o estudo de biofilmes bacterianos em plantas, e não mais apenas para a análise de células individuais (ANDREOTE et al., 2006; FUJISHIGE; KAPADIA; HIRSCH, 2001).

A interação com nematóides, parasitas, ou outros microrganismos benéficos ou patogênicos associados à planta, podem influenciar na colonização e distribuição das bactérias (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; HIRANO; HUPPER, 2000; LINDOW; ANDERSEN, 1996; QUADT-HALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997b). Assim, Araújo et al. (2002) demonstraram que existe interação entre a comunidade endofítica de citros e *Xylella fastidiosa*, sendo *Methylobacterium* o gênero mais frequentemente encontrado em associação positiva com a ocorrência e intensidade dos sintomas da Clorose Variegada dos Citros (CVC).

A comunidade bacteriana associada às plantas também pode ser influenciada pelo genótipo da planta, tipo de solo, e mudanças ambientais (KENNEDY et al., 2005; LAUBER et al., 2008; MARSCHNER, et al., 2001). Rosas et al. (1998) demonstraram que determinados genótipos de feijão nodulam preferencialmente com linhagens específicas de *Rhizobium*. Smith; Handelsman e Goodman (1999) identificaram em tomateiro vários loci de características quantitativas que estão associados com o crescimento de *Bacillus cereus* UW85. Araújo (2000) observou que variações sazonais influenciaram populações endofíticas de *Methylobacterium* spp. isoladas de citros. Além disso, características intrínsecas às bactérias são importantes para a colonização da planta.

No processo de colonização, a comunicação entre a planta e bactéria e vice-versa tem uma função chave (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006), sendo sugerido que as plantas podem se comunicar para atrair especificamente microrganismos para seu próprio benefício ecológico e evolucionário (COMPANT et al., 2005a). O habitat associado à planta é, portanto, um ambiente dinâmico, onde muitos fatores podem afetar a estrutura e a composição da comunidade bacteriana. Um maior conhecimento sobre a

ecologia das comunidades bacterianas, plantas e ambiente, torna-se necessário para que se compreenda de forma global o complexo processo dessas interações.

1.1.1.2 Sensoriamento populacional em bactérias

As bactérias se encontram distribuídas sobre a superfície das plantas homogeneamente ou formando agregados celulares. Estes são os locais ideais para que ocorra a comunicação bacteriana, um processo denominado sensoriamento populacional ou *Quorum Sensing* (QS) (JOINT, 2006).

QS envolve a produção de pequenas moléculas sinais difusíveis, chamadas autoindutores, que se acumulam com o aumento da população bacteriana e coordenam a expressão de genes envolvidos na interação bactéria-bactéria e/ou bactéria-planta (JOINT, 2006; MILLER; BASSLER, 2001). Esse sistema de comunicação entre células é comum às interações mutualística e patogênica, e estima-se que 5 a 25% dos genes bacterianos sequenciados são controlados por QS (JOINT, 2006). Esses genes geralmente estão envolvidos em mudanças adaptativas e fisiológicas da população bacteriana, tais como a biossíntese de antibióticos, enzimas, toxinas e outros metabólitos secundários, conjugação, motilidade e adaptação epifítica (BAUER; MATHESIUS, 2004; KHMEL, 2006; SANCHES-CONTRERAS et al., 2007; VON BODMAN; BAUER; COPLIN, 2003). Além disso, QS também está envolvido no controle de mecanismos como a produção de exopolissacarídeos (VON BODMAN; FARRAND, 1995) e a formação de biofilme (DAVIES et al., 1998), importantes para a colonização e invasão bacteriana.

O sistema QS foi identificado e descrito em *Vibrio fischeri*, bactéria Gram-negativa, simbiótica, quimioluminescente, que coloniza órgãos luminosos em certos peixes e cefalópodos. As enzimas responsáveis pela produção de luz são codificadas por um operon estrutural da luciferase LuxRI, e a emissão de luz ocorre quando a densidade populacional está alta em resposta ao acúmulo de moléculas autoindutoras secretadas (MILLER; BASSLER, 2001). Desde então, outros sistemas de regulação de bactérias, homólogos ao sistema LuxRI da *V. fischeri*, vêm sendo descritos. Estes sistemas utilizam proteínas que compartilham similaridade das sequências com aquelas do operon LuxRI e produzem moléculas que pertencem à mesma classe química das N-

acil-homoserina lactonas (AHLs) (OLIVEIRA, 2005).

QS tem sido descrito em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nas primeiras a comunicação é realizada por pequenos peptídeos sinais secretados (AIPs) (MARCH; BENTLEY, 2004), enquanto em Gram-positivas, o tipo predominante de molécula sinalizadora são as AHLs, sintetizadas a partir de S - adenosil metionina (SAM). Todas as AHLs compartilham o mesmo núcleo homoserina-lactona, porém podem apresentar grupamentos acil distintos que podem ser incorporados às cadeias laterais (CAMILLI; BASSLER, 2006).

Alguns trabalhos têm relatado a presença de AHLs entre membros do gênero *Methylobacterium*. Penálver et al. (2006) mostraram pela primeira vez que um membro do gênero *Methylobacterium*, *M. extorquens* AM1, possui dois sistemas QS e que essa linhagem produz um novo tipo de AHL contendo uma cadeia acil com ligações dupla insaturadas. Pomini et al. (2009) estudaram AHLs produzidas por *M. mesophilicum* SR1.6/6, revelando a ocorrência de seis tipos de AHLs. As configurações absolutas de todas as AHLs foram determinadas e duas delas, (S)-N-(2E, 7Z)-tetradecanoil-HSL e (S)-N-(2E)-dodecanoil-HSL, foram sintetizadas pela primeira vez.

QS é comum entre bactérias Gram-negativas que vivem em associação com plantas (BARNARD et al., 2007; CHA et al., 1998; SANCHES-CONTRERAS et al., 2007; WHITE; WINANS, 2007). Loh et al. (2002) descreveram a importância das AHLs na regulação de genes que controlam as interações bactéria-planta, podendo resultar na simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum* e leguminosas, sugerindo importante papel desse sistema na nodulação, na associação epifítica de *Pseudomonas* spp., e na patogenicidade de *Erwinia* spp. com a planta hospedeira. Schuhegger et al. (2006) mostraram que *Serratia liquefaciens* MG1 e *Pseudomonas putida* IsoF produzem AHL e podem induzir resistência sistêmica contra o fungo *Alternaria alternata* em tomate.

Evidências sobre o envolvimento do QS na patogenicidade são grandes, pois bactérias mutantes que são deficientes no mecanismo QS apresentam uma significativa redução da virulência (VON BODMAN, BAUER; COPLIN, 2003). Nesse sentido, Thowthampitak et al. (2008) mostraram que *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* mutante para o gene *rpfF*, relacionado às biossíntese de DSF (fator extracelular difusível), apresentou virulência reduzida em soja, produzindo menos exopolissacarídeos

e enzimas extracelulares do que o tipo selvagem. Existe uma expectativa de que o melhor entendimento a respeito da função do QS na patogenicidade irá oferecer novas oportunidades para combater as bactérias que causam doenças não apenas em plantas, mas também em humanos e animais (JOINT, 2006).

Moléculas que mimetizam AHLs têm sido identificadas em plantas como ervilha, soja, arroz e *Medicago truncatula* (TEPLITSKI; ROBINSON; BAUER, 2000), sugerindo que as plantas podem ter adaptado a produção dessas moléculas como estratégia para se comunicar com bactérias específicas ou afetar a densidade e o comportamento populacional. Esta estratégia também pode ter sido adaptada para proteção das plantas contra patógenos (LOH et al., 2002; TEPLITSKI; ROBINSON; BAUER, 2000). Mae et al. (2001) demonstraram que plantas de tabaco expressando o gene *expl*, responsável pela biossíntese de AHL em *Erwinia caratovora*, apresentaram resistência à invasão bacteriana. Uma explicação para isso é que a produção da AHL da bactéria pela planta resultou na expressão prematura do gene *vir*, ativando respostas de defesa no hospedeiro.

1.1.1.3 Biofilmes bacterianos

Biofilme pode ser definido como células microbianas que se unem formando agregados limitados por uma matriz de exopolissacarídeos. O termo biofilme também é empregado para designar comunidades de microrganismos (bactérias ou fungos) mobilizadas sobre uma superfície inerte ou viva, que abriga, estabiliza e melhora a sobrevivência do organismo (KOLENBRANDER, 2000).

As bactérias do biofilme possuem propriedades significativamente diferentes das bactérias livres: uma plasticidade notável, um gradiente físico-químico significativo formando micronichos, além de estarem em um ambiente protegido com alta densidade celular que permite melhor comunicação entre as células. Com isso, as atividades bioquímicas, a cooperação dentro do grupo e também com colônias vizinhas são facilitadas (KREFT et al., 2001; KREFT, 2004; LEITE et al., 2001).

Bactérias que participam do biofilme possuem mecanismos para aderência às superfícies e à outras bactérias, colonizam águas, desenvolvem-se no interior de canos

ocasionando entupimento e corrosão. Além disso, são altamente resistentes a detergentes e antibióticos, pois as células das camadas inferiores são protegidas devido à alta densidade celular (KREFT, 2004). Essa estratégia de colonização utilizada pelas bactérias do biofilme também é a chave para a sobrevivência e dominância desses microrganismos que colonizam as plantas, visto que a localização em ambientes protegidos da superfície da planta e estruturas de biofilmes podem aumentar a resistência a estresses (MORRIS; MONIER, 2003).

Geralmente, a dinâmica de formação de um biofilme ocorre em etapas distintas. Inicialmente as células aderem de forma reversível a uma superfície-alvo. As células aderidas passam a se desenvolver originando microcolônias que sintetizam uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), que caracteriza o biofilme maduro, de forma que essa etapa do processo é irreversível. Quando o biofilme atinge uma determinada massa celular crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas do biofilme começam a liberar células em estado planctônico, que podem rapidamente se dispersar e se multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos biofilmes em novos locais. Com a ausência de nutrientes e/ou de oxigênio ou dificuldades na sua difusão, a diminuição do pH e a acumulação de metabólitos secundários tóxicos, inicia-se um processo de morte celular junto à superfície e subsequente desintegração do biofilme (VAN HOUTT; MICHIELS, 2005).

Para o melhor entendimento do biofilme na planta é necessária a criação de modelos de biofilmes epifíticos, criando um substrato para o desenvolvimento das bactérias e simulando seu crescimento, prevendo, assim, o comportamento do biofilme, como o fluxo de células e a plasticidade fenotípica (KREFT, 2004). Neste contexto, foi observado que *X. fastidiosa* pode formar biofilme em madeira, um material rico em tecido xilemático (MARQUES et al., 2002). Foi observado neste trabalho que isolados de diferentes hospedeiros formam biofilmes estruturalmente diferentes. Segundo os autores, foi possível agrupar os isolados de acordo com a morfologia do biofilme, habilidade de formar agregados em cultura líquida e a habilidade de aderirem na superfície de vidro, sendo sugerido que a formação de biofilme é um importante fator de virulência para *X. fastidiosa*. Posteriormente, Newman et al. (2004) observaram que a capacidade de produzir biofilme na planta e no inseto podem ser diferencialmente

regulados, e que um sinal difusível é necessário para a formação deste biofilme no inseto. Os autores observaram que mutantes defectivos para a formação da molécula sinalizadora DSF não formam biofilme no inseto vetor, nem tampouco são transmitidos por este inseto. Entretanto, estes mutantes formam biofilme na planta e apresentam uma maior virulência.

Em *Methylobacterium* spp., estudos mostram que a produção de biofilme parece ser dependente da produção de AHLs (PENÄLVER et al., 2006), e que a sua formação sobre a planta pode ser a primeira etapa para a colonização endofítica na interação *Methylobacterium*-planta (ANDREOTE et al., 2006), sugerindo a importância do entendimento destes processos para essa interação. GAI (2006) demonstrou que aparentemente a maior produção de AHLs não necessariamente leva a uma maior produção de biofilme, mostrando que muitos aspectos dessa relação ainda devem ser entendidos.

Dessa forma, parece ser verdade o fato de que a formação de biofilme seja uma capacidade importante de bactérias que interagem com a planta hospedeira, permitindo a sua proteção contra variações físico-químicas do ambiente, bem como uma maior interação com outros microrganismos.

1.1.2 Bactérias endofíticas

Endófitos são aqueles microrganismos que colonizam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais sadios como folhas, ramos e raízes, sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Dessa forma, são excluídos, por definição, os fungos micorrízicos, bactérias simbióticas nodulantes, microrganismos epifíticos e patogênicos. Essa comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, e ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causa prejuízos à planta hospedeira (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2003). Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição do termo 'microrganismo endofítico', considerando a definição anterior, e, adicionalmente, dividindo os endófitos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta.

Nos últimos anos, muitos trabalhos vêm relatando a presença de microrganismos no interior de tecidos vegetais assintomáticos abrindo, assim, perspectivas para o estudo das interações entre plantas e microrganismos endofíticos (AZEVEDO et al., 2000). Segundo Misaghi e Donndelinger (1990), a íntima relação entre bactérias endofíticas e seus hospedeiros envolveu processos coevolutivos, podendo, inclusive, influenciar mecanismos fisiológicos da planta. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre os aspectos genéticos, ecológicos e fisiológicos da interação planta-endófitos.

Todas as espécies vegetais estudadas até o momento apresentam endófitos. Estes já foram encontrados colonizando citros (ARAÚJO et al., 2001), beterraba açucareira (JACOBS; BUGBEE; GABRIELSON, 1985), algodão (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990), cana-de-açúcar (BODDEY et al., 1991; GANGWAR; KAUR; 2009), milho (ARAÚJO; SILVA; AZEVEDO, 2000), eucalipto (PROCÓPIO, 2004; FERREIRA et al., 2008), trigo (PIRTTILA et al., 2005), arroz (MADHAIYAN et al., 2007b; SANDHIYA et al., 2005), soja (ASSUMPÇÃO et al., 2009; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005), morango (DIAS et al., 2009), café (MEKETE et al., 2009), entre outras.

Alguns exemplos de plantas, aparentemente livres de endófitos, podem ser devidos a dificuldades de isolamento e cultivo desses microrganismos (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). O método de isolamento de bactérias endofíticas mais comumente empregado é o da trituração. Após os tecidos vegetais terem sido superficialmente desinfetados, são triturados em condições assépticas. O material triturado é, então, diluído e semeado em meio de cultura seletivo ou não-seletivo e incubado em condições apropriadas para obtenção dos endófitos (BACON; HINTON, 1997).

A densidade das populações de bactérias endofíticas é variável, dependendo do hospedeiro, das condições ambientais e do tecido amostrado, sendo normalmente observadas na raiz e na parte inferior do caule, havendo um decréscimo do caule até a folha (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996). Assim, as densidades populacionais de bactérias endofíticas podem variar de 10^2 a 10^6 UFC g⁻¹ de tecido fresco. Neste contexto, foi observado que o xilema de alfafa pode conter de $6,0 \cdot 10^3$ a $4,3 \cdot 10^4$ UFC g⁻¹ de tecido (GAGNÉ et al., 1987), enquanto que em citros podem ser encontradas de $3,7 \cdot 10^3$ a $1,27 \cdot 10^4$ UFC g⁻¹ de tecido vegetal (ARAÚJO et al., 2001).

De acordo com a estratégia de vida, bactérias endofíticas podem ser classificadas como obrigatórias ou facultativas. As primeiras são estritamente dependentes de seu hospedeiro para crescer, sobreviver e serem transmitidas para outras plantas, verticalmente ou via vetores, enquanto que as bactérias endofíticas facultativas têm um estágio em seu ciclo de vida em que podem viver fora do hospedeiro, no ambiente (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). De fato, a diversidade bacteriana observada no interior da planta poderia ser explicada pela habilidade de diversos endófitos penetrarem e persistirem na planta (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). Estes endófitos são frequentemente originados do solo e infectam a planta, inicialmente, via áreas de emergência de raízes laterais e radículas em germinação, se distribuindo rapidamente no interior do hospedeiro (CHI et al., 2005). Embora as partes aéreas das plantas (flores, caules, estômatos, cotilédones) também possam ser usadas pelas bactérias endofíticas para entrada na planta, as raízes são reconhecidas como “hot spots” para a colonização bacteriana (SØRENSEM; SESSITSCH, 2006). As bactérias endofíticas produtoras de celulasas e pectinases também podem penetrar a planta de forma ativa, além de usarem aberturas naturais ou locais de ferimentos (QUADT-HALLMANN; BENHAMOU, KLOEPPER, 1997a).

O modo de dispersão das bactérias endofíticas pode ser via propagação vegetativa, partes mortas da planta, insetos ou por meio de sementes (BALDANI, 1997). Nesse último caso, sugere-se que possam colonizar o sistema reprodutor da planta hospedeira e serem transmitidos verticalmente (HOLLAND, 1997; RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA., 2007).

Dentro da planta, as bactérias endofíticas podem permanecer em estado de latência ou colonizar ativamente os tecidos de forma local ou sistêmica, podendo habitar o apoplasto (MAHAFFEE et al., 1997; QUADT-HALLMANN; BENHAMOU; KLOEPPER, 1997a), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997; MAHAFFEE et al., 1997) e ocasionalmente o meio intracelular (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996; QUADT-HALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997b). Com essa colonização sistêmica, podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, agindo sobre populações de outros microrganismos presentes no interior da planta

(ANDREOTE et al., 2004; ANDREOTE et al., 2006; HALLMANN et al., 1997; M'PIGA et al., 1997).

Por ocuparem o mesmo nicho que fitopatógenos, bactérias endofíticas também apresentam potencial como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997; RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007). Este controle biológico pode ocorrer pela introdução desses endófitos como antagonistas aos fitopatógenos no ambiente onde eles interagem, podendo resultar em controle efetivo de doenças sem os efeitos indesejados dos defensivos (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000). Muitas bactérias endofíticas inibem fitopatógenos por meio de competição por nutrientes, indução de resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997; MADHAIYAN et al., 2004), por meio do parasitismo direto e ainda por meio da produção de diversos compostos químicos, incluindo quelatores de ferro (como os sideróforos), antibióticos, bioinseticidas voláteis e enzimas líticas (AIT BARKA et al., 2002; GLICK, 1995; STROBEL; DAISY, 2003; STURZ; CHRISTIE, 2003). Atualmente, com o auxílio da engenharia genética, novas formas de controle biológico vêm sendo desenvolvidas a partir de bactérias endofíticas. A introdução de genes exógenos nestes microrganismos possibilita a aquisição de novas características utilizadas no controle de doenças e pragas (DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000). Um exemplo disso é a transformação da bactéria endofítica *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* com o gene da endotoxina B de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Ostrinia nubilalis*, broca do milho (FAHEY et al. 1991; TOMASINO et al., 1995).

Outro efeito atribuído às bactérias endofíticas é a promoção de crescimento vegetal (BENT; CHANWAY, 1998; HALLMANN et al., 1997), que pode ocorrer através da solubilização de fosfato (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001), produção de fitohormônios (ácido indol-acético, citocinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno) (KUKILNSKY-SOBRAI et al., 2004; LEE et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2005; ZAKRAHOVA, 1999), fixação de N₂ (HALLMANN et al., 1997), ou ainda por meio da produção de sideróforos, uma vez que as bactérias são capazes de quelar o ferro presente no solo disponibilizando-o à planta (BURD; DIXON; GLICK, 1998). Vários outros efeitos benéficos relacionados à promoção de crescimento vegetal, tais como modificação da morfologia das raízes, ajustamento osmótico e aumento da eficiência de

obtenção de minerais, têm sido atribuídos às bactérias endofíticas (COMPANT et al., 2005a,b).

As bactérias endofíticas também têm despertado atenção quanto a sua aplicação como fitoremediadoras de áreas poluídas (BARZANTI et al., 2007; NEWMAN; REYNOLDS, 2005). Recentemente, Germanie et al. (2006) mostraram que *Pseudomonas putida* POPHV6, naturalmente degradadora do ácido 2,4 diclofenóxiacético, quando geneticamente modificada e inoculada em *Pisum sativum*, induziu a planta hospedeira a remover o herbicida do solo e em reduzir seu acúmulo nos tecidos aéreos da planta, demonstrando a utilidade desses microrganismos no aumento da fitoremediação de solos contaminados e na redução dos efeitos fitotóxicos dos herbicidas em plantas cultivadas.

Conforme visto, as bactérias endofíticas têm sido empregadas para diversos fins. A presença no interior da planta hospedeira fez desses microrganismos uma valiosa ferramenta para a agricultura, cujo potencial deve ser ainda melhor explorado.

1.1.3 O gênero *Methylobacterium*: aspectos gerais e sua importância como endófito

O gênero *Methylobacterium* pertence à ordem Rhizobiales, família Methylobacteriaceae e subclasse α -2 de Proteobacteria, possuindo mais de 28 espécies descritas. Recentemente, *M. oryzae* e *M. phyllosphaerae* foram descritas como novas espécies endofíticas isoladas de arroz (MADHAIYAN et al., 2007b; MADHAIYAN et al., 2009a).

As bactérias do gênero *Methylobacterium* são metilotróficas facultativas, ou seja, são capazes de utilizar compostos de apenas um carbono como metanol e metilamina para seu crescimento (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998). Possuem coloração rósea, sendo denominadas PPMFs – *Pink Pigmented Facultative Methylophiles* (VAN DIEN et al., 2003). A principal característica desse grupo está na habilidade de oxidar metanol por meio da metanol desidrogenase (MDH), codificada pelo gene *mxnA* (ANTHONY; GHOSH; BLAKEI, 1994). Encontram-se distribuídas em uma variedade de ambientes naturais incluindo o solo, ar, poeira, água doce e salgada, sedimentos, ambientes urbanos (tais como suprimento de água, banheiros e ar condicionado) (VAN

AKEN et al., 2004a) e plantas (ANDREOTE et al., 2006; ARAÚJO et al., 2002; FERREIRA et al., 2008; MADHAIYAN et al., 2007a,b; MADHAIYAN et al., 2009a,b; SENTHILKUMAR et al., 2009; SY et al., 2001).

Methylobacterium spp. naturalmente produzem várias substâncias de interesse comercial como polihidroxiburitato (PHB), vitamina B12 e carotenóides (TROTSENKO; IANOVA; DORONINA, 2001). Além disso, já foi verificado que essas bactérias também têm potencial para degradar compostos explosivos tóxicos. *Methylobacterium* sp. BJ001 foi capaz de degradar TNT, sugerindo um papel desta bactéria 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 (VAN AKEN et al., 2004b).

Methylobacterium spp. interagem de maneira simbiótica com diferentes espécies de plantas (OMER; TOMBOLINI; GERHARDSON, 2004), colonizando ativamente a superfície de folhas de diferentes hospedeiros (CHANPRAME; TODD; WIDHOLM, 1996), sendo encontrados como endófitos de citros (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004) pinus (PIRTTILA et al., 2000), crotalária (SY et al., 2001), soja (ASSUMPÇÃO et al., 2009; KUKLINSKY-SOBRAAL et al., 2005), algodão (MADHAIYAN et al., 2006a), eucalipto (FERREIRA et al., 2008), arroz (MADHAIYAN et al., 2007b; MADHAIYAN et al., 2009a), legumes tropicais (MADHAIYAN et al., 2009b) entre outras culturas.

A presença do gene da nitrogenase (*nifH*) já foi descrita em espécies deste gênero (SY et al., 2001), sugerindo a possibilidade destes organismos fixarem N₂, suprimindo a planta hospedeira com fontes orgânicas de nitrogênio. Esta interação foi reforçada também pela presença de genes envolvidos com a nodulação de plantas (gene *nodA*) em linhagens de *Methylobacterium* (SY et al., 2001).

Espécies de *Methylobacterium* também podem sintetizar pectinase e celulase, fato este que pode sugerir que estas bactérias podem induzir resistência sistêmica na planta hospedeira (FERREIRA FILHO; ARAÚJO; KULINSKY- SOBRAAL, 2001). Além disso, podem promover o crescimento vegetal e estimular a germinação de sementes, possivelmente devido à produção de fitohormônios, como o ácido 3 indol acético (AIA) e giberelinas (LEE et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2005; SENTHILKUMAR et al., 2009).

Também contribuem para a flavorização de morangos, e têm sido observadas como endossimbiontes de células de *Pinus sylvestris* (PIRTTILA et al., 2000).

Estudos realizados por Madhaiyan et al. (2004) mostraram que a inoculação de *Methylobacterium* em plantas de arroz diminuiu a susceptibilidade destas ao patógeno *Rhizoctonia solani*, possivelmente devido ao aumento de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e compostos fenólicos na planta. A coinoculação com *Rhizobium* spp. resultou em aumento significativo do crescimento vegetal e nodulação, quando comparados ao inóculo individual de *Rhizobium* spp. Em experimento semelhante, Madhaiyan et al. (2006b) mostraram que *Methylobacterium* spp. induziram respostas de defesa em amendoim contra *Aspergillus niger* e *Sclerotium rolfsii*. Também em coinoculação com *Rhizobium* spp., houve aumento significativo no crescimento da planta e na nodulação quando comparado ao inóculo individual de *Rhizobium* spp. Assim, os autores sugerem a possibilidade de *Methylobacterium* spp. serem empregadas no controle biológico de fitopatógenos.

Para elucidar a interação molecular entre PPFMs e plantas, Abanda-Nkpwatt et al. (2006) testaram um isolado obtido de morango, *Methylobacterium extorquens* ME4, quanto a habilidade em promover crescimento e germinação de sementes de várias espécies vegetais. Verificaram que ocorreu aumento significativo do peso e do comprimento de raízes de *Nicotina tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Sinapis alba* e *Fragaria vesca*, mas não houve ganho aparente quando em avaliação com outras 6 espécies de plantas, demonstrando que um número maior de estudos com *Methylobacterium* spp. é necessário para melhor aproveitá-las como promotoras de crescimento vegetal.

O potencial de *Methylobacterium* spp. em promover crescimento de diversas plantas de importância econômica também já foi verificado em cana-de-açúcar (MADHAIYAN et al., 2005), arroz (LEE et al., 2006), tomate (MADHAIYAN et al., 2007a) e em legumes tropicais (MADHAIYAN et al., 2009b). Em tomate, os autores sugerem que além de promover crescimento, *Methylobacterium* conferiu proteção contra a toxicidade de níquel e cádmio, reduzindo a translocação dos metais pesados nas plantas que estavam presentes em solos contaminados.

Em citros, *Methylobacterium* spp. têm sido consistentemente isoladas como endófitos (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004). Araújo et al. (2002) estudaram, por técnicas moleculares, a associação entre a comunidade bacteriana endofítica de *Citrus sinensis* e a presença de plantas resistentes à CVC. Os autores observaram que o gênero *Methylobacterium* foi isolado principalmente de plantas afetadas pela CVC. Pela primeira vez, foi cogitada a possibilidade do controle biológico desta doença por meio de tais bactérias. 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 CVC poderia desempenhar um papel no estabelecimento de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira. Esta hipótese seria endossada pela análise da diversidade de *Methylobacterium* spp., pois este gênero foi o mais frequentemente isolado de plantas sintomáticas. Além disso, foi observado um efeito sinérgico de *Methylobacterium* spp. no crescimento de *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2004). Andreote et al. (2006) demonstraram que *M. mesophilicum* isolada de citros colonizou *Catharanthus roseus* e *Nicotina clevelandii* quando inoculadas nas plantas, sugerindo o uso dessas plantas como modelo para o estudo de interação entre a bactéria endofítica e *X. fastidiosa*. *M. mesophilicum* também foi capaz de colonizar endofiticamente os tecidos de *C. roseus* quando transmitido por cigarrinhas às plantas, demonstrando que este isolado é um possível candidato a ser utilizado para o controle biológico contra *X. fastidiosa* (GAI et al., 2009).

Atualmente, a disponibilidade de ferramentas genéticas, o sequenciamento de genomas e os estudos do metabolismo central (VAN DIEN; LIDSTROM, 2002), têm despertado interesse para a utilização de *Methylobacterium* para a produção de vários bioprodutos. Nesse sentido, a expressão de proteínas heterólogas em *M. extorquens* AM1 e ATCC 55366 tem sido reportada em vários estudos, e incluem, entre outras, a proteína verde fluorescente (GFP), esterase de *Lactobacillus casei* CL96, 2,3 catecol-dioxigenase de *Pseudomonas putida*, enterocina P de *Enterococcus faecium* e a δ -endotoxina de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BÉLANGER et al., 2004; CHOI, MÍGUEZ, LEE, 2004; CHOI et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2005; FITZGERALD, LIDSTROM, 2003).

1.1.4 Produção de mudas cítricas em viveiros

O agronegócio da citricultura é um dos setores brasileiros mais competitivos. Ocupa uma área de 843.266 mil hectares, concentrada no Estado de São Paulo, que participa com 78,42% da produção nacional de frutos (IBGE, 2010). De acordo com previsão do Instituto de Economia Agrícola (IEA/Apta/SAA) e da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral da Secretaria (CATI), a produção na safra agrícola 2008/09 foi estimada em 352.57 milhões de caixas de laranja (<http://www.iesa.sp.gov>). Em termos financeiros, a laranja para a indústria ocupa a terceira posição do Estado, com valor da produção de R\$ 2,5 bilhões, atrás apenas da cana-de-açúcar e da carne bovina. Dentro do contexto do mercado internacional, em 2008, São Paulo exportou US\$1.996 bilhões em laranja (suco concentrado, frutas frescas, entre produtos derivados). Apenas em termos de suco concentrado, São Paulo exportou US\$ 1.910 bilhões (<http://www.apta.sp.gov.br>).

A produção de mudas de citros em São Paulo em viveiros telados é lei desde 2003, o que veio contribuir para a proteção contra insetos vetores de doenças como a CVC e o Greening (<http://www.fundecitrus.com.br>). A muda cítrica é geralmente formada por dois indivíduos: o porta-enxerto (ou cavalo) e o enxerto (ou copa), unidos por meio da enxertia. Cerca de 85% dos pomares produzidos no Estado de São Paulo estão plantados sobre o porta-enxerto limoeiro 'Cravo'. Além deste, os porta-enxertos 'Swingle', 'Sunki', 'Cleópatra' e os trifoliatas também são empregados na produção de mudas (POMPEU JÚNIOR, 2005). Cada espécie tem suas particularidades e apresentam diferentes resistências ou tolerâncias às doenças; a escolha do porta-enxerto deve, assim, recair sobre aquela espécie que apresente maior resistência ou tolerância às doenças do local do plantio (CARLOS, STUCCHI; DONADIO, 1997; POMPEU JÚNIOR, 2001).

Dentre as variedades de copas utilizadas estão a Laranja Lima, Hamlin, Pêra, Valência e outras. A escolha das variedades também deve ser feita em função da expectativa de comercialização do produto no mercado, quer seja para a indústria ou para o mercado de fruta fresca. Além disso, existem algumas incompatibilidades entre copa e porta-enxerto. Assim, deve-se ser cauteloso na escolha dessa combinação.

Plantas enxertadas serão praticamente idênticas à planta-mãe das quais se originam. Caso o material enxertado seja proveniente de plantas improdutivas ou com problemas de doenças, estas características negativas serão reproduzidas nas plantas enxertadas. Daí a importância da escolha de um material sadio e com potencial produtivo (POMPEU JÚNIOR, 2001).

Os porta-enxertos podem ser produzidos em tubetes plásticos, bandejas ou embalagens definitivas (CARVALHO, 1998). Com o objetivo de melhorar a sanidade, acelerar e uniformizar a germinação, alguns viveiristas retiram o tegumento externo das sementes. A semeadura pode ser feita utilizando-se de 1 a 3 sementes por tubete, dependendo da variedade e da porcentagem de germinação do lote de sementes. De acordo com a variedade e das condições de cultivo, os porta-enxertos apresentam de 10 a 15 cm de altura, após 3 a 5 meses de cultivo, e podem ser transplantados para recipientes definitivos, onde é completada a formação das mudas (GRAF, 1999).

Dessa forma, a produção de mudas cítricas em ambiente protegido e com adoção de medidas sanitárias adequadas consiste no primeiro passo para a obtenção de pomares de qualidade e livres de doenças.

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, n. 15, p. 4025-4032, 2006.

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS – APTA. Disponível em: < <http://www.apta.sp.gov.br/noticias.php?id=3269> > Acesso em: 10 maio 2009.

AIT BARKA, E.; GOGNIES, S.; NOWAK, J.; AUDRAN, J.C.; BELARBI, A. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. **Biological Control**, Orlando, v. 24, p. 135-142, 2002.

ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p.169-173, 2004.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 154-180, 2000.

ANTHONY, C.; GHOSH, M.; BLAKEI, C.C.F. The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrroloquinoline quinone. **Biochemical Journal**, London, v. 304, p. 665-674, 1994.

ARAÚLO, J.M.; SILVA, A.C.; AZEVEDO, J.L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, p. 447-451, 2000.

ARAÚLO, W.L. **A comunidade bacteriana endofítica de citros e sua interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC)**. 2000. 131p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

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.

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

ASSUMPÇÃO, L.C.; LACAVA, P.T.; DIAS, A.C.F.; AZEVEDO, J.L.; MENTEN, J.O.M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-Meio Ambiente, 1998. cap. 4, p. 117-137.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 3, p.40-65, 2000.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap.6. p.189-207.

BACON, C.W.; HINTON, D.M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: HURST, C.; KNUDSEN, G.R.; McLNERNEY, M.; STZENBACH, L.; WALTER, M.V. (Ed.). **Manual of environmental microbiology**. Washington: ASM Press, 1997. p. 413-421.

BACON, C.W.; WHITE, J.F. Microbial endophytes. In: HORNBY, D. (Ed.). **Biological control of soil-borne plant pathogens**. New York: Marcel Dekker, 2000. 1v.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 29, p. 911-1022, 1997.

BARNARD, A.M.L.; BOWDOWN, S.D.; BURR, T.; COULTHURST, S.J.; MONSON, R.E.; SALMOND, G.P.C. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. **Philosophical Transactions the Royal Society B**, London, v. 362, p. 1165-1183, 2007.

BARON, C.; ZAMBRYSKI, P.C. The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme? **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 29, p. 107-129, 1995.

BARZANTI, R.; OZINO, F.; BAZZICALUPO, M.; GABBRIELLI, R.; GALARDI, F.; GONNELLI, C.; MENGONI, A. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulation plant *Alyssum bertolonii*. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, n. 2, p. 306-316, 2007.

BAUER, W.D.; MATHESIUS, U. Plant responses to bacterial quorum sensing signals. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 429-433, 2004.

BÉLANGER, L.; FIGUEIRA, M.M.; BOURQUE, D.; MOREL, L.; BÉLAD, M.; LARAMÉE, L.; GROLEAU, D.; MÍGUEZ, C.B. Production of heterologous protein by *Methylobacterium extorquens* in high cell density fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 231, p. 197-204, 2004.

BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 980-988, 1998.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 111-117, 1991.

BOTTON, H.; FREDRIKSON, J.K.; ELLIOT, L.E. Microbial ecology of the rhizosphere. In: MEETING, JR.; F.B. (Ed.). **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker. 1992. p. 27-63.

BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. A plant growth-promotion bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, n. 10, p. 3663-3668, 1998.

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

CARLOS, E.F.; STUCCHI, E.S.; DONADIO, L.C. **Porta-enxertos para a citricultura Paulista**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. (Boletim Citrícola n. 1/1997)

CARVALHO, S.A. Estratégias para estabelecimento e manutenção de matrizes, borbulheiras e viveiro de citros em ambiente protegido. In: DONADIO, L.C.; RODRIGUEZ, O. SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS - TRATOS CULTURAIS, 5., 1998. Bebedouro. **Anais ... Bebedouro**: Fundação Cargill, 1998. p. 67-101.

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

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.

CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, n. 71, p. 7271-7279, 2005.

CHOI, Y.J.; MÍGUEZ, C.B.; LEE, B.H. Characterization and heterologous gene expression of a novel esterase from *Lactobacillus casei* CL96. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 3213-3221, 2004.

CHOI, Y.J.; LAWRENCE GRIGORTEN, J.; BÉLANGER, L.; MOREL, L.; BOURQUE, D.; MASSON, L.; GROLEAU, D.; MÍGUEZ, C.B. Production of an Insecticidal Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis* by the Methylotroph *Methylobacterium extorquens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 74, p. 5178-5182, 2008.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 4951-4959, 2005a.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, p. 1695-1693, 2005b.

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

DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; TEIXEIRA, M.A.; ASSUMPÇÃO, L.C.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.

DOWNING, K.J.; LESLIE, G.; THOMSON, J.A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2804-2810, 2000.

FAHEY, J.W.; DIMOCK, M.B.; TOMASINO, S.F.; TAYLOR, J.M.; CARLSON, P.S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study in industry. In: _____ **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer – Verlag, 1991. p. 401-411.

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

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.J.; ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 287, n. 1, p. 8-14, 2008.

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

FUJISHIGE, N. A.; KAPADIA, N. N.; HIRSCH, A. M. A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.150, p.79-88, 2001.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA – FUNDECITRUS. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/Default.aspx?IDPagina=164>> Acesso em: 09 dez 2009.

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

GAI, C.S.; LACAVA, P.T.; QUECINE, M.C.; AURIAC, M.C.; LOPES, J.R.S.; ARAÚJO, W.L.; MILLER, T.A.; AZEVEDO, J.L. Transmission of *Methylobacterium mesophilicum* by *Bucephalogonia xanthophis* for paratransgenic control strategy of Citrus Variegated Chlorosis. **The Journal of Microbiology**, Korea, v. 47, n. 4, p. 448-454, 2009.

GANGWAR, M.; KAUR, G. Isolation and characterization of endophytic bacteria from endorhizosphere of sugarcane and ryegrass. **The Internet Journal of Microbiology**TM ISSN: 1937-8289, v. 7, n. 1, 2009.

GAGNÉ, S.; RICHARD, C.; ROUSSEAU, H.; ANTOUN, H. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, p. 996-1000, 1987.

GERMANIE, K.J.; LIU, X.; CABELLOS, G.G.; HOGAN, J.P.; RYAN, D.; DOWLING, D.N. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 57, p. 302-310, 2006.

GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. Ammonia movements in rhizobia. **Microbiological Sciences**, Oxford, v. 2, p. 161-167, 1985.

GLICK, B. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109-117, 1995.

GRAF, C.C. Produção de mudas sadias. In: EPAMIG (Ed.). **Citricultura do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba**. Uberaba: EPAMIG, 1999. p.37-40.

GUTIERREZ, J.; BOURQUE, D.; CRIADO, R.; CHOI, Y.J.; CINTAS, L.M.; HERNADEZ, P.E.; MÍGUEZ, C.B. Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 48, p. 125-131, 2005.

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.

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**, Amsterdam, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HIRANO, S.S.; HUPPER, C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 624-653, 2000.

HOLLAND, M.A. *Methylobacterium* in plants. **Recent Research Development**, Trivandrum, v. 1, p. 207-213, 1997.

HOLLAND, M.A.; LONG, R.L.G.; POLACCO, J.C. *Methylobacterium* spp. Phylloplane bacteria involved in cross-talk with the plant host? In: LINDOW, S.E.; HECHT-POINAR, E.I.; ELLIOT, V.J. (Ed.). **Phyllosphere microbiology**. Saint Paul : APS, 2002. p. 125-135.

IBGE: Fonte – Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO - Levantamento Sistemático de Produção Agrícola, Fev. 2010.

Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>

Acesso em: 02. Abril. 2010.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA – IEA. Disponível em: <<http://www.iaa.sp.gov>> Acesso em: 15 maio 2009.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 7, p. 1262-1265, 1985.

JOINT, I. Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping. A NERC Discussion Meeting held at the Royal Society on 7 December 2005. **Journal of Royal Society Interface**, London, v. 3, p. 459–463, 2006.

KENNEDY, N.M.; GLEESON, D.E.; CONNOLLY, J.; CLIPSON, N.J.W. Seasonal and management influences on bacterial community structure in an upland grassland soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 53, n. 3, p. 329-337, 2005.

KHMEL, I.A. Quorum-sensing regulation of gene expression: fundamental and applied aspects and the role in bacterial communication. **Microbiology**, New York, v. 75, n. 4, p. 390-397, 2006.

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

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

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

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for growth plant promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 273, p. 91-99, 2005.

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

LAUBER, C.L.; STRICKLAND, M.S.; BRADFORDA, M.A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 9, p. 2407-2415, 2008.

LEE, H.S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C.W.; 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 N₂-fixing methylotrophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 402-408, 2006.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACION, M.; CONTRERAZ-ZENTELLA, M.; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J.E.; KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis gene. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, p. 5384-5391, 2004.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S.F.; KITAJIMA, E.W.; ISHIDA, M.L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. In: REVISÃO ANUAL DE PATOLOGIA DE PLANTAS, 9., 2001. Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo, 2001. p. 1-41.

LINDOW, S.E.; ANDERSEN, G.L. Influence of immigration on epiphytic bacteria populations on navel orange leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 2978-2987, 1996.

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

LOH, J.; CARLSON, R.W.; YORK, W.S.; STACEY, G. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. **PNAS**, Washington, v. 99, p. 144-146, 2002.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SA, T. Metal tolerating methylotrophic bacteria induces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Chemosphere**, Oxford, v. 69, p. 220-228, 2007a.

MADHAIYAN, M.; KIM, B.Y.; POONGUZHALI, S.; KWON, S.W.; SONG, M.H.; RYU, J.H.; GO, S.J.; KOO, B.S.; SA, T.M. *Methylobacterium oryzae* sp nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-L-carboxylate deaminase producing bacterium isolated from rice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 326-331, 2007b.

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**, República da Coréia, v. 59, p. 22-27, 2009a.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H.S.; SUANDARAM, S.P. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 41, n.5, p. 350-358, 2005.

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.) v. 53, n. 4, p. 270-276, 2006. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 168-176, 2006a.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H.Y.; YANG, J.C.; SUNDARAM, S.; SA, T.M. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar C0-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 45, n. 4, p. 315-324, 2004.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SUNDARAM, S.P.; SA, T. Nodulation and plant-growth promotion by methylotrophic bacteria isolated from tropical legumes. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 164, p. 114-120, 2009b.

MADHAIYAN, M.; SURESH REDDY, B.V.; ANANDHAN, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; TONGMIN SA. 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.

MAE, A.; MONTESANO, M.; KOIV, V.; PALVA, E.T. Transgenic plants producing the bacterial pheromone *N*-Acyl-Homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 9, p. 1035-1042, 2001.

McCULLY, M.E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 983-990, 2001.

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.

MARCH, J.C.; BENTLEY, W.E. *Quorum sensing* and bacterial cross-talk in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 15, p. 495–502, 2004.

MARQUES, L.L.R.; CERI, H.; MANFIO, G.P.; REID, D.M.; OLSON, M.E. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 633-638, 2002.

MARSCHNER, P.; YANG, C.H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1437-1445, 2001.

MEKETE, T.; HALLMANN, J.; KIEWNICK, S.; SIKORA, R. Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Chapel Hill, v. 11, n. 1, p. 117-127, 2009.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L.C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Ed.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE, 2007. p. 129-140.

MILLER, M. B.; BASSLER, B.L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 165–195, 2001.

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, p. 301-320, 1997.

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

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; BADOSA, E.; FRANCÉS, J.; ALEMANY, J.; LLORENTE, I.; MORAGREGA, C. Plant microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, Barcelona, v. 5, p. 169-175, 2002.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 429-453, 2003.

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

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and Phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 23, p. 6-8, 2005.

OLIVEIRA, C.G. **Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum***. 2005. 159p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

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

PEIXOTO-NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 62-76, 2003.

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

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.

PIRTTILA, A.M.; POSPIECH, H.; LAUKKANEN, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Seasonal variations in location and population structure of endophytes in buds of Scots pine. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, n. 3, p. 289-297, 2005.

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, n. 12. p. 2130-2134, 2009.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros**. Campinas: IAC. Fundag: 2005. cap. 4. p. 61-104.

POMPEU JÚNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo State. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 2001. p. 75-82.

PROCÓPIO, R.E.L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucaliptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 101p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2004.

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

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

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, 1997b.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localizations and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 29-54, 1998.

ROSAS, J.C.; CASTRO, J.A.; ROBLETO, E.A.; HANDELSMAN, J. A method for screening *Phaseolus vulgaris* L. germplasm for preferential nodulation with a selected *Rhizobium etli* strain. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 203, p. 71-78, 1998.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.; SCHMELZER, R. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, p. 261-273, 1992.

RYU, C.M.; KIM, J.; CHOI, O.; KIM, S.H.; PARK, C.S. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 282-289, 2006.

SANCHES-CONTRERAS, M.; BAUER, W.D.; GAO, M.; ROBINSON, J.B.; DOWNIE, A. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, London, v. 362, p. 1149-1163, 2007.

SANDHIYA, G.S.; SUGITHA, T.C.K.; BALACHANDAR, D.; KUMAR, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by diazotrophic *Serratia* sp. In rice. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 43, n. 9, p. 802-807, 2005.

- SANTOS, L.C. dos. **Produção de bacteriocinas por endófitos de citros e caracterização da endoficina de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofítico.** Piracicaba 2005. 121p. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- SCHUHEGGER, R.; IHRING, A.; GANTNER, S.; BAHNWEG, G.; KNAPPE, C.; VOGG, G.; HUTZLER, P.; SCHMID, M.; VAN BREUSEGEM.; EBERL, L.; HARTMANN, A.; LANGEBARTELS, C. Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 909-918, 2006.
- SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 25-29, 2007.
- SENTHILKUMAR, M.; MADHAIYAN, M.; SUNDARAM, S.P.; KANNAIYAN, S. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 164, p. 92-104, 2009.
- SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 191-196, 1999.
- SMITH, R.S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 485-492, 1992.
- SMITH, K.P.; HANDELSMAN, I.; GOODMAN, R.M. Genetic basic in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. **Proceedings of National Academic Science of United States of America**, Washington, v. 96, p. 4786-4790, 1999.
- SØRENSEN, J.; SESSITSCH, A. Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. In: VAN ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T. (Ed.). **Modern soil microbiology**. 2nd ed. Fort Coolins: CRC Press, 2006. p. 211-236.
- SOTO, M.J.; SANJUÁN, J.; OLIVARES, J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. **Microbiology**, New York, v. 152, p. 3167-3174, 2006.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 72, p. 107-123, 2003.

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

TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J.B.; BAUER, W.D. Plant secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and effect population density-dependent behaviors in associated bacteria. **NPMI**, Columbia, v. 13, n. 6, p. 637-648, 2000.

THOWTHAMPITAK, J.; SHAFFER, B.T.; PRATHUANGWONG, S.; LOPER, J.E. Role of *rpff* in virulence and exoenzyme production of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the causal agent of Bacterial Pustule of Soybean, **Phytopathology**, Lancaster, v. 98, n. 12, p. 1252-1260, 2008.

TOMASINO, S.F.; LEISTER, R.T.; DIMOCK, M.B.; BEACH, R.M.; KELLY, J.L. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontes* expressing the insecticidal protein gene *cryIA(c)* of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 442-448, 1995.

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

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.

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 methylo-trophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1191-1196, 2004a.

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

VAN DIEN, S.J., LIDSTROM, M.E. Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylo-troph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C3 and C4 metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 78, p. 296-312, 2002.

VAN DIEN, S. J.; MARX, C.J.; O'BRIEN, B.N.; LIDSTROM, M.E. Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 69, n. 12, p. 7563-7566, 2003.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C.W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation, **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, p. 626-633, 2005.

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

VON BODMAN, S.B.; BAUER, W.D.; COPLIN, D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 455-482, 2003.

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

WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J.M. Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 44-51, 2003.

WHITE, E.W.; WINANS, S.C. Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 362, p. 1135-1148, 2007.

ZAKHAROVA, E.A. Biosynthesis of indol-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 259, p. 572-576, 1999.

2 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CITROS POR *Methylobacterium* spp.

Resumo

A habilidade de *Methylobacterium* spp. endofíticas isoladas de *Citrus* spp., *Capsicum annuum* L. e *Saccharum officinarum* L., para induzir a germinação de sementes e o crescimento de porta-enxertos de citros (limão-cravo - *Citrus limonia* Osbeck e tangerina sunki – *Citrus sunki*), foi avaliada em viveiro comercial. Para isso, foram desenvolvidos três experimentos e testadas duas metodologias: bacterização de sementes e inoculação das bactérias no substrato. A primeira metodologia foi aplicada para testes em limão-cravo e tangerina sunki, e a segunda em testes com tangerina sunki. Quando o método de bacterização das sementes foi utilizado, as respostas sobre a germinação variaram de acordo com o porta-enxerto utilizado. Exceto pelos efeitos negativos gerados por uma linhagem de citros (AR1.6/2), as demais não afetaram a germinação das sementes de limão-cravo. Em tangerina sunki, foi observado um possível efeito positivo sobre a germinação. Porém, mais estudos devem ser realizados para a confirmação desse resultado. Com o decorrer do tempo de desenvolvimento das mudas, foi observada uma maior diferenciação entre as linhagens, sendo que aquelas isoladas de citros foram as que melhor promoveram crescimento nos dois porta-enxertos, tanto em altura quanto em biomassa. Quando as bactérias foram inoculadas diretamente no substrato, os efeitos sobre a altura das mudas de tangerina sunki foram mais rápidos do que quando foram inoculadas pela metodologia de bacterização de sementes. Ao final da produção, as linhagens de citros AR1.6/2, AR1.6/11 e SR1.6/6, e a linhagem de pimentão TP4/2 promoveram o crescimento dos porta-enxertos em condição comercial. Os efeitos benéficos sobre o crescimento de tangerina sunki por *Methylobacterium* spp. foram também observados pelo aumento da biomassa das plantas. Nenhum efeito sobre o diâmetro do caule foi observado. Análises de características funcionais de *Methylobacterium* spp. revelaram a produção de AIA e a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, sendo esses os possíveis mecanismos envolvidos com a promoção de crescimento das plantas por essas bactérias. Por meio de reisolamento em meio de cultura e análise de ARDRA foi confirmado que *Methylobacterium* spp. colonizaram endofiticamente os porta-enxertos de citros. Conforme verificado com os resultados obtidos com o isolamento de bactérias endofíticas de sementes de limão-cravo e tangerina sunki, *Methylobacterium* spp. parecem ser transmitidas horizontalmente em plantas cítricas. Os resultados sugerem que *Methylobacterium* spp. colonizam endofiticamente a planta hospedeira e têm potencial como promotoras de crescimento de citros em condições comerciais.

Palavras-chave: *Methylobacterium* spp.; *Citrus* spp.; Interação bactéria-planta; Promoção de crescimento

2 CITRUS GROWTH PROMOTION BY *Methylobacterium* spp.

Abstract

The ability of endophytic isolates of *Methylobacterium* spp. obtained from *Citrus* spp., *Capsicum annuum* L. and *Saccharum officinarum* L., to induce plant growth and seed germination of rootstocks seedlings (*Citrus limonia* Osbeck and *Citrus sunki*), was evaluated under commercial nursery conditions. For this purpose, three experiments were developed and two methodologies were tested: bacterization of seeds and inoculation of the bacteria in the substrate. The first method was applied to trials with *Citrus limonia* Osbeck and *Citrus sunki*, and the second one was only applied to trials with *Citrus sunki*. Using seed bacterization methodology, the answers to germination showed variation, depending on the rootstock. Except for the negative effects generated by one strain of citrus (AR1.6/2), other strains didn't affect the seed germination of *Citrus limonia* Osbeck plants. In *Citrus sunki*, it was observed a possible positive effect on germination. Nonetheless, more studies must be carried out in order to confirm these results. According to the seedlings development, a larger differentiation was observed among the strains. Those isolated from citrus improved growth in either rootstocks, both in height and in biomass. The effects on seedlings' height of *Citrus sunki* plants were faster when the bacteria were inoculated directly in the substrate than when inoculated by seed treatment. The citrus strains AR1.6/2, AR1.6/11 and SR1.6/6, and *Capsicum annuum* L. strain TP4/2 promoted growth of rootstocks in commercial nursery conditions. The positive effects on tangerine sunki growth, caused by *Methylobacterium* spp., were also observed by increasing in plant biomass. No effect was observed in the stem diameter. Analysis of functional characteristics from *Methylobacterium* spp. revealed IAA production and nitrogen biological fixation, which can be the possible mechanisms involved with plant growth promotion. Through reisolation in culture medium and ARDRA analysis, it was confirmed that *Methylobacterium* spp. settled endophytically citrus rootstocks. As verified in obtained results regarding the isolation of edophytic bacteria from *Citrus limonia* Osbeck and *Citrus sunki* seeds, *Methylobacterium* spp. seem to be transmitted horizontally in citrus plants. The results suggest that *Methylobacterium* spp. colonize endophytically the plant host and have potential as citrus growth promoters under commercial nursery conditions.

Keywords: *Methylobacterium* spp.; *Citrus* spp.; Bacteria-plant interaction; Growth promotion

2.1 Introdução

As bactérias associadas às plantas têm um papel chave na adaptação do hospedeiro, seja em ambientes naturais ou em locais alterados pelo homem numa estratégia de promover uma melhor associação entre esses microrganismos e algumas culturas (HALLMANN et al., 1997; STURZ; NOWAK; 2000a).

Frequentemente, os efeitos benéficos das bactérias endofíticas são maiores do que das bactérias que colonizam a rizosfera das plantas (PILLAY; NOWAK, 1997). Assim, os endófitos podem ser de particular interesse para aplicação agrícola, uma vez que apresentam a vantagem de estarem em um ambiente menos exposto a mudanças ambientais e com um menor número de competidores (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000b; WHIPPS, 2001).

Algumas bactérias endofíticas são obrigatórias, ou seja, são estritamente dependentes da planta hospedeira para crescer e se desenvolver, sendo transmitidas para outras plantas verticalmente ou via vetores. Mas existem também aquelas facultativas, que tem um estágio de vida em que podem viver fora do hospedeiro, geralmente no solo (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). Estas últimas constituem a maioria dos endófitos. Vivem no ambiente externo e de acordo com as condições oferecidas, penetram e se estabelecem no interior do hospedeiro (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). Ao se estabelecerem na planta, frequentemente as bactérias endofíticas podem afetar as atividades fisiológicas do hospedeiro, modulando seu crescimento, desenvolvimento, causando mudanças na qualidade e produtividade da cultura (CONRATH et al., 2006; HOLLAND; LONG; POLACCO, 2002; KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989; STURZ; NOWAK, 2000a).

Os mecanismos pelos quais as bactérias beneficiam o hospedeiro incluem, entre outros, o aumento da disponibilidade de nutrientes, indução de mecanismos de defesa da planta, produção de antibióticos, competição com patógenos, produção de fitohormônios e enzimas (GLICK, 1995; KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989; LODIEWYCKX et al., 2002; VAN LOON; BAKKER, 2004).

A existência do gênero *Methylobacterium* como endófito de várias culturas o torna potencialmente interessante para aplicação agrícola. Vários estudos vêm demonstrando os benefícios diretos dessas bactérias sobre o crescimento vegetal, possivelmente pela produção de fitohormônios (KOENING; MORRIS; POLACCO, 2002; LEE et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2006; OMER et al., 2004b) e pela fixação de nitrogênio (MADHAIYAN et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2009a; SY et al., 2001). Além disso, podem atuar como agentes de controle biológico de fitopatógenos, quando o efeito benéfico sobre o crescimento vegetal seria indireto (MADHAIYAN et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2006).

A citricultura brasileira possui grande importância social e econômica, gerando milhares de empregos diretos e indiretos, além de produtos para consumo interno e para exportação. Ocupa uma área de 843.266 mil hectares, concentrada no Estado de São Paulo, que participa com 78,42% da produção nacional de frutos (IBGE, 2010). Levantamentos recentes da produção agrícola apontaram uma produção de 19.080.755 toneladas de laranjas em território nacional em fevereiro de 2010, com rendimento médio da safra estimado em 22.627 (IBGE, 2010).

A atividade citrícola tem passado por vários ciclos de negócio que reflete em fases de alta e baixa dos preços (NEVES; RUMJANEK, 2006). Porém, a importância econômica da atividade para o país tem permitido a utilização de novas tecnologias, o que tende a diminuir gastos com mão-de-obra. Por outro lado, o uso de fertilizantes e defensivos exige um trabalho mais qualificado, gerando um aumento na produtividade (AMARO; VICENTE; BAPTISTELLA, 2001), o qual, juntamente com o aumento da qualidade dos pomares cítricos é obtido por meio da produção de mudas com o uso da enxertia em viveiros comerciais (CASTRO; KERSTEN, 1996). Cerca de 85% das plantas cítricas estão enxertadas sobre limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) (POMPEU JÚNIOR, 2005). Mas atualmente existe uma diversificação de porta-enxertos, e sua escolha deve recair sobre aquele que apresente maior resistência ou tolerância às doenças do local do plantio (CARLOS, STUCCHI; DONADIO, 1997; POMPEU JÚNIOR, 2001).

Outra possibilidade de melhorar a produtividade ou a qualidade de pomares cítricos seria o uso de bactérias endofíticas como promotoras de crescimento vegetal.

Essa prática poderia ser empregada na fase de produção do porta-enxerto, visando acelerar o crescimento e reduzir o período que a muda passa em viveiro. Devido à importante associação com citros (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004) e seu potencial benéfico sobre diversas culturas, *Methylobacterium* spp. poderiam ser empregadas para esse fim com chances de obtenção de resultados promissores.

Assim, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a possibilidade de *Methylobacterium* spp. atuarem como promotoras de crescimento de plantas cítricas em viveiro de produção comercial, mais especificamente: i) avaliar o efeito de *Methylobacterium* spp. sobre a germinação de sementes de limão-cravo e tangerina sunki; ii) avaliar o efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento de mudas de limão-cravo e tangerina sunki.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Linhagens bacterianas e material vegetal

As linhagens bacterianas utilizadas no presente trabalho pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, ESALQ/USP (Tabela 2.1). Para todos os experimentos, as bactérias foram crescidas em meio CHOI3 a 28°C (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998).

As sementes de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e tangerina sunki (*Citrus sunki*) foram gentilmente cedidas pelo Engenheiro Agrônomo Vítor José Betim Cicolin, proprietário do Viveiro de Mudanças Hortícolas (Cordeirópolis - SP). As sementes recebidas para os experimentos foram previamente tratadas para a retirada da casca, conforme é rotineiramente realizado no viveiro de produção de mudas cítricas.

Tabela 2.1 – Linhagens de *Methylobacterium* spp.

Espécies	Linhagens	Planta hospedeira	Referência
<i>M. extorquens</i>	AR1.6/2, AR1.6/11	<i>Citrus sinensis</i>	Araújo et al. (2002)
<i>M. mesophilicum</i>	AR5/1, ER1/21 SR1.6/6, SR1.6/13	<i>Citrus sinensis</i>	Araújo et al. (2002)
<i>M. radiotolerans</i>	SR1.6/4	<i>Citrus sinensis</i>	Araújo et al. (2002)
<i>M. mesophilicum</i>	PR1/3	<i>Citrus reticulata</i>	Araújo et al. (2002)
<i>M. zatmanii</i>	PR3/8	<i>Citrus reticulata</i>	Araújo et al. (2002)
<i>M. hispanicum</i>	TP4/2	<i>Capsicum annuum</i> L.	Antônio Sérgio Ferreira Filho*
<i>M. fujisawaense</i>	D5	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Joelma Marcon*

* Gentilmente cederam as linhagens bacterianas para o presente estudo

2.2.1.2 Testes de promoção de crescimento de limão-cravo e tangerina sunki por *Methylobacterium* spp.

Foram desenvolvidos três experimentos para selecionar bactérias do gênero *Methylobacterium* como promotoras de crescimento de plantas cítricas. Todos os testes foram realizados sob condições comerciais no Viveiro de Mudas Horticitrus, município de Cordeirópolis – SP.

2.2.1.2.1 Experimento 1

Para esse teste de promoção de crescimento foram utilizadas sementes de limão-cravo. O delineamento usado foi inteiramente casualizado, constituído por 11 tratamentos: sementes tratadas com *Methylobacterium* spp. (9 linhagens de citros, uma linhagem de cana-de-açúcar, e uma linhagem de pimentão - Tabela 2.1); além de dois controles (sementes tratadas com meio de cultura CHOI3 e uma testemunha), com 4 repetições por tratamento.

As sementes de limão-cravo foram tratadas por imersão em cada uma das culturas bacterianas previamente preparadas (10^8 UFC/mL) e também apenas em meio de cultura CHOI3, permanecendo sob constante agitação a 28°C por 5 horas (MADHAIYAN et al., 2005; LEE et al., 2006). Após embebição, o excesso de meio de

cultura foi eliminado e as sementes foram semeadas em tubetes contendo como substrato fibra de côco do tipo granulado (Golden Mix 11, Amafibra). A semeadura foi realizada no período de verão (janeiro). Durante todo o experimento a cultura recebeu tratos rotineiros de produção de mudas cítricas em viveiro comercial (Figura 2.1).

Um mês após a semeadura foi avaliada a taxa de germinação das sementes. Aos dois, três e quatro meses de desenvolvimento das mudas, a altura e o diâmetro do caule foram mensurados. Para isso foi feita uma amostragem aleatória de 10 plantas por parcela experimental (40 plantas por tratamento), totalizando 520 plantas avaliadas. Ao final da produção do porta-enxerto (4 meses), o peso fresco e o peso seco das 40 plantas de cada tratamento foram avaliados. Para medida do peso fresco, as plantas foram lavadas para a retirada do substrato das raízes e, posteriormente, foram separadas em parte aérea e raízes. Para avaliação do peso seco, as mudas foram mantidas em estufa a 60°C até a estabilização do peso e, então, novamente pesadas.

A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% com o auxílio do *software* ESTAT (Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0), desenvolvido no Departamento de Ciências Exatas, FCAV, UNESP, Jaboticabal por Barbosa et al. (1992). As análises de variância seguiram um esquema fatorial 2 x 2.

Figura 2.1 – Passos para a produção de porta-enxertos de citros em viveiro comercial. Preparo do substrato (A, B); Semeadura em tubetes (C); Desenvolvimento das mudas (D, E, F)

2.2.1.2.2 Experimento 2

Para esse teste foram utilizadas sementes de tangerina sunki. O experimento foi conduzido sob as mesmas condições usadas no teste de promoção de crescimento com o limão-cravo. O número de repetições, parâmetros, e tempos avaliados, assim como as análises estatísticas também foram iguais. No entanto, nesse experimento foram avaliadas 240 plantas e utilizadas apenas 4 linhagens de *Methylobacterium*, previamente selecionadas no experimento anterior. Assim, o experimento foi constituído por 3 linhagens de citros (AR1.6/2; AR1.6/11; SR 1.6/6) e uma linhagem de pimentão (TP4/2); além de dois controles (sementes tratadas com meio de cultura CHOI3 e uma testemunha). A semeadura foi realizada no período de verão (novembro) e a cultura recebeu tratos rotineiros de produção de mudas cítricas em viveiro comercial.

2.2.1.2.3 Experimento 3

O terceiro experimento para avaliar o potencial de *Methylobacterium* spp. como promotoras de crescimento de mudas cítricas foi realizado por inoculação das bactérias diretamente no substrato, um mês após a germinação das sementes – estágio de plântula. Mas, anteriormente a realização do teste em viveiro comercial, foi realizado um ensaio para avaliar o estabelecimento de linhagens no substrato.

2.2.1.2.3.1 Teste de estabelecimento de *Methylobacterium* spp. no substrato

Foram utilizadas nesse ensaio as linhagens *M. extorquens* AR1.6/2, *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *M. radiotolerans* PR1/3. O substrato utilizado (terra vegetal) foi esterilizado em autoclave (3 vezes de 30 minutos/autoclavagem) e distribuído em vasos. As bactérias, previamente cultivadas em CHOI3 (28°C, 180 rpm, 72 horas), foram inoculadas em uma concentração final de 10^6 UFC/g de substrato. Após os inóculos, o substrato foi homogeneizado para melhor distribuição das bactérias.

O delineamento utilizado foi blocos casualizados, constituído por 4 tratamentos: linhagens bacterianas inoculadas em parcelas experimentais distintas; linhagens

bacterianas inoculadas na mesma parcela experimental; um controle. O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Genética, ESALQ/USP.

As avaliações foram feitas por meio de reisolamento das bactérias nos tempos zero, após 30 e 60 dias dos inóculos. Para isso, 1g de substrato foi coletado dos vasos e transferido para erlenmeyers contendo pérolas de vidro e tampão PBS (10 mM; Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 3 mM KCl; 140 mM NaCl; pH 7.4), permanecendo sob agitação (150 rpm; 28°C) durante uma hora. Posteriormente, foram feitas diluições apropriadas e a semeadura das suspensões em meio TSB 10% suplementado com benomil (50 µg/mL). As culturas foram incubadas em BOD a 28°C por 15 dias.

Para confirmar se as linhagens reisoladas eram as mesmas inoculadas no início do experimento, uma amostragem das colônias teve o perfil avaliado por ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado).

2.2.1.2.3.2 Amplificação do gene 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada por meio de PCR direto das colônias de *Methylobacterium* reisoladas do substrato. Com uma agulha de platina, cada colônia foi coletada e transferida para microtubos contendo 80 µL de água destilada esterilizada. Em seguida, as colônias foram lisadas por incubação a 90°C por 15 minutos. Dois microlitros dessa suspensão bacteriana foram utilizados como DNA molde em reações de PCR contendo os primers PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e 1387R (5' - CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG - 3') (HEUER et al., 1997). Esta reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada primer, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen), 1x tampão da Taq Polimerase e 2 µL da suspensão bacteriana. Para todas as amplificações foi utilizado um controle negativo (reação de PCR sem suspensão bacteriana). As reações de PCR foram realizadas em termociclador (PTC 200, MJ Research – USA) programado para uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 62,5°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. A amplificação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb foi confirmada por

eletroforese em gel de agarose 1,2%. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (1 mg/mL) e observado sobre luz ultravioleta.

2.2.1.2.3.3 Análise de Restrição do gene 16s rRNA (ARDRA)

A análise de restrição do gene 16S rRNA foi realizada pela clivagem de 1 µg do produto de PCR com 2 U da enzima de restrição *Mbol* (Invitrogen) por 1 hora a 37°C, de acordo com as recomendações do fabricante. A avaliação dos perfis de restrição foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2,4% (p/v), corado com brometo de etídio e observado sobre luz ultravioleta. A frequência de cada ribotipo obtido foi extrapolada para a contagem de colônias em placa e, assim, foi estimado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) reisoladas. O número UFC de *Methylobacterium* foi normalizado por meio da transformação em Log (UFC+0,5).

2.2.1.2.3.4 Teste de promoção de crescimento de tangerina sunki por *Methylobacterium* spp. via inoculação no substrato

Foram utilizadas as linhagens AR1.6/2; AR1.6/11; SR1.6/6 e TP4/2 de *Methylobacterium* (Tabela 2.1). Com o auxílio de uma micropipeta as bactérias (10^8 UFC/mL) foram inoculadas diretamente no substrato (1 mL por tubete) 30 dias após a germinação das sementes. Também foi feito um controle com o meio de cultura CHOI3. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, totalizando 200 plantas avaliadas. Os parâmetros e tempos avaliados, assim como as análises estatísticas realizadas foram os mesmos usados nos experimentos 1 e 2. O experimento foi realizado no verão (novembro) e a cultura recebeu tratos rotineiros da produção de mudas cítricas em viveiro comercial.

2.2.1.3 Reisolamento de *Methylobacterium* spp. das mudas cítricas e análise por ARDRA

Dez plantas de cada tratamento (2 plantas por parcela experimental) foram separadas em raiz e parte aérea, que foram pesados e, então, passaram por um

processo de desinfecção superficial (1 minuto em etanol 70%, 3 minutos em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% de cloro ativo (v/v), 30 segundos em etanol 70%, 2 lavagens de 1 minuto em água destilada esterilizada). Em seguida, os tecidos vegetais foram cortados de forma asséptica em pequenos fragmentos e triturados em volumes apropriados de tampão PBS (10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 3 mM KCl; 140 mM NaCl; pH 7.4). Diluições das suspensões foram semeadas sobre meio CHOI3, suplementado com benomil (50 µg/mL) para inibir o crescimento de fungos, e incubadas a 28°C por 15 dias para avaliação do crescimento bacteriano.

A análise das colônias de *Methylobacterium* reisoladas foi realizada por meio da restrição do gene 16S rRNA pela clivagem de 1 µg do produto de PCR com 2 U da enzima de restrição *AluI* (Invitrogen) por 1 hora a 37°C, de acordo com as recomendações do fabricante. A avaliação dos perfis de restrição foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2,4% (p/v), corado com brometo de etídio e observado sobre luz ultravioleta. Os primers utilizados, assim como a reação de amplificação de um fragmento de cerca de 1400 pb do gene 16S rRNA foram os mesmo descritos no item 2.2.1.2.3.2.

2.2.1.4 Mecanismos envolvidos na produção de crescimento vegetal

2.2.1.4.1 Produção de AIA (Ácido-Indol-Acético)

Para a quantificação da produção de AIA, as bactérias foram crescidas em meio TSB 10% contendo L-triptofano (5 mM) e incubadas no escuro, a 28°C por 72 horas. Após este período, as culturas foram centrifugadas (5 minutos; 12.000 rpm) e 900 µl do sobrenadante foram coletados e transferidos para cubetas contendo 400 µl do reagente de Salkowski (BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE, 1991). Após 30 minutos à temperatura ambiente no escuro, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000) a 530 nm de absorbância. As leituras foram normalizadas por meio de curva padrão com diferentes concentrações de AIA. A análise de produção de AIA (µg/mL) foi realizada em triplicatas para cada linhagem bacteriana.

2.2.1.4.2 Solubilização de fosfato inorgânico

O teste de solubilização de fosfato inorgânico foi realizado de acordo com o descrito por Verma; Ladha e Tripathi (2001). As bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura enriquecido com fosfato inorgânico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), e então, mantidas em BOD a 28°C por 7 dias. A presença de um halo em torno das colônias indicou a capacidade da bactéria solubilizar fosfato. As análises foram realizadas em triplicatas.

2.2.1.4.3 Fixação de nitrogênio

A capacidade das linhagens realizarem a fixação de nitrogênio foi avaliada qualitativamente *in vitro*. Para isso, foram utilizados tubos de ensaio de 20 x 70 mm, contendo 10 mL de meio NFB semi-sólido (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995), onde as linhagens foram inoculadas com uma alça de platina e mantidas por 15 dias a 28°C no escuro. A formação de uma película (halo) de crescimento próximo a superfície dos tubos indicou a capacidade de fixar nitrogênio. As análises foram realizadas em triplicatas.

2.2.1.5 Isolamento de bactérias endofíticas de sementes de limão-cravo e tangerina sunki

Sementes de limão-cravo foram homogeneizadas e separadas ao acaso em 5 amostras (100 sementes por amostragem). O isolamento das bactérias endofíticas foi realizado após a assepsia superficial das sementes (1 minuto em água destilada esterilizada, 1 minuto em etanol 70%, 3 minutos em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% de cloro ativo (v/v), 30 segundos em etanol 70%, e duas lavagens de 1 minuto em água destilada esterilizada). Após desinfecção superficial, cada amostra de sementes foi triturada em tampão PBS (10 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4 ; 3 mM KCl ; 140 mM NaCl ; pH 7.4) em volumes apropriados. Cem microlitros de diluições apropriadas da suspensão obtida foram semeados sobre meio TSB 10% suplementado com benomil (50 $\mu\text{g/mL}$) e as placas incubadas a 28°C por 20 dias. Para confirmar a eficiência do

processo de desinfecção, alíquotas da água destilada da última lavagem foram semeadas em meio TSB 10% e a incubação seguiu as mesmas condições anteriormente mencionadas. O mesmo procedimento foi realizado para o isolamento das bactérias endofíticas de sementes de tangerina sunki.

2.2.1.5.1 Identificação de colônias reisoladas

A identificação das bactérias reisoladas das sementes de limão-cravo e tangerina sunki foi realizada por meio da análise da sequência do gene 16S rRNA. Para isso, um fragmento deste gene (1400 pb) foi amplificado diretamente das colônias crescidas sobre o meio TSB 10%. Os primers utilizados e a reação de amplificação do gene 16S rRNA foram os mesmo descritos no item 2.2.1.2.3.2.

Os produtos de PCR gerados foram purificados com Kit (UltraClean® 15 DNA Purification Kit – *MoBio*) conforme recomendações do fabricante. O serviço de sequenciamento foi realizado no Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. As sequências obtidas foram comparadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information Website*).

2.3 Resultados e Discussão

As bactérias do gênero *Methylobacterium* são cosmopolistas, podendo ser encontradas nos mais diversos ambientes incluindo o solo, ar, poeira, ambientes aquáticos, sedimentos e ambientes urbanos (VAN AKEN et al., 2004). Além disso, essas bactérias são frequentemente encontradas colonizando diversas espécies vegetais de importância econômica (ARAÚJO et al., 2002; FERREIRA et al., 2008; MADHAIYAN et al., 2007; MADHAIYAN et al., 2009a,b; SENTHILKUMAR et al., 2009; SY et al., 2001), promovendo o crescimento vegetal e/ou controlando fitopatógenos (MADHAIYAN et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2006; OMER; TOMBOLINI; GERHARDSON, 2004a), o que as torna potencialmente interessantes para aplicação na agricultura. Dessa forma, o presente trabalho avaliou, pela primeira vez, a

capacidade de *Methylobacterium* spp. em promoverem a germinação de sementes e o crescimento de plantas cítricas em viveiro comercial de produção de mudas. Todos os trabalhos de interação *Methylobacterium*-planta descritos até o momento foram realizados *in vitro* ou em casa de vegetação. O fato deste estudo ter sido conduzido sob condições comerciais torna seus resultados de suma importância, visto que reflete as condições de produção comercial de mudas.

2.3.1 Testes de promoção de crescimento de limão-cravo e tangerina sunki por *Methylobacterium* spp.

2.3.1.1 Efeitos da inoculação de *Methylobacterium* spp. sobre a germinação de sementes

Os efeitos positivos de *Methylobacterium* spp. sobre a germinação de sementes são bem documentados para diversas culturas (HOLLAND; POLACCO, 1994; HOLLAND 1997a,b; LEE et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2005; MADHAIYAN et al., 2006). Para determinar se essas bactérias poderiam estimular a germinação de sementes de citros, foram testadas 11 linhagens em limão-cravo (Tabela 2.1). Tendo em vista os efeitos dessas linhagens sobre o crescimento das mudas de limão-cravo, 4 linhagens (AR1.6/11, AR1.6/2, SR1.6/6, TP4/2) foram selecionadas para avaliação dos efeitos sobre tangerina sunki.

Não foi observado nenhum efeito positivo significativo sobre a germinação das sementes de limão-cravo por essas bactérias. Porém, foi observada uma significativa redução da taxa de germinação (47,85% em relação à testemunha) das sementes bacterizadas com a linhagem *M. extorquens* AR1.6/2 (Figura 2.2 A), sugerindo que esta bactéria pode ter um efeito deletério sobre a planta hospedeira, ou pelo menos sobre a germinação de suas sementes. Quando o efeito de *Methylobacterium* spp. foi testado sobre a germinação das sementes de tangerina sunki, foi verificado um aumento significativo da taxa de germinação das sementes para todos os tratamentos (em média 12,6% sobre a testemunha). Mas, esse incremento foi observado tanto para as sementes bacterizadas, quanto para as sementes tratadas apenas com CHOI3 (Figura 2.2 B), mostrando que o efeito pode ter ocorrido por causa do meio de cultura.

Figura 2.2 - Efeito de *Methylobacterium* spp. na germinação de sementes de limão-cravo (A) e tangerina sunki (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Os resultados mostram uma diferença de comportamento da linhagem *M. extorquens* AR1.6/2 sobre a germinação das sementes dos dois porta-enxertos. De fato, alguns estudos mostram que o processo de bacterização de sementes e de outros tecidos vegetais pode gerar efeitos positivos, negativos ou nulos sobre a germinação e/ou sobre o desenvolvimento da planta (ABANDA-NKPWATT et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2005; SANTOS et al., 2005). A especificidade da interação bactéria-planta pode ser considerada um ponto importante na geração desses efeitos (KHAKID et al., 2004; PROBANZA 1996; ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). Em estudos realizados por Madhaiyan et al. (2006), os autores verificaram que *Methylobacterium* sp., isolado de amendoim, aumentou em 19,5 % a taxa de

germinação nessa mesma espécie quando comparado aos controles. Mas essa questão é um tanto complexa, pois, em alguns casos, isolados de uma determinada espécie vegetal podem desenvolver melhor interação e promoverem melhores resultados em outra espécie vegetal que não seja a sua de origem, ou ainda podem não gerar efeito algum. Dessa forma, Abanda-Nkpwatt et al. (2006) relataram que *M. extorquens* ME4, isolado de morango, promoveu a germinação de sementes de diferentes espécies vegetais; entretanto, essa linhagem não apresentou especificidade por morango, não gerando efeitos sobre a germinação nessa espécie. No presente estudo, embora a maioria das linhagens utilizadas nos testes com o limão-cravo fosse originária de citros, também não foram observados efeitos positivos significativos sobre a germinação. Poderia ainda ser sugerido que o efeito negativo de AR1.6/2 sobre a germinação de limão-cravo, mas não sobre tangerina sunki, possa estar atribuído à especificidade da interação entre essa linhagem e a variedade de porta enxerto utilizado. Araújo (2000) também observou que esta linhagem AR1.6/2 tem um efeito negativo na germinação e emissão de raízes em *Citrus limonia*, confirmando que este isolado pode apresentar uma interação negativa com o hospedeiro. Resultados semelhantes já foram obtidos em outros estudos. Probanza (1996) verificou o efeito prejudicial de isolados de *Pseudomonas fluorescens*, obtidos de rizosfera de amieiro, sobre esse mesmo hospedeiro.

Com relação à tangerina sunki, não é possível afirmar que os “efeitos benéficos” verificados foram causados pelas bactérias endofíticas inoculadas. Nesse caso, novos testes devem ser realizados, e para uma maior confiabilidade dos resultados seria necessário retirar o efeito do meio de cultura sobre a germinação das sementes.

2.3.1.2 Efeitos de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento das mudas cítricas

A eficácia de *Methylobacterium* spp. em promoverem o crescimento de plântulas de citros foi determinada, sob condições comerciais, por meio da avaliação das variáveis altura e diâmetro do caule, peso fresco e seco das raízes e da parte aérea das plantas. Além do comportamento dessas bactérias ter sido testado sobre duas variedades de porta-enxertos, também foram avaliadas duas metodologias de inoculação.

2.3.1.2.1 Experimentos 1 e 2: promoção de crescimento de limão-cravo e tangerina sunki via bacterização de sementes

Com relação às mudas de limão-cravo, foi observado, ao longo do tempo, uma diferenciação entre as linhagens (Figura 2.3). Ao final da produção do porta-enxerto (4 meses), foi verificado um aumento significativo da parte aérea das mudas por *M. extorquens* AR1.6/11 (endófito de citros) (Figura 2.3 C; Figura 2.4). As mudas que receberam esse tratamento tiveram um ganho de aproximadamente 3 cm em altura quando comparadas à testemunha. Nenhum efeito foi observado sobre o diâmetro do caule para todos os tratamentos.

É importante ressaltar que, embora *M. extorquens* AR1.6/2 tenha exercido um efeito negativo sobre a germinação das sementes de limão-cravo, essa linhagem não prejudicou o desenvolvimento das mudas (Figura 2.3).

A linhagem *M. hispanicum* TP4/2 (endófito de pimentão), mesmo não diferindo estatisticamente da testemunha, exerceu um efeito negativo sobre o porta-enxerto, traduzido pela redução da altura das mudas. Esse efeito foi evidente quando observado no viveiro (Figura 2.3 C; Figura 2.4).

Figura 2.3 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento da parte aérea das mudas de limão-cravo aos 2 meses (A), 3 meses (B) e 4 meses (C) de desenvolvimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Figura 2.4 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre a parte aérea de mudas de limão-cravo aos 4 meses de desenvolvimento. A) plantas tratadas com AR1.6/11; B) plantas tratadas com TP4/2; C) comparação dos efeitos gerados nas mudas tratadas com AR1.6/11 e TP4/2 em viveiro comercial

A promoção de crescimento das mudas de limão-cravo também foi observada pelo aumento do peso fresco das raízes pelas linhagens SR1.6/6 e AR1.6/11 (Figura 2.5 A), mas somente a linhagem SR1.6/6 induziu um aumento no peso seco das raízes das plântulas avaliadas (Figura 2.5 B), sugerindo que as linhagens SR1.6/6 e AR1.6/11 podem induzir um acúmulo de água, enquanto que a linhagem SR1.6/6 também induz de forma significativa um acúmulo de biomassa.

A **B**

Figura 2.5 – Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento das mudas de limão-cravo aos 4 meses de desenvolvimento. A) Aumento do peso fresco das raízes das mudas tratadas com SR1.6/6 e AR1.6/11; B) Aumento do peso seco das raízes das mudas tratadas com SR1.6/6. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Para avaliação do efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento de tangerina sunki foram usadas quatro linhagens previamente selecionadas no experimento anterior: AR1.6/11 e SR1.6/6 por promoverem crescimento das mudas de limão-cravo (altura e/ou biomassa); TP 4/2 por ter inibido o crescimento (altura das plantas); e AR1.6/2, que embora tenha reduzido a germinação, não apresentou efeito significativo sobre o desenvolvimento das plântulas. Também foi observado neste

experimento que ao longo do tempo houve uma diferenciação entre as linhagens de *Methylobacterium* spp. Porém, esse efeito foi mais rápido do que o observado em limão-cravo (Figura 2.6), e já pôde ser verificado a partir do terceiro mês de desenvolvimento, quando a linhagem AR1.6/11 já apresentou efeitos positivos sobre crescimento das mudas (Figura 2.6 B). Ao final da produção do porta-enxerto, foi observado que o aumento significativo em altura das mudas foi estimulado não apenas pela linhagem AR1.6/11, como em limão-cravo, mas também pelas linhagens AR1.6/2 e SR1.6/6 (Figura 2.6 C). Mas as três linhagens se igualaram e, em média, esse aumento em altura foi em torno de 1,5 cm em relação aos controles. Foi observado que embora a linhagem AR1.6/11 tenha promovido crescimento nos dois porta-enxertos, apresentou um maior desempenho em limão-cravo (3 cm). Em relação ao diâmetro do caule, nenhum efeito foi observado após inoculação de *Methylobacterium* spp.

Ao contrário do observado em limão-cravo, a linhagem TP4/2 não reduziu o desenvolvimento das plântulas de tangerina sunki. Esta linhagem chegou a apresentar uma tendência à promoção de crescimento das mudas no terceiro mês (Figura 2.6 B), mas esse efeito não se manteve até o final da produção, quando a altura das mudas que receberam esse tratamento permaneceu estatisticamente igual à altura dos controles (Figura 2.6 C).

Figura 2.6 – Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento da parte aérea das mudas de tangerina sunki aos 2 meses (A), 3 meses (B) e 4 meses (C) de desenvolvimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Os efeitos benéficos das linhagens AR1.6/2 e SR1.6/6 não só se refletiram sobre a altura das mudas, mas também no aumento do peso fresco da parte aérea das mudas de tangerina sunki (Figura 2.7).

Figura 2.7 – Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento das mudas de tangerina sunki aos 4 meses de desenvolvimento. Observa-se o aumento do peso fresco da parte aérea estimulado por SR1.6/6 e AR1.6/2. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

O que se observa, numa análise geral dos resultados apresentados, é que as linhagens de *Methylobacterium* originalmente isoladas de citros foram aquelas que tiveram um efeito positivo significativo sobre a altura e a biomassa das mudas cítricas. Resultados semelhantes a esses já foram observados em outros estudos de promoção de crescimento. Freitas e Aguilar-Vildoso (2004) avaliaram o efeito de isolados de *Pseudomonas*, *Bacillus* e outras rizobactérias de citros sobre o crescimento de porta-enxertos, e verificaram o efeito benéfico sobre o peso seco das raízes e parte aérea das mudas por essas bactérias. Da mesma forma, Madhaiyan et al. (2005) utilizaram *Methylobacterium* spp. isoladas de cana-de-açúcar, e observaram após reinoculação, efeitos benéficos dessas bactérias sobre a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas. Lee et al. (2006) também mostraram os efeitos positivos de *Methylobacterium* sp. CBMB20 isolado de arroz sobre o crescimento dessa planta. Isso sugere a especificidade da interação bactéria-planta, como relatada por alguns autores, os quais enfatizam a necessidade da utilização de isolados residentes ou adaptados ao hospedeiro, justificando a maior capacidade de colonização e menor risco na introdução de organismos exógenos (ENEBAK; WEI; KLOEPPER 1998; KHALID; ARSHAD; ZAHIR, 2004).

Foi interessante observar que, nesse trabalho, mesmo entre as linhagens isoladas do mesmo nicho existiram diferenças sobre a promoção de crescimento das mudas, como verificado para AR1.6/2. Esta linhagem não promoveu crescimento das mudas de limão-cravo, mas apresentou efeitos positivos sobre o crescimento de tangerina sunki, reforçando ainda mais a importância da especificidade da interação bactéria-hospedeiro.

No entanto, alguns autores sugerem que isolados originais de um hospedeiro podem facilmente colonizar outros hospedeiros de espécies diferentes, até mesmo com maior intensidade. Assim, Quadts-Hallmann e Kloepper (1996) relataram que quando a bactéria endofítica *Enterobacter asburiae* JM22, isolado de algodão, foi inoculada em feijão e pepino, foram detectadas maiores populações do que em seu hospedeiro original. Madhaiyan et al. (2007) demonstraram que *Methylobacterium* sp. CBMB20 de arroz promoveu crescimento de plantas de tomate. Quecine (2010) demonstrou que *Pantoea agglomerans* 33.1 é capaz de promover o crescimento não apenas de eucalipto, seu hospedeiro de origem, mas também de cana-de-açúcar. Essa capacidade de um isolado promover crescimento em outra cultura não foi observada no presente trabalho, nas condições avaliadas. As linhagens originais de cana-de-açúcar (D5) e de pimentão (TP4/2) não promoveram crescimento de mudas de limão-cravo; ao contrário, a linhagem TP4/2 exerceu um efeito negativo sobre este porta-enxerto, e teve um efeito neutro sobre o crescimento de tangerina sunki ao final da produção. Para esses casos mantêm-se a importância da especificidade da interação bactéria-planta e, em especial para TP4/2, vale lembrar o risco da introdução de organismos exógenos em um nicho diferente do seu original. Daí a importância de se fazer uma seleção dos microrganismos para empregá-los de forma segura em um programa de melhoramento vegetal, tendo o cuidado de não extrapolar os resultados para outros hospedeiros.

2.3.1.2.2 Experimento 3: promoção de crescimento de tangerina sunki via inoculação de *Methylobacterium* spp. no substrato

2.3.1.2.2.1 Estabelecimento de *Methylobacterium* spp. no substrato

O estabelecimento das bactérias na rizosfera é fundamental para que o microrganismo possa interagir com a planta. Para o sucesso da interação é necessário

que a bactéria colonize a raiz e não perca a capacidade de sobreviver e de se multiplicar de maneira competitiva em relação à comunidade nativa (SOTTERO et al., 2006).

Para plantas que passam por uma fase em viveiro de mudas, em substrato com possibilidade de manipulação, como é o caso de citros, a inoculação de linhagens bacterianas benéficas no substrato poderia trazer resultados positivos sobre o desenvolvimento das mesmas, visto que essas bactérias poderiam se desenvolver com vantagem, pois enfrentariam menor número de competidores. A menor competição seria resultado da desinfecção do substrato, que é normalmente feita pelos produtores de mudas (BORGES et al., 2000).

Neste contexto, o estabelecimento e o comportamento competitivo de três linhagens de *Methylobacterium* (AR1.6/2; SR1.6/6; PR1/3) foram inicialmente avaliados em substrato, em casa de vegetação. Para que o teste se aproximasse ao máximo dos procedimentos realizados nos viveiros de produção de citros, o substrato utilizado também foi esterilizado. Os resultados obtidos serviram para dar subsídios para a posterior instalação de um teste de promoção de crescimento com tangerina sunki em viveiro comercial.

Por meio da análise de ARDRA (Figura 2.8) foi possível verificar a recuperação das linhagens inoculadas no substrato e calcular a frequência de cada ribotipo dentro do total encontrado. Foi observado que a frequência de ribotipos de *Methylobacterium* foi maior do que a de outros ribotipos encontrados, sugerindo uma vantagem competitiva dessas linhagens sobre as demais bactérias presentes no substrato. Também foi observado que as 3 linhagens de *Methylobacterium* apresentaram comportamento diferente no substrato (Figura 2.9).

Figura 2.8 - Perfil dos ribotipos obtidos pela digestão do gene 16S rRNA com a enzima de restrição *Mbol*. M = Marcador de peso molecular 100 pb; 1 = perfil de restrição do gene 16S rRNA da linhagem AR1.6/2; 2 = perfil de restrição do gene 16S rRNA da linhagem SR1.6/6; 3 = perfil de restrição do gene 16S rRNA da linhagem PR 1/3

A contagem de UFC em placas de cultivo associada às análises de ARDRA permitiram a determinação do número de UFC de cada ribotipo nas amostras avaliadas.

Foi observado que a densidade bacteriana não foi alterada durante o experimento, mas a sua diversidade foi diferente entre os períodos de avaliação. A população da linhagem PR1/3 foi desfavorecida com o tempo, reduzindo-se à metade, tanto quando inoculada sozinha no substrato, quanto em competição com as outras linhagens de *Methylobacterium*. Já as populações das linhagens AR1.6/2 e SR1.6/6, tanto inoculadas sozinhas ou com outros isolados, aumentaram durante o período avaliado. Entretanto, foi observado que a população da linhagem SR1.6/6 foi aproximadamente 4 vezes maior que a da linhagem AR1.6/2 (Figura 2.9). Dessa forma, é possível sugerir que a linhagem SR1.6/6 deve se estabelecer melhor no substrato e por conseguinte colonizar de forma mais intensa os tecidos da planta hospedeira, onde poderia promover o crescimento vegetal.

A **B**

Figura 2.9 - Densidade bacteriana presente no substrato ao longo do tempo. A) População bacteriana no tempo zero; B) População bacteriana após 30 dias do inóculo de *Methylobacterium* spp. Os dados foram transformados para Log (UFC+0,5). As barras maciças em azul representam as linhagens de *Methylobacterium* inoculadas individualmente no substrato; as partes maciças em preto, contidas nas barras azuis, representam outros ribotipos encontrados no substrato; as barras estilizadas representam as linhagens em competição (comp) ou outros ribotipos presentes no substrato

Foi observado que 60 dias após o inoculo as linhagens de *Methylobacterium* ainda se encontravam em alta densidade no substrato, embora o número de outras bactérias presentes tenha aumentado de forma significativa. Os resultados apresentados mostram que *Methylobacterium* spp. foram competitivas e capazes de se estabelecerem no substrato de forma mais eficiente do que as demais bactérias residentes nesse ambiente dentro do período avaliado. Pensando em numa aplicação prática que vise a promoção de crescimento vegetal, esses resultados foram muito importantes e abriram boas perspectivas para a utilização de *Methylobacterium* para este fim em citros.

2.3.1.2.2.2 Promoção de crescimento de tangerina sunki via inoculação no substrato

O experimento de promoção de crescimento de tangerina sunki por *Methylobacterium* spp., foi também realizado via inoculação no substrato. Foram utilizadas as linhagens AR1.6/11, AR1.6/2, SR1.6/6 e TP4/2, as quais apresentaram efeito diferente sobre a planta hospedeira (Figura 2.10). No experimento anterior com tangerina sunki, as mudas tratadas com a linhagem AR1.6/11 já apresentaram uma resposta mais rápida do que em limão-cravo a partir do terceiro mês de desenvolvimento. Nesse teste, esse efeito não só foi constatado nas mudas tratadas com a linhagem AR1.6/11, mas também naquelas que receberam como tratamentos as linhagens AR1.6/2 e SR1.6/6 (Figura 2.10 B). Ao final da produção, foi verificado que todas as linhagens de citros promoveram crescimento de tangerina sunki, sendo a linhagem AR1.6/2 a de maior potencial nestas condições (Figura 2.10 C). As linhagens AR1.6/11 e SR1.6/6 promoveram em média um aumento de 2,5 cm em altura, enquanto a linhagem AR1.6/2 promoveu um crescimento em média de 3,3 cm. A linhagem de pimentão TP4/2, que promoveu ao final da produção das mudas de limão-cravo um efeito negativo, e de tangerina sunki um efeito neutro, no presente teste por inoculação no substrato, esta linhagem promoveu um efeito positivo sobre as mudas. Embora esse efeito tenha sido menor do que o observado para as mudas tratadas com as linhagens

de citros, TP4/2 promoveu um ganho significativo de 1 cm em altura sobre o porta-enxerto (Figura 2.10 C).

Figura 2.10 - Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento da parte aérea das mudas de tangerina sunki aos 2 meses (A), 3 meses (B) e 4 meses (C) de desenvolvimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

A promoção de crescimento de tangerina sunki também foi observada por meio do aumento do peso fresco da parte aérea das mudas tratadas com a linhagem AR1.6/2 (Figura 2.11 A), e pelo aumento do peso seco da parte aérea induzido pelas linhagens AR1.6/2 e SR1.6/6 (Figura 2.11 B).

A **B**

Figura 2.11 – Efeito de *Methylobacterium* spp. sobre o crescimento das mudas de tangerina sunki aos 4 meses de desenvolvimento. A) Aumento do peso fresco da parte aérea das mudas tratadas com AR1.6/2; B) Aumento do peso seco da parte aérea das mudas tratadas com SR1.6/6 e AR1.6/2. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Considerando as condições dos três experimentos realizados, foi verificado que nos dois primeiros houve uma diferença nos resultados de promoção de crescimento que parece ter variado mais em função da especificidade da interação entre bactéria e porta-enxerto, já que os procedimentos metodológicos utilizados foram os mesmos. Neste terceiro, foi observado que, com a mudança da metodologia de bacterização de sementes para inoculação das bactérias no substrato, as mudas de tangerina sunki não só responderam melhor às linhagens de citros selecionadas, como também à linhagem

de pimentão TP4/2, que promoveu crescimento de um hospedeiro diferente daquele previamente isolado, sendo possível sugerir, para esse caso, a não especificidade da interação, conforme demonstrada em outros estudos (ABANDA-NKPWATT et al., 2006; QUADAT-HALLMANN; KLOEPPER 1996; MADHAIYAN et al., 2007; QUECINE, 2010; SANTOS et al., 2005).

Sabe-se que nas interações mutualística entre bactérias e plantas, isolados do solo respondem aos exudatos liberados pelas raízes, exercendo efeitos benéficos sobre a planta, promovendo o crescimento vegetal por meio da disponibilização de nutrientes e da produção de fitoreguladores (ASGHAR et al., 2002; GLENN; DILWORTH, 1985; RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). Dessa forma, é possível sugerir que a interação entre *Methylobacterium*-planta, e em especial com TP4/2, foi melhorada em função das respostas diretas dessas bactérias aos exudatos vegetais presentes na rizosfera. Além disso, foi observado que as respostas de promoção de crescimento foram mais rápidas do que aquelas obtidas nos testes anteriores, o que estaria de acordo com o proposto em alguns estudos. Segundo Chanway et al. (2000) e Sturz e Noway (2000a), para plantas que passam pela fase de viveiro é aconselhável que a inoculação das bactérias seja feita no substrato de modo que a colonização da rizosfera e o benefício ocorram o mais cedo possível.

Os dados gerados nos ensaios de estabelecimento e competitividade das linhagens de *Methylobacterium* em substrato foram reforçados com os resultados do experimento realizado no viveiro comercial, indicando que algumas linhagens, nas condições estudadas, apresentam vantagem sobre as demais bactérias presentes no substrato e até mesmo sobre os microrganismos nativos do porta-enxerto.

Conforme verificado, esse estudo de promoção de crescimento reforça a idéia de que a interação bactéria-planta é um fenômeno complexo e é alcançado pela atividade simultânea de vários microrganismos (LIFSHITZ et al., 1987), lembrando ainda que além da especificidade bactéria-planta, as condições ambientais e/ou o equilíbrio com outros microrganismos podem ser determinantes para o resultado final (ANDREWS; HARRIS, 2000; AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; MONTESINOS et al., 2002). Exceto pela redução da taxa de germinação causada pela linhagem AR1.6/2 em limão-cravo, e pela redução da altura das mudas por TP4/2 nesse mesmo porta-enxerto,

Methylobacterium spp. não causaram nenhum outro tipo de dano às mudas e o equilíbrio da interação bactéria-planta parece ter sido mantido. Em termos práticos, os dados de promoção de crescimento por *Methylobacterium* spp. obtidos representariam uma antecipação em 6,25% no tempo na produção das mudas. Sabendo-se que o lucro normal da empresa com a produção está em torno de 3 a 6%, os lucros poderiam ter um aumento de 100%, já que os demais gastos são fixos. A economia com o tempo de produção da mudas se refletiria também em menor gasto de água, menor necessidade de adubação e menor custo com mão-de-obra.

Assim, embora preliminares, os resultados gerados nesse estudo são inéditos e muito promissores, e podem ainda ser melhorados por meio de novos testes. Uma proposta futura seria a realização de um consórcio de linhagens selecionadas, e/ou até mesmo manipulá-las geneticamente para além de promoverem crescimento vegetal, realizarem o controle de fitopatógenos em citros. Também, cabe ainda avaliar a melhor forma de veicular *Methylobacterium* como inoculante, a fim de se gerar um produto de baixo custo e ambientalmente seguro.

2.4 Análise de características funcionais envolvidas na promoção de crescimento vegetal

O efeito sobre a promoção de crescimento vegetal é geralmente atribuído à síntese de fitoreguladores tal como a auxina, à fixação de nitrogênio e/ou à solubilização de fosfato. Dentro desse contexto, essas características funcionais foram avaliadas nas linhagens de *Methylobacterium* que promoveram o crescimento dos porta-enxertos de citros.

Todas as linhagens testadas produziram AIA, sendo observado 1,8 µg/mL; 2,1 µg/mL; 2,3µg/mL; e 2,0 µg/mL, para as linhagens AR1.6/11, AR1.6/2, SR1.6/6 e TP4/2, respectivamente. Estudos com *Methylobacterium* sugerem que a promoção de crescimento por essas bactérias seja mediada pela produção de AIA e outros hormônios (LEE et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2005). Embora os valores obtidos sejam mais baixos do que o observado em alguns trabalhos, geralmente as quantidades de AIA produzidas por *Methylobacterium* são pequenas. Lee et al. (2006) relataram uma produção de 3,2 µg/mL de AIA ao testarem um isolado de arroz,

enquanto, Assumpção et al. (2009) observaram uma produção de AIA de 2,9 e 3,9 µg/mL ao avaliarem dois isolados de soja.

A fixação de nitrogênio foi observada através da formação de um halo abaixo da superfície do meio de cultura, que foi interpretado como um resultado positivo da fixação biológica de nitrogênio para as linhagens AR1.6/11, AR1.6/2 e SR1.6/6. A linhagem TP4/2 não apresentou essa atividade *in vitro*. A fixação biológica de nitrogênio parece ser outra atividade funcional que vem sendo cada vez mais relatada para este gênero (LEE et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2009a; SY et al., 2001).

Quanto à capacidade de solubilizar fosfato, embora um pequeno halo tenha sido visualizado ao redor das colônias, o índice de degradação calculado foi zero e, assim, as linhagens avaliadas foram consideradas não solubilizadoras de fosfato na condição *in vitro*. Assumpção et al. (2009) chegaram a caracterizar um isolado de *Methylobacterium* de soja como solubilizador de fosfato, mas essa característica é pouco descrita para o gênero.

Na natureza existem inúmeros fatores bióticos e abióticos envolvidos nas interações bactéria-planta. Assim, é sugerido que a produção de AIA e a fixação biológica de nitrogênio verificadas na condição *in vitro*, sejam os possíveis mecanismos pelos quais as linhagens de *Methylobacterium* promoveram o crescimento de citros.

2.5 Reisolamento de *Methylobacterium* spp. das mudas cítricas e análise por ARDRA

A colonização endofítica dos porta-enxertos de citros por *Methylobacterium* spp. que promoveram crescimento vegetal (AR1.6/11, AR1.6/2, SR1.6/6 e TP4/2), foi verificada ao final da produção das mudas cítricas por meio de reisolamento das bactérias em meio de cultura CHOI3. Exceto pela linhagem AR1.6/11 que só foi reisolada das raízes das mudas de limão-cravo, as demais linhagens foram também reisoladas da parte aérea nesse porta-enxerto. De fato, essa colonização sistêmica por *Methylobacterium* spp. é relatada por alguns autores, os quais ainda sugerem que a capacidade dessas bactérias em colonizar eficientemente toda a planta a partir da semente ou do solo parece ser planta espécie-dependente (OMER; TOMBOLINI;

GERHARDSON, 2004a). A densidade de *Methylobacterium* spp. reisoladas dos porta-enxertos foi de 10^2 UFC/g de tecido vegetal. Rossetto (2008) observou resultados semelhantes em experimentos realizados em casa de vegetação com plantas de cana-de-açúcar inoculadas com as linhagens *M. extorquens* AR1.6/2 e *M. mesophilicum* SR 1.6/6. A autora verificou que essas linhagens colonizaram endofiticamente o colmo das plantas, porém foram reisoladas em uma menor densidade (10^1 UFC/g) com relação à do inóculo inicial (10^7 UFC/mL). Em experimentos realizados em estufas, mesmo com um inóculo inicial denso, como o utilizado também no presente estudo (10^8 UFC/mL), as bactérias inoculadas estão sujeitas a competição com outros microrganismos presentes na planta, no substrato e no ambiente. Assim, pode ser suposto que o reisolamento das linhagens de *Methylobacterium* spp. em uma menor densidade no final da produção dos porta-enxertos esteja associada a esses fatores.

A confirmação de que as bactérias reisoladas em meio de cultura eram as mesmas inoculadas no início dos experimentos ocorreu por meio da obtenção dos perfis de restrição do gene 16S rRNA gerados com a enzima de restrição *AluI* (Figura 2.12).

Figura 2.12 - Perfil dos ribotipos obtidos pela digestão do gene 16S rRNA com a enzima de restrição *AluI*. M = Marcador de peso molecular 1 Kb; 1, 2, 3 e 4 = perfil de restrição do gene 16S rRNA das linhagens TP4/2; AR1.6/2; SR1.6/6; e AR1.6/11, respectivamente, inoculadas no início dos testes de promoção de crescimento vegetal; 1'; 2'; 3' e 4' = perfil de restrição do gene 16S rRNA das linhagens TP4/2; AR1.6/2; SR1.6/6; e AR1.6/11, respectivamente, reisoladas dos porta-enxertos ao final da produção das mudas

Conforme demonstrado por meio de reisolamento em meio de cultura e análise de ARDRA, *Methylobacterium* spp. foram capazes de colonizar endofiticamente as raízes e parte aérea da planta hospedeira após a bacterização de sementes ou a inoculação no substrato.

2.6 Isolamento de bactérias endofíticas de sementes de limão-cravo e tangerina sunki

A função das sementes como fonte de bactérias endofíticas é ainda controversa (HALLMANN et al., 1997). No entanto, a presença desses microrganismos em sementes tem sido relatada em várias espécies vegetais, tais como café (VEGA et al., 2005), eucalipto (FERREIRA et al., 2008), soja (ASSUMPÇÃO et al., 2009), arroz (KAGA et al., 2009), entre outras. Mas poucos são os estudos que trazem informações sobre a presença ou permanência desses microrganismos nas plantas após a germinação das sementes. Recentemente, Ferreira et al. (2008) sugeriram a transferência vertical de bactérias endofíticas em sementes de eucalipto, visto que a comunidade bacteriana de manteve estável nas plantas. O mesmo também foi descrito para arroz (KAGA et al., 2009) e para soja (HOLLAND; POLACCO, 1994).

Quando, neste trabalho, ao final dos experimentos de promoção de crescimento foi realizado o reisolamento de *Methylobacterium* spp. dos porta-enxertos de citros, as bactérias não só foram recuperadas das plantas tratadas, como também foram isoladas das plantas controle. Este último dado já era esperado, uma vez que essas bactérias são relatadas como endófitos de citros (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004). No entanto, não há na literatura dados sobre a presença de *Methylobacterium* em sementes de citros, e assim, faltam informações sobre a origem dessas bactérias nessa espécie vegetal.

O isolamento de bactérias de sementes mostrou que existe uma comunidade bacteriana nas sementes avaliadas. Esta densidade variou de $0,76.10^1$ UFC/g para tangerina sunki e $0,81.10^3$ UFC/g para limão-cravo. Embora essa densidade seja relativamente baixa, os resultados obtidos estão de acordo com aqueles encontrados em outros estudos. McInroy e Kloepper (1995) encontraram uma densidade de

bactérias endofíticas menor que 1.10 UFC/g em grãos de milho. Mano e Morisaki (2008) detectaram bactérias endofíticas em sementes de arroz em uma densidade populacional variando entre 10^2 e 10^6 UFC/g. Ferreira et al. (2008) observaram uma variação entre 0,33 e $1,83.10^2$ UFC/g para bactérias endofíticas isoladas de sementes de duas espécies de eucalipto. No presente trabalho, as bactérias associadas às sementes de citros foram identificadas por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e por comparação das sequências contra o banco de dados do NCBI (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Identificação das bactérias endofíticas isoladas de porta-enxerto de citros, realizada a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e comparação de sequências contra o banco de dados do NCBI

Porta-enxerto	Isolado	Espécie (Blast-NCBI)	Similaridade (%)	Linhagem Referência
Limão-cravo				
	LC1	<i>Bacillus</i> sp.	99%	NZAAOX01000008.1
	LC2	<i>Bacillus pumilus</i>	100%	NZABRX01000003.1
	LC3	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	ABQN01000006.1
	LC4	<i>Brevibacillus brevis</i>	97%	NC012491.1
	LC5	<i>Paenibacillus</i> sp.	96%	NC012914.1
	LC6	<i>Sphingomonas</i> sp.	95%	NZAAQG01000006.1
	LC7	<i>Streptomyces coelicolor</i>	99%	NC003888.3
	LC8	<i>Mycobacterium</i> sp.	99%	NC009077.1
	LC9	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	96%	NC010407.1
Tangerina				
Sunki				
	TS1	<i>Bacillus</i> sp.	98%	NZAAOX01000008.1
	TS2	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	ABQN01000001.1
	TS3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	NC_009725.1
	TS4	<i>Paenibacillus</i> sp.	97%	NC012914.1

Os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces* e *Clavibacter* já foram descritos como endófitos de sementes de outras espécies vegetais em outros estudos (ASSUMPÇÃO et al., 2009; FERREIRA et al., 2008; MANO; MORISAKI, 2008; VEGA et al., 2005), enquanto que o gênero *Mycobacterium* já foi relatado colonizando endofiticamente outros tecidos vegetais (MANO, MORISAKI, 2008). No geral, *Bacillus* foi o gênero isolado das sementes com maior frequência, e também esteve presente nas duas variedades de porta-enxerto. Alguns dos gêneros encontrados nas sementes de citros têm potencial para ser explorado para diversos fins, incluindo controle biológico e promoção de crescimento vegetal. Neste contexto, *Bacillus* tem sido avaliado como produtor de hormônios de crescimento, para o controle biológico e para a produção de compostos antimicrobianos (RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007; TSAVKELOVA et al., 2007); *Streptomyces*, como produtor de compostos antimicrobianos visando o controle biológico (ZARANDI et al., 2009); e *Sphingomonas*, como promotor de crescimento vegetal (ADHIKARI et al., 2001).

O gênero *Methylobacterium*, embora tenha sido isolado dos porta-enxertos, não foi isolado das sementes, sugerindo que ou se encontra numa densidade muito baixa, impossibilitando o seu isolamento, ou não é transmitido verticalmente às plantas cítricas. Nesse caso, isolados deste gênero devem estar presentes no solo e colonizam as plântulas durante a germinação das sementes. Omer, Tomboline e Gerhardson (2004a) verificaram a presença de *Methylobacterium* na rizosfera e filosfera de trigo e de trevo vermelho (plantas modelo) após a germinação de sementes tratadas com a bactéria. A presença dessas bactérias também já foi constatada no rizoplane de plantas de eucalipto (ANDREOTE et al., 2009), na rizosfera de cana-de-açúcar (ROSSETTO, 2008), no solo (KALYAEVA et al., 2001), e conforme já descrito, *Methylobacterium* spp. também já foram isoladas de ramos de plantas cítricas (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004). Esses e outros trabalhos mostram que essas bactérias estão presentes em diferentes nichos, o que poderia justificar a origem de *Methylobacterium* spp. em algumas espécies vegetais como citros.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as metodologias empregadas nos testes de promoção de crescimento vegetal por *Methylobacterium* spp. em

condição comercial geraram bons resultados, abrindo perspectivas da aplicação dessas bactérias para melhorar a produtividade e a qualidade de pomares cítricos. Além disso, os resultados foram importantes no que diz respeito à atenção que se deve ter na seleção das linhagens, para que estas não venham a gerar efeitos indesejáveis à planta hospedeira.

Referências

- ABANDA-NKPWATT, D.; MUSCH, M.; TSCHIRSCH, J.; BOETTNER, M.; SCHWAB, W. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n.15, p. 4025-4032, 2006.
- ADHIKARI, T.B.; JOSEPH, C.M.; YANG, G.; PHILLIPS, D.A.; NELSON, L.M. Evaluation of bacteria isolated from Rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 10, p. 916-924, 2001.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMARO, A.A.; VICENTE, M.C.M.; BAPTISTELLA, C.S.L. Citricultura paulista: tecnologia e mão de obra. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, p. 1-37, 2001.
- 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**, New York, 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.154-180, 2000.
- ARAÚJO, W.L. **A comunidade bacteriana endofítica de citros e sua interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC)**. 2000. 131p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **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.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro productions auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biological and Fertility of Soils**, Berlim, v. 35, p. 231-237, 2002.

ASSUMPÇÃO, L.C.; LACAVA, P.T.; DIAS, A.C.F.; AZEVEDO, J.L.; MENTEN, J.O.M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-Meio Ambiente, 1998a. cap. 4, p. 117-137.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, p. 40-65, 2000.

BARBOSA, J. C.; MALHEIROS, E. B.; BANZATTO, D. A. **ESTAT**: um sistema de análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Versão 2.0. Jaboticabal: Unesp, 1992.

BORGES, R.S.; ALMEIDA, F.J.; SCARANARI, C.; MACHADO, M.A.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.D.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Programa IAC/EMBRAPA/CNPq de incentivo à produção e difusão de mudas de citros isentas da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 21, p. 205-224, 2000.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, p. 535-538, 1991.

CARLOS, E.F.; STUCCHI, E.S.; DONADIO, L.C. **Porta-enxertos para a citricultura paulista**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. (Boletim Citrícola n. 1/1997).

CASTRO, A.M.; KERSTEN, E. Influência do anelamento e estiolamento de ramos na propagação da laranjeira Valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) através de estacas. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, n. 53, v. 23, p. 199-203, 1996.

CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F.G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 133, p. 81-88, 2000.

CONRATH, U. BECKERS, G.J.M.; FLORES, V.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M.A.; PIETERSE, C.M.J.; POINSSOT, B.; POZO, M.J.; PUGIN, A.; SCHAFFRATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L.; MAUCH-MANI, B. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 1962-1071, 2006.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.L. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1995, v. 1. 60 p.

ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, Washington, v. 44, p. 141-143, 1998.

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.J.; ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 287, n. 1, p. 8-14, 2008.

FREITAS, S.S.; AGUILAR VILDOSO, C.I. Rizobactérias e promoção de crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 987-994, 2004.

GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. Ammonia movements in rhizobia. **Microbiological Sciences**, Oxford, v. 2, p. 161-167, 1985.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109-117, 1995.

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

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**, Amsterdam, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities,. In: VAN ELSAS, J.D., WELLINGTON, E.M.H., TREVORS, J. (Ed.) **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 353-373.

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. 197-220, 1994.

HOLLAND, M.A. Occams razor applied to hormonology. Are cytokinins produced by plants? **Plant Physiology**, Nova York, v. 115, p. 865-868, 1997a.

HOLLAND, M.A. *Methylobacterium* in plants. **Recent Research Development**, Trivandrum, v. 1, p. 207-213, 1997b.

HOLLAND, M.A.; LONG, R.L.G.; POLACCO, J.C. *Methylobacterium* spp.: phylloplane bacteria involved in cross-talk with plant host? In: LINNDOW, S.E.; HECHT-POINAR, E.I.; ELLIOT, V.J. (Ed.). **Phyllosphere Microbiology**, Saint Paul, 2002. p. 125-135.

IBGE: Fonte – Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO - Levantamento Sistemático de Produção Agrícola, Fev. 2010.

Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>

Acesso em: 02. Abril, 2010.

KAGA, H.; MANO, H.; TANAKA, F.; WATANABE, A.; KANEKO, S.; MORISAKI, H. Rice seeds as sources of endophytic bacteria. **Microbes and Environments**, Sendai, v. 24, p. 154-162, 2009.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 473-480, 2004.

KALYAEVA, M.A.; ZAKHARCHENKO, N.S.; DORONINA, N.V.; RUKAVTSOVA, E.B.; IVANOVA, E.G.; ALEKSEEVA, V.V.; TROTSENKI, Y.A.; BURYANOV, Y.I. Plant growth and morphogenesis in vitro is promoted by associative methylotrophic bacteria. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 48, p. 514-517, 2001.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, D.E. Free-living bacteria for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 7, p. 39-43, 1989.

KOENING, R.L.; MORRIS, R.O.; POLACCO, J.C. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 184, p. 1832-1842, 2002.

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

LEE, H.S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C.W.; 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 N₂-fixing methylotrophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 42, p. 402-408, 2006.

LIFSHITZ, R.; KLOEPPER, J.W.; KOZLOWSKI, M.; SIMONSON, C.; CARLSON, J.; TIPPING, E.M.; ZALESKA, I. Growth promotion of canola (rape-seed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 8, p. 102-106, 1987.

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**, Tennessee, v. 21, p. 583-606, 2002.

MCINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field growth sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p.895-91, 1995.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H.Y.; YANG, J.C.; SUNDARAM, S.; SA, T.M. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar CO-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 45, n. 4, p. 315-324, 2004.

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

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

MADHAIYAN, M.; KIM, B.Y.; POONGUZHALI, S.; KWON, S.W.; SONG, M.H.; RYU, J.H.; GO, S.J.; KOO, B.S.; SA, T.M. *Methylobacterium oryzae* sp nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-L-carboxylate deaminase producing bacterium isolated from rice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading , v. 57, p. 326-331, 2007.

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**, República da Coréia, v. 59, p. 22-27, 2009a.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SUNDARAM, S.P.; SA, T. Nodulation and plant-growth promotion by methylotrophic bacteria isolated from tropical legumes. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 164, p. 114-120, 2009b.

MANO, H.; MORISAKI, H. Endophytic bacteria in rice plant. **Microbes and Environments**, Sendai, v. 23, p. 109-117, 2008.

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; BADOSA, E.; FRANCÉS, J.; ALEMANY, J.; LLORENTE, I.; MORAGREGA, C. Plant microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, Barcelona, v. 5, p. 169-175, 2002.

NEVES, M.F.; RUMJANEK, M.S. **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015**. 23 de novembro de 2006. Relatório ícone/Markestra/Pensa. Disponível em: <www.fundace.org/arquivos_diversos/agenda_estrategia/Agenda_Citrus_2015_PENSAICONE.pdf>. Acesso em: 15 set. 2009.

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

OMER, Z.S.; TOMBOLINI, R.; BROBERG, A.; GERHARDSON, B. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 43, p. 93-96, 2004b.

PILLAY, V.K.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 354-361, 1997.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros**. Campinas: IAC. Fundag: 2005. cap. 4. p. 61-104.

POMPEU JÚNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo State. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 2001. p. 75-82.

PROBANZA, A. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 182, p. 59-66, 1996.

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.

QUECINE, M.C. **Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. L.)**. 2010. 196 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

ROSSETTO, P.B. **Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas**. 2010. 196 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

RYU, C.M.; KIM, J.; CHOI, O.; KIM, S.H.; PARK, C.S. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 282-289, 2006.

SANTOS, M.H.L.C.; MARIANO, R.L.R.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, A.G.; WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.F. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 1-8, 2005.

SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 25-29, 2007.

SENTHILKUMAR, M.; MADHAIYAN, M.; SUNDARAM, S.P.; KANNAIYAN, S. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. With plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 164, p. 92-104, 2009.

SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; TRANI, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 225-234, 2006.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 183-190, 2000a.

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

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

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.

- VAN AKEN, B.; PERES, C.M.; DOTY, S.L.; YOOM, J.M.; SCHNOOR, J.L. *Methylobacterium populi* sp nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p.1191-1196, 2004.
- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. Signalling in rhizobacteria-plant interactions In: KROON, J. VISSER, J.W. (Ed.). 2004. **Root ecology**. Berlin: Springer Verlag, p. 287-330. (Ecological studies, v. 168)
- VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F; BUYER, J. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, p. 371-380, 2005.
- VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 91, p. 127-141, 2001.
- TSAVKELOVA, E.A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; BOTINA, S.G.; NETRSOV, A.I. Bacteria associated with orchids roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 162, p. 69-76, 2007.
- WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487-511, 2001.
- ZARANDI, M.E.; BONJAR, S.G.H.; DEHKAEI, F.P; MOOSAVI, S.A.A; FAROKHI, R.P.; AGHIGHI, S. Biological control of rice blast (*Magnaporth oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. **American Journal of Applied Sciences**, New York, v. 1, p. 194-199, 2009.

3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE β -1,4-ENDOGLICANASE EM *Methylobacterium extorquens* E COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Catharanthus roseus*

Resumo

Methylobacterium extorquens AR1.6/2 foi isolada como endófito de ramos de *Citrus sinensis* afetados pela CVC, causada por *Xylella fastidiosa*. Esta bactéria foi geneticamente transformada para expressar o gene da β -1,4-endoglicanase A (EglA) de *Bacillus pumilus*. A linhagem transformada, AREGLA, foi introduzida em *Catharanthus roseus*, e o seu estabelecimento, bem como a sua interação com *X. fastidiosa* (linhagem isolada de citros afetado pela CVC) na planta hospedeira, foram avaliados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi observado que a linhagem AREGLA colonizou a superfície de *C. roseus*, onde formou biofilme, confirmando que esta pode ser uma estratégia de estabelecimento na planta hospedeira. Esta linhagem AREGLA também foi observada no interior da planta hospedeira colonizando os vasos do xilema. Os resultados mostraram que *M. extorquens* e *X. fastidiosa* podem habitar os vasos xilemáticos em *C. roseus*, onde podem interagir no interior da planta hospedeira. Estes resultados indicam que a utilização de *Methylobacterium* para o controle da CVC poderá ser viável devido às características apropriadas para introdução neste endófito de citros.

Palavras-chave: *Methylobacterium extorquens*; EglA; Interação bactéria-planta; Controle simbiótico; *Xylella fastidiosa*

3 HETEROLOGOUS EXPRESSION OF A β -1,4-ENDOGLUCANASE IN *Methylobacterium extorquens* AND ENDOPHYTIC COLONIZATION OF *Catharanthus roseus*

Abstract

Methylobacterium extorquens AR1.6/2 was isolated as endophytic from branches of *Citrus sinensis* showing symptoms of CVC, caused by *Xylella fastidiosa*. This bacterium was genetically transformed to express heterolously an endoglucanase A (EglA) obtained from *Bacillus pumilus*. The transformed strain, AREGLA, was introduced in *Catharanthus roseus*, and its establishment and interaction with *X. fastidiosa* (strain isolated from citrus affected by CVC) in the host plant were evaluated by scanning electron microscopy (MEV). It was observed that the strain AREGLA colonized the surface of *C. roseus*, where formed the biofilm, confirming that this way may be an important strategy for establishment in the host plant. Also, this strain was observed within the xylem vessels. The results indicated that *M. extorquens* and *X. fastidiosa* can inhabit the interior of the xylem in *C. roseus*, where they can interact within the host plant. These results indicates the possibility of *Methylobacterium* be used for control of CVC, due to the appropriate characteristics of the bacterium.

Keywords: *Methylobacterium extorquens*; EglA; Bacteria-plant interaction; Symbiotic control; *Xylella fastidiosa*

3.1 Introdução

A filosfera e a rizosfera abrigam uma grande diversidade de bactérias que podem interagir com a planta hospedeira de forma benéfica, prejudicial ou neutra. Esta interação bactéria-planta é regulada por vários metabólitos liberados pela planta hospedeira e também por bactérias epifíticas e/ou endofíticas. Neste contexto, as bactérias pertencentes ao gênero *Methylobacterium* são comumente encontradas em associação com plantas (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; HOLLAND; POLACO, 1994; OMER; TOMBOLINI; GERHARDSON, 2004), podendo promover o crescimento vegetal e/ou controlar fitopatógenos (MADHAIYAN et al., 2006; LEE et al., 2006). Em citros, *Methylobacterium* foi isolado como um dos principais gêneros presente na comunidade bacteriana de porta-enxertos (ARAÚJO et al., 2001) e também de *Citrus sinensis*, especialmente das plantas afetadas pela CVC, causada pela bactéria *X. fastidiosa* (ARAÚJO et al., 2002). Dessa forma, pela primeira vez foi cogitada a possibilidade de interação entre espécies deste gênero e *X. fastidiosa*, e posteriormente o controle simbiótico da CVC por meio destas bactérias.

Segundo hipóteses estabelecidas a respeito da interação entre bactérias endofíticas e *X. fastidiosa*, a CVC poderia desempenhar um papel no estabelecimento de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira. Esta hipótese foi endossada pela análise da diversidade de *Methylobacterium* spp., pois este gênero foi o mais frequentemente isolado de plantas sintomáticas (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; SANTOS, 2005). Além disso, resultados de estudos da interação entre *Methylobacterium* spp. e *X. fastidiosa* realizados *in vitro*, sugerem que, em alguns casos, o crescimento do fitopatógeno pode ser inibido na presença de *Methylobacterium* (LACAVA et al., 2004). Posteriormente, Andreote et al. (2006) demonstraram que a linhagem *M. mesophilicum* SR1.6/6 isolada de citros foi capaz de

colonizar *C. roseus* e *Nicotina clevelandii*, sugerindo o uso dessas plantas como modelo para o estudo da interação entre *Methylobacterium* spp. e *X. fastidiosa*.

Com o auxílio da engenharia genética, novas formas de controle de fitopatógenos vêm sendo desenvolvidas a partir de bactérias endofíticas. A introdução de genes exógenos nessas bactérias possibilita a aquisição de novas características utilizadas no controle de doenças e pragas (FAHEY et al., 1991; LAMPEL et al., 1994; TOMASINO et al., 1995). Recentemente, Marx e Lidstrom (2001) desenvolveram, com base no genoma de *M. extorquens* AM1, uma série de vetores de expressão que estão sob controle do promotor *PmxaF* (gene que codifica para a metanol desidrogenase), e isso tem se constituído de uma ferramenta genética que vem sendo empregada não só para uma melhor compreensão do metabolismo metilotrófico (ANTHONY; GHOSH; BLAKEI, 1994; LIDSTROM; MURRELL; DALTON, 1992; VORHOLT, 2002), proposto como um importante ponto na interação entre *Methylobacterium* e planta hospedeira (ABANDA-KNPWATT et al., 2006; SY et al., 2005), como também para a expressão de genes heterólogos em *Methylobacterium*. Dessa forma, o potencial de *M. extorquens* e outras bactérias metilotróficas pode ser aumentado para a produção de moléculas, incluindo vitamina B12 (TROTSENKO; IANOVA; DORONINA, 2001), polihidroxibutirado (PHB) (BOURQUE; POMERLEAU; GROLEAU, 1995; KOROTKOVA; CHISTOSERDORA; LIDSTROM, 2002), carotenóides (VAN DIEN et al., 2003) e fitohormônios (KOENING; MORRIS; POLLACO, 2002). Além disso, a íntima associação entre *Methylobacterium* spp. e a planta hospedeira sugere a possibilidade de manipulação genética, com consequente aumento da capacidade destas bactérias em proteger o hospedeiro contra insetos e patógenos. Assim, Choi et al. (2008) clonaram e expressaram o gene *cry1Aa* de *B. thuringiensis* em *M. extorquens* para o controle de *Bombyx mori*. Nesse mesmo sentido, o controle simbiótico é uma nova ferramenta de transformação genética que tem sido sugerida para o controle de doenças em plantas. Esta ferramenta utiliza o princípio de que microrganismos candidatos que tenham uma associação com um ecossistema com um determinado problema, e que ocupem o mesmo nicho ou tenha acesso ao patógeno alvo podem ser manipulados geneticamente e reintroduzidos para controle do patógeno (MILLER, 2007).

X. fastidiosa é uma bactéria Gram-negativa restrita ao xilema da planta hospedeira, que causa a CVC em citros (CHANG et al., 1993) e doença de Pierce em videira (HOPKINS, 1989). É disseminada naturalmente por meio de insetos vetores, pertencentes às famílias Cicadellidae e Cercopidae, que adquirem *X. fastidiosa* após se alimentarem da seiva bruta do xilema em plantas infectadas com a bactéria (PURCELL; FINLAY, 1979; PURCELL; HOPKINS, 1996; ROSSETTI et al., 1990). A hipótese mais aceita para a causa de doenças em plantas por *X. fastidiosa* é a síntese de exopolissacarídeos (EPSs) (da SILVA et al., 2001; SIMPSON et al., 2000). Como observado em análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 1), a produção de EPS, nomeado goma fastidiana (da SILVA et al., 2001), possibilita o agrupamento de células e consequente formação de biofilme, levando à obstrução dos vasos xilemáticos. Consequentemente, os processos fisiológicos vitais da planta como a fotossíntese, respiração e distribuição dos nutrientes ficam comprometidos, levando, em citros, aos sintomas da CVC, manifestados pela clorose da folhas e redução do tamanho dos frutos (MACHADO et al., 1992; MACHADO et al., 1994; ROSSETTI et al., 1990).

Figura 1 - Eletromicrografia de *X. fastidiosa* infectando os vasos do xilema em *Citrus*.
Fonte : E.W. Kitajima (ESALQ/USP)

O estabelecimento de várias outras doenças causadas por bactérias fitopatogênicas depende da produção de EPSs (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999), contribuindo para o estabelecimento do microrganismo na planta e obstrução do xilema. Por essa razão, a busca por microrganismos com a habilidade

em degradar EPSs tem sido considerada uma estratégia para o controle de doenças em plantas.

Bactérias do gênero *Bacillus* têm sido descritas como microrganismos potenciais para a degradação de EPSs. Nankai et al. (1999) elucidaram a via completa de despolimerização de goma xantana por *Bacillus* sp. linhagem GL1, e mostraram que algumas enzimas, dentre elas a beta-1,4 D-endoglicanase, atuam de forma sequencial para a despolimerização de goma. Lima et al. (2005), avaliando alguns isolados endofíticos de citros do gênero *Bacillus* (Araújo et al., 2001) quanto à produção de endoglicanase, selecionaram *B. pumilus* CL16 como o isolado com mais alta atividade para degradação de goma, e, assim, o gene da endoglicanase A (*eglA*) foi clonado.

Segundo Azevedo e Araújo (2003), por colonizarem o mesmo nicho que *X. fastidiosa* em citros, *Methylobacterium* spp. poderiam ser geneticamente modificadas e reintroduzidas na planta hospedeira para expressarem genes de despolimerização de goma fastidiana. Dentro desse contexto do controle simbiótico, Gai et al. (2009) transformaram geneticamente *M. mesophilicum* SR1.6/6 para expressar a proteína fluorescente verde (GFP), reintroduziram esta bactéria manipulada geneticamente em *C. roseus*, e examinaram a colonização e a transmissão da bactéria por *Bucephalagonia xanthophis*, um dos insetos vetores de *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. Os resultados mostraram que a bactéria não só foi transmitida pelo inseto vetor para a planta hospedeira, mas também ocupou o mesmo nicho que o fitopatógeno em *C. roseus*. Assim, os autores propuseram este endófito como um candidato ao controle simbiótico contra *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. Em outros trabalhos realizados em nosso laboratório, *M. extorquens* AR1.6/2, linhagem oriunda de citros, também foi modificada geneticamente para expressar GFP em *C. roseus*. Os resultados obtidos mostraram que, assim como verificado para *M. mesophilicum* SR1.6/6 (GAI et al., 2009), *M. extorquens* AR1.6/2 colonizou a planta hospedeira. Com o objetivo de avaliar *M. extorquens* AR1.6/2 como candidata ao controle simbiótico contra *X. fastidiosa*, o presente estudo relata a transformação genética dessa bactéria para expressão heteróloga do gene da endoglicanase A (*EglA*) de *B. pumilus*.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Meios de cultura, linhagens bacterianas e plasmídeo

As bactérias e o plasmídeo usados nesse estudo, bem como suas características, estão listados na Tabela 3.1. As linhagens bacterianas pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, ESALQ/USP. *M. extorquens* AR1.6/2 foi previamente isolada como endófito de *Citrus sinensis* afetados pela CVC (ARAÚJO et al., 2002). Esta linhagem e derivados foram rotineiramente crescidos em meio CHOI3 a 28°C (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998). Para a seleção de AR1.6/2 expressando uma endoglicanase A (AREGLA), o meio foi suplementado com canamicina (50 µg/mL). A linhagem *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2001) foi cultivada a 28°C em meio PW (DAVIS; FRENCH; SCHAAD, 1981).

O plasmídeo utilizado para os experimentos foi o pEGLA160, construído para uso em *Methylobacterium* (Figura 3.1).

Tabela 3.1 – Bactérias e plasmídeo

Características		Referências
Bactérias		
AR1.6/2	<i>M. extorquens</i> isolada de <i>Citrus sinensis</i> afetado pelo CVC	Araújo et al. (2002)
AREGLA	AR1.6/2 transformada com pEGLA160	Este estudo
<i>X. fastidiosa</i>	Patógeno isolado de <i>Citrus sinensis</i> afetado pela CVC	Lacava et al. (2001)
Plasmídeo		
pEGLA160	Km ^R , P _{lacα} - P _{mxαF} , Col E1-IncP, <i>eglA</i>	Ferreira Filho et al. (2010)

Figura 3.1 – Mapa de restrição plasmidial e estratégia usada para clonar o gene *eglA* no pCM160, gerando o vetor pEGLA160 para expressão heteróloga de genes em *Methyobacterium*. A parte em preto de *eglA* foi descartada e não clonada em pCM160. Na nova construção, *eglA* encontra-se sob regulação do promotor pEGLA de *B. pumilus*. Fonte: Ferreira Filho et al. (2010)

3.2.1.2 Preparo de células competentes e transformação de *M. extorquens*

As células competentes foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Toyama; Anthony e Lidstrom (1998), com algumas modificações propostas por Figueira et al. (2000). As células bacterianas foram cultivadas por 3 a 4 dias a 28°C em meio sólido CHOI3 (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998). Uma alçada das células foi inoculada em 5 mL de meio CHOI3 líquido e incubada a 28°C, em constante agitação, até a cultura atingir uma D.O.₆₀₀ de 0,1-0,2. Essa cultura foi transferida para 50 mL de CHOI3 líquido e cultivada até uma D.O.₆₀₀ de 0,6-0,8. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (4500 rpm) a 4°C por 10 minutos, lavadas três vezes em água Mili-Q esterilizada gelada e, então, o pellet foi ressuspensionado em glicerol 10%

(v/v) para uma concentração final de aproximadamente 10^9 células/mL. Alíquotas de 100 μ L de células foram congeladas em N_2 e estocadas a -80°C .

As alíquotas de AR1.6/2 competentes foram misturadas com 100 ng de DNA plasmidial (pEGLA160) e eletroporadas usando um aparelho Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA) com os seguintes parâmetros: 2,5 Kv, 25 mA, 25 μ F, 400 Ω , resultando em um tempo constante de 8 a 10 ms. Imediatamente após a eletroporação, as células foram transferidas para 1 mL de meio CHOI3 e mantidas em gelo por 15 minutos, e então, incubadas a 28°C sob constante agitação. Após 24 horas as células foram semeadas em CHOI3 suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina, e incubadas a 28°C por 4 dias para seleção dos transformantes. O transformante *M. extorquens* AR 1.6/2 selecionado foi nomeado *M. extorquens* AREGLA.

3.2.1.3 Estabilidade do plasmídeo *in vitro*

Para verificar a estabilidade do plasmídeo pEGLA160, a linhagem AREGLA foi primeiramente cultivada em meio CHOI3 suplementado com canamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) por 18 horas, e, então, a cultura foi diluída para 10^3 UFC/mL em 25 mL de CHOI3 sem o antibiótico. As culturas foram crescidas até a quinta geração (~ 28 h – 4,6 h por geração), e as células (10^3 UFC/mL) foram crescidas por mais 5 gerações (3 vezes), num total de 84 h. Uma fração das culturas em fase log foi usada para uma série de diluições. Alíquotas foram semeadas em meio CHOI3 sem canamicina. Uma centena de colônias escolhidas aleatoriamente foi inoculada com palitos sobre o meio CHOI3 suplementado com canamicina. As colônias foram contadas e a porcentagem de clones carregando o plasmídeo foi calculada.

3.2.1.4 Atividade de endoglicanase

As bactérias foram crescidas em meio CHOI3 (suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina) contendo 1% de carboximetilcelulose (CMC). Após o crescimento da bactéria a produção de endoglicanase foi avaliada pela adição de 10 mL do corante vermelho congo (1%) às placas, e, em seguida, elas foram lavadas com NaCl 5M,

segundo a metodologia proposta por Teather e Wood (1982). A visualização de um halo de degradação ao redor da colônia indicou a secreção da enzima avaliada. O índice de degradação enzimática (diâmetro da área de degradação/diâmetro da colônia bacteriana) foi utilizado para verificar a diferença na produção de CMCase por AR1.6/2 transformada com pEGLA160 com relação à bactéria carregando apenas o vetor original pCM160. As médias obtidas foram comparadas por meio do teste de Tukey a 5% com o auxílio do programa SAS (versão 6.11). As análises foram realizadas em triplicatas.

3.2.1.5 Experimentos de colonização

3.2.1.5.1 Cultivo de *C. roseus*

A espécie *C. roseus* foi escolhida para os estudos de colonização por ser considerada uma planta modelo para experimentos com bactérias endofíticas e *X. fastidiosa* (ANDREOTE et al., 2006; LACAVA et al., 2006, LACAVA et al., 2007; MONTEIRO et al., 2001).

Para obtenção das plântulas *in vitro*, sementes obtidas comercialmente (Sakama Co., Brasil), foram previamente desinfetadas por meio de uma série de lavagens: 1 minuto em água destilada esterilizada, 1 minuto em etanol 70%, 2 minutos em hipoclorito de sódio 2%, 30 segundos em etanol 70%, e 2 lavagens de um minuto em água destilada esterilizada. As sementes foram germinadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e mantidas em BOD a 28°C, com fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) por 30 dias.

3.2.1.5.2 Colonização de *C. roseus* por *Methylobacterium*

A colonização de *C. roseus* por *M. extorquens* AR1.6/2 e AREGLA, bem como a interação dessas linhagens com *X. fastidiosa*, foram avaliadas *in vitro*. Após 30 dias de cultivo, as plântulas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL contendo meio MS líquido e, então, 10 µl de uma suspensão de *X. fastidiosa* (~10⁸ UFC/mL) (LI et al.,

2001) foram inoculados logo acima da gema axilar com o auxílio de uma seringa. Plantas controle foram inoculadas com tampão PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Após 7 dias, 10 µl das suspensões de *M. extorquens* AR1.6/2 ou AREGLA (~10⁵ UFC/mL) foram inoculados via sistema radicular em plântulas previamente inoculadas ou não com *X. fastidiosa*. As plantas foram mantidas em BOD a 28°C, com fotoperíodo de 16/8horas (claro/escuro) por 45 dias.

Este experimento consistiu em 6 tratamentos (controle, *X. fastidiosa*, AR1.6/2, AREGLA, AR1.6/2 + *X. fastidiosa*, AREGLA + *X. fastidiosa*), inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento. Aos 7, 14, 21, 28 e 45 dias após a inoculação das bactérias, fragmentos de raízes, caule e folhas foram coletados e preparados para visualização em MEV.

3.2.1.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Segmentos de raiz, caule e folha foram cortados em fragmentos de cerca de 2 cm e fixados em solução tampão Karnovsky (2,% glutaraldeído; 0,001M CaCl₂; 2,5% paraformaldeído) a 4°C. Após três lavagens de 1 minuto em tampão cacodilato (0,05 M pH 7,2), as amostras foram infiltradas com glicerol 30% durante 30 minutos para crioproteção, imersas em N₂ líquido, fragmentados com auxílio de pinça e bisturi, e tratados com uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato por 2 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com água para retirada do excesso de ósmio, e, então, desidratadas em um gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Os materiais foram secos no ponto crítico (CPD 030, Balzers), montados sobre “stubbs” e cobertos com ouro no metalizador (MED 010, Balzers), para, assim, serem observados ao MEV (LEO-ZEISS, NAP-MEPA, ESALQ-USP).

3.2.2 Resultados e Discussão

3.2.2.1 Transformação de *M. extorquens* AR1.6/2 e estabilidade do plasmídeo *in vitro*

Nas condições utilizadas, o rendimento da transformação de *M. extorquens* AR1.6/2 com o plasmídio pEGLA160 foi de 1.3×10^4 UFC/ μ g de DNA plasmidial. Figueira et al. (2000) observaram resultados similares ($\sim 10^3$ UFC/ μ g) transformando *M. extorquens* com o plasmídeo pRK310. Gai et al. (2009) também obtiveram alta eficiência de transformação ($\sim 10^2$ UFC/ μ g) usando o plasmídeo pCM88 para transformar *M. mesophilicum* SR1.6/6.

Um transformante, denominado de AREGLA, foi selecionado e avaliado quanto à estabilidade plasmidial. Foi observado que o plasmídio pEGLA160 se manteve estável expressando ambos os genes de resistência a canamicina e *eglA* por pelo menos 15 gerações, na ausência de antibiótico (Tabela 3.2), sugerindo, assim, que o transformante pode ser inoculado na planta sem risco de perder as características introduzidas. Resultados similares foram obtidos por Gai et al. (2009) em estudos com *M. mesophilicum* SR1.6/6 transformada com o vetor pCM88, onde a estabilidade do plasmídeo se manteve por no mínimo 20 gerações de células crescidas em meio de cultura sem antibiótico.

Tabela 3.2 - Estabilidade do plasmídeo pEGLA160 em AREGLA. A porcentagem de colônias transformadas com o plasmídeo foi obtida pela contagem aleatória após 28, 56 e 84 horas de cultivo da bactéria crescendo em meio de cultura sem o antibiótico canamicina

Número de gerações	Colônias transformadas com pEGLA160 (%)
5	79.9 (2.5)*
10	75.2 (2.0)
15	3.9 (2.9)

* Médias para duas replicatas; o desvio padrão está entre parênteses

3.2.2.2 Detecção da atividade de endoglicanase por AREGLA

A expressão constitutiva do gene heterólogo foi confirmada *in vitro*. A atividade da enzima endoglicanase foi verificada em meio CHOI3+CMC+canamicina por meio da formação de zonas claras amareladas ao redor das colônias, em contraste com a cor

avermelhada do vermelho congo, indicando que houve hidrólise de CMC presente no meio de cultura por AREGLA (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Atividade de endoglicanase visualizada pela formação de um halo de degradação ao redor da colônia. A) *M. extorquens* AR1.6/2; B) *M. extorquens* AREGLA

Por meio do cálculo do índice de degradação enzimática foi verificada uma diferença na atividade de CMCase por AR1.6/2. A nova construção contendo *eglA* sob a regulação do promotor pEGLA de *B. pumilus* aumentou a produção de endoglicanase por *M. extorquens* AR1.6/2 (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Atividade de endoglicanase expressa por AR1.6/2

Bactéria	Plasmídeos	Índice de degradação
AR1.6/2 ^a	-	1.00 ^{a (*)}
	pEGLA160	1.33 ^{b (*)}

^a Atividade de endoglicanase de *M. extorquens* AR1.6/2 portadora do plasmídeo pEGLA160 em meio CHOI3 sólido suplementado com CMC 1%

(*) Médias de dados de quatro replicatas. Valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05)

3.2.2.3 Colonização de *C. roseus* pela bactéria endofítica *M. extorquens*

Endófitos têm a capacidade de penetrar e colonizar ativamente os tecidos vegetais de forma local ou sistêmica, podendo habitar o apoplasto (QUADT-

HALLMANN; BENHAMOU; KLOEPPER, 1997), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997, NEWMAN et al., 2003) e ocasionalmente o meio intracelular (QUADT-HALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997; QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996). Além disso, podem ocupar o mesmo nicho que fitopatógenos, tornando-se interessantes candidatos ao controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997; RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007).

Nichos específicos podem ser ocupados de acordo com a espécie endofítica considerada. A espécie *M. extorquens* já foi descrita colonizando o espaço intercelular em *Medicago truncatula* (SY et al., 2005) e *M. mesophilicum* SR1.6/6 o interior e superfície de *C. roseus* e *N. clevelandii* (ANDREOTE et al., 2006). Estes autores apresentaram dados de plantas inoculadas *in vitro*, revelando a formação de biofilme por *M. mesophilicum* SR1.6/6 nas raízes de ambas as plantas, o que pode fornecer a base para uma maior colonização endofítica.

No presente estudo, a colonização e o nicho ecológico ocupado por *M. extorquens* AR1.6/2 e AREGLA em plântulas de *C. roseus* cultivadas *in vitro*, foram determinados pela visualização em MEV. Além disso, foi avaliada a interação dessas bactérias em co-inoculação com *X. fastidiosa*, assim como a colonização individual do fitopatógeno nas raízes, caules e folhas das plântulas.

De modo geral, foi observado que as linhagens AR1.6/2 e AREGLA se estabeleceram em *C. roseus*, colonizando todos os tecidos avaliados. As imagens de MEV obtidas aos 45 dias após a inoculação das bactérias revelaram que o padrão de colonização das raízes foi semelhante para AR1.6/2 e AREGLA, formando uma matriz que caracteriza o biofilme (Figura 3.3), sendo ainda possível observar locais de maior colonização, como as regiões pilosas da raiz (Figura 3.3C). Este resultado mostrou que a introdução do gene *eg/A* não alterou o padrão de interação de *M. extorquens* com as raízes da planta hospedeira. Entretanto, foi observado que esta alteração pode ter gerado uma menor aptidão desta bactéria às folhas (Figura 3.4) e ao caule (Figura 3.5), visto que foi observado uma menor colonização destes tecidos por AREGLA quando comparado à linhagem AR1.6/2.

Figura 3.3 – Eletromicrografia da superfície de raiz de plântulas de *C. roseus* colonizada por AR1.6/2 (A: bar = 10 μm , 1.00 KX, 20.00 KV) e AREGLA (B: bar = 10 μm , 1.00 KX, 20.00 KV), formando biofilme maduro. Observa-se também AREGLA colonizando as radículas da região pilosa (C: bar = 20 μm , 1,12 KX; 25.00 KV)

Figura 3.4 – Eletromicrografia da superfície de folha de plântulas de *C. roseus* colonizada por AR1.6/2 (A: bar = 20 μm ; 1.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (B: bar = 10 μm ; 3.00 KX; 20.00 KV)

Figura 3.5 - Eletromicrografia do caule de plântulas de *C. roseus* colonizado por AR1.6/2 (A: bar = 10 μm ; 1.00 KX; 20.00 KV; B: bar = 10 μm ; 3.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (C: bar = 10 μm ; 1.00 KX; 20.00 KV; D: bar = 10 μm ; 3.00 KX; 20.00 KV)

Os nichos colonizados por AR1.6/2 e AREGLA neste estudo (raízes, folhas e xilema) estão de acordo com outros trabalhos e são os mais comuns citados na literatura (GAI et al., 2009; MICHELI, 2001; MONIER; LINDOW, 2003; SY et al., 2005).

A formação do biofilme observada nas raízes pode ser a primeira etapa para a colonização endofítica na interação *Methylobacterium*-planta (ANDREOTE et al., 2006), permitindo maior proteção bacteriana contra variações físico-químicas do ambiente, bem como a sua interação com outros microrganismos.

A colonização do xilema também já foi verificada em outros estudos com *Methylobacterium*. Recentemente, Gai et al. (2009) determinaram por microscopia de fluorescência a colonização de *M. mesophilicum* SRGFP em *C. roseus* cultivadas *in vitro*. Os autores verificaram a colonização de tecidos internos por esta bactéria, com preferencial colonização dos vasos xilemáticos.

Com relação à colonização da superfície das folhas e estômatos por AR1.6/2 e AREGLA, resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos. Sobral (2003) verificou, por meio de MEV, que quando inoculada em sementes de soja *in vitro*, a

linhagem *M. mesophilicum* SR1.6/6 colonizou a superfície foliar e os estômatos, além das raízes e vasos condutores. Sy et al. (2005) demonstraram, por meio de microscopia de fluorescência, que *M. extorquens* CM174.1, previamente inoculada em sementes de *Medicago truncatula* cultivada *in vitro*, colonizou a superfície e os espaços intercelulares das folhas e, ocasionalmente, também foram observados agrupamentos de células nos estômatos. Os autores também observaram o estabelecimento da bactéria nas raízes. O estabelecimento de *Methylobacterium* na filosfera tem sido associado à utilização de metanol (CORPE; RHEEM, 1989) emitido primariamente através dos estômatos (NEMECEK-MARSHALL et al., 1995). A metabolização do metanol parece ser importante durante a interação da bactéria com a planta, servindo como fonte de energia para o crescimento bacteriano (NEMECECK-MARSHALL et al., 1995). Neste contexto, a presença de AR1.6/2 e AREGLA observada na filosfera deve estar relacionada à utilização do metanol emitido pelos estômatos, favorecendo o estabelecimento dessas linhagens em *C. roseus*. Com base nos resultados deste e outros estudos, é possível sugerir que AR1.6/2 e AREGLA se deslocaram das raízes às folhas, colonizando *C. roseus* de forma sistêmica.

Nas plântulas inoculadas com *X. fastidiosa* e as linhagens endofíticas AR1.6/2 ou AREGLA, não foi possível observar o fitopatógeno no xilema, nem alterações nos padrões de colonização das linhagens endofíticas, tanto nas raízes, quanto nas folhas e no caule avaliados (Figura 3.6; Figura 3.7; Figura 3.8, respectivamente). Embora células de *X. fastidiosa* não tenham sido observadas juntamente com as células das linhagens endofíticas, foi observado que alguns vasos xilemáticos apresentaram biofilmes típicos de tecidos infectados pelo fitopatógeno, ou seja, pareciam obstruídos por um material semelhante a uma goma (Figura 3.8A). Possivelmente, a não observação de células isoladas de *X. fastidiosa* está relacionada ao fato de se encontrarem em uma baixa densidade nas plântulas com relação às células de *Methylobacterium*, o que pode ser melhor observado nas plântulas inoculadas apenas com o fitopatógeno (Figura 3.9D). No entanto, a observação de vasos xilemáticos obstruídos pelo biofilme sugere que *X. fastidiosa* interagiu com AR1.6/2 e AREGLA no interior da planta hospedeira. Cabe também ressaltar que, numa avaliação geral das amostras, nas plântulas tratadas apenas com *X. fastidiosa* a quantidade de vasos xilemáticos obstruídos observados foi

aparentemente maior do que o observado nas plântulas onde o fitopatógeno foi coinoculado com AR1.6/2 ou AREGLA (Figuras 3.8C e 3.9A), sugerindo que houve redução da colonização da planta por *X. fastidiosa* quando esta foi coinoculada com as linhagens endofíticas. de Souza et al. (2005), ao examinarem a expressão de genes relacionados à patogenicidade de *X. fastidiosa* 9a5c, *in vitro* e em *Citrus sinensis*, observaram diferenças na expressão dos genes de adaptação da bactéria. Os autores sugeriram que essas diferenças poderiam ser resultantes das condições ambientais distintas onde as células cresceram, visto que a expressão de genes relacionados com a adaptação possivelmente depende do ambiente ao qual o microrganismo está exposto. Dentro desse contexto, a presença de AR1.6/2 ou AREGLA no xilema em *C. roseus* também poderia estar influenciando na adaptação de *X. fastidiosa* nesse ambiente.

Figura 3.6 - Eletromicrografia da superfície de raiz de plântulas de *C. roseus* colonizada por AR1.6/2 (A: bar = 20 μ m; 1.00 KX; 20.00 KV; B: bar = 10 μ m; 3.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (C: bar = 20 μ m, 1.00 KX; 20.00 KV; e D: 10 μ m; 3.00 KX; 20.00 KV) coinoculadas com *X. fastidiosa*

Figura 3.7 – Eletromicrografia da superfície de folha de plântulas de *C. roseus* colonizada por AR1.6/2 (A: bar = 10 μ m; 3.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (B: bar = 10 μ m; 3.00 KX; 20.00 KV) coinoculadas com *X. fastidiosa*

Figura 3.8 - Eletromicrografia do caule de plântulas de *C. roseus* colonizado por AR1.6/2 (A: bar = 2 μ m; 5.00 KX; 20.00 KV) e AREGLA (B: bar = 10 μ m; 3.00 KX; 20.00 KV) coinoculadas com *X. fastidiosa*. Observar em (A) vaso xilemático obstruído com material com aspecto de goma. Em (C) é apresentada uma visão geral de um corte transversal de caule mostrando os vasos xilemáticos de plântulas coinoculadas com AREGLA e *X. fastidiosa* (bar = 200 μ m; 178 X; 20.00 KV)

Figura 3.9 – Eletromicrografia do caule de plântulas de *C. roseus* colonizado por *X. fastidiosa*. Observa-se em A (100 μ m; 297 X; 20.00 KV); B (bar = 20 μ m; 1.00 KX; 20.00 KV); C (bar = 2 μ m; 5.00 KX; 20.00 KV e D (bar: 2 μ m; 10.00 KX; 20.00 KV), vasos xilemáticos obstruídos. Em (D) também são observadas células individualizadas de *X. fastidiosa*

A goma fastidiana produzida por *X. fastidiosa* parece estar diretamente relacionada à patogenicidade dessa bactéria, favorecendo a formação de biofilme, requerido pela bactéria para a colonização do xilema (da SILVA et al., 2001). A falta do EPS, por conseguinte, poderia prevenir os sintomas da CVC, causados pela oclusão dos vasos xilemáticos. Os testes de atividade de endoglicanase *in vitro* mostraram um aumento na produção dessa enzima por AREGLA. Sendo a expressão do gene *eglA* constitutiva, essa atividade se manteve quando a bactéria colonizou *C. roseus*. Esse fato pode ser reforçado por meio da observação geral dos vasos xilemáticos que pareciam menos obstruídos nas plântulas coinoculadas com *X. fastidiosa* e a linhagem endofítica. Dessa forma, parece ter ocorrido degradação de goma por AREGLA ou *X. fastidiosa* teve seu crescimento inibido na presença deste endófito. Embora estudos *in vitro* tenham demonstrado que a linhagem *M. extorquens* AR1.6/2 possa estimular o crescimento de *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2004), os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que quando em interação com a planta hospedeira isso parece não ocorrer. Possivelmente, essa mudança na interação deva estar associada às condições

ambientais (de SOUZA et al., 2005). Isso pode ser exemplificado por meio dos estudos realizados no Capítulo 2, onde a linhagem AR1.6/2 causou um efeito negativo sobre a germinação das sementes de limão-cravo, mas não sobre o seu desenvolvimento, enquanto que em tangerina sunki, além deste endófito não ter sido prejudicial à germinação, foi capaz de conferir benefícios às plantas por meio da promoção de crescimento.

Os resultados gerados nesse estudo são muito importantes para o entendimento dos mecanismos ecológicos envolvidos com o estabelecimento de *X. fastidiosa* na planta hospedeira. Estes resultados sugerem também que *M. extorquens* AR1.6/2 pode ser reintroduzida na planta hospedeira com vista ao controle simbiótico. Resultado semelhante foi observado por Sy et al. (2005) em um trabalho com mutantes de *M. extorquens* CM174.1 para a utilização de fontes de carbono. Os autores verificaram que a modificação genética da bactéria não afetou seu padrão de colonização em *M. truncatula*. Esses pré-requisitos também já foram descritos para a bactéria endofítica *M. mesophilicum* SR1.6/6 num estudo realizado por Gai et al. (2009), por meio do qual os autores propuseram o uso dessa linhagem para o controle simbiótico contra *X. fastidiosa*. Neste contexto, o presente trabalho propõe *M. extorquens* AR1.6/2 como candidata ao controle simbiótico contra *X. fastidiosa*. Além disso, conforme verificado no Capítulo 2, *M. extorquens* AR1.6/2 pode promover o crescimento de citros. Isso torna essa bactéria ainda mais interessante, uma vez que poderia ser empregada num programa de melhoramento vegetal para, além de realizar o controle de doenças, promover o crescimento vegetal de plantas cítricas. Assim, os resultados desse estudo abrem caminhos para novas investigações visando uma melhor aplicação de *M. extorquens* AR1.6/2 e outras linhagens para fins agronômicos.

Referências

ABANDA-NKPWATT, D.; MUSCH, M.; TSCHIERSCHE, J.; BOETTNER, M.; SCHWAB, W. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 15, p. 4025-4032, 2006.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.JR.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.

ANTHONY, C.; GHOSH, M.; BLAKEI, C.C.F. The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrroloquinoline quinone. **Biochemical Journal**, London, v. 304, p. 665-674, 1994.

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

AZEVEDO, J.L. ARAÚJO, W.L. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. **Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, p. 223-233, 2003.

BOURQUE, D. ; POMERLEAU, Y. ; GROLEAU, D. High-cell-density production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens* : production of high-molecular-mass PHB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 44, p. 367-376, 1995.

CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, New York, v. 27, p. 137-142, 1993.

CHOI, Y.J.; LAWRENCE GRIGORTEN, J.; BÉLANGER, L.; MOREL, L.; BOURQUE, D.; MASSON, L.; GROLEAU, D.; MÍGUEZ, C.B. Production of an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* by the methylotroph *Methylobacterium extorquens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 74, p. 5178-5182, 2008.

CORPE, W.A.; RHEEM, S. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 243-250, 1989.

COSTERTON, J.W. ; STEWART, P.S. ; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 184, p. 1318-1322, 1999.

DA SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 203, p. 165-171, 2001.

DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf. **Current Microbiology**, New York, p. 309-324, 1981.

DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; PEREIRA, E.O.; COLETTA-FILHO, H.D.; 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.

FAHEY, J.W.; DIMOCK, M.R.; TOMASINO, S.F.; TAYLOR, J.M.; CARISON, P.S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. London: Springer-Verlag, 1991. p. 401-411.

FERREIRA FILHO, A.S.; QUECINE, M.C.; BOGAS, A.C.; ROSSETTO, P.B.; LACAVA, P.T.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Endophytic *Methylobacterium extorquens* expressing heterologously a β -1,4-endoglucanase in *Catharanthus roseus* seedlings a plant model to CVC disease. 2010. Artigo submetido.

FIGUEIRA, M.M.; LARAMEE, L.; MURRELL, 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.

GAI, C.S.; LACAVA, P.T.; QUECINE, M.C.; AURIAC, M.C.; LOPES, J.R.S.; ARAÚJO, W.L.; MILLER, T.A.; AZEVEDO, J.L. Transmission of *Methylobacterium mesophilicum* by *Bucephalogonia xanthophis* for paratransgenic control strategy of Citrus Variegated Chlorosis. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 47, n. 4, p. 448-454, 2009.

HALLMANN, J., QUAD-THALLMANN, A., MAHAFFEE, W.F., KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895–914, 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. 197-220, 1994.

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

KOENING, R.L.; MORRIS, R.O.; POLACCO, J.C. tRNA is the source of low-level trns-zeatin production in *Methylobacterium* spp. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 184, p. 1832-1842, 2002.

KOROTKOVA, N.; CHISTOSERDOVA, L.; LIDSTROM, M.E. Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1: identification and mutation of *gap11*, *gap20*, and *phaR*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 184, p. 6174-6181, 2002.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AZEVEDO, J.L. RAPD profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 302-306, 2001.

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

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

LAMPEL, J.S.; CANTER, J.L.; DIMOCK, M.B.; KELLY, J.L.; ANDERSON, J.J.; URATANI, B.B.; FOULKE JR, J.S.; TURNER, J.T. Integrative cloning, expression and stability of the *cryA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 60, p. 501-508, 1994.

LEE, H.S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C.W.; 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 N₂-fixing methylotrophic isolates. **Biological and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 402-408, 2006.

LI, W.B.; PRIA Jr. W.D.; TEIXEIRA, D.C.; MIRANDA, V.S.; AYRES, A.J.; FRANCO, C.F.; COSTA, M.G. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus, **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p. 501-505, 2001.

LIDSTROM, M.E.; MURRELL, J.C.; DALTON, H. (Ed.). Methane and methanol utilizers. New York : Plenum, 1992. p. 183-206.

LIMA, A.O.; QUECINE, M.; FUNGARO, M.H.P.; ANDREOTE, F.; ARAÚJO, W.L.; SILVA FILHO, M.C.; PIZZIRANIKLEINER, A.; AZEVEDO, J.L. Molecular characterization of a novel beta-1,4 endoglucanase from endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Applied and Biotechnology**, Berlin, v. 68, p. 57-65, 2005.

MACHADO, M.A.; CARUSO, E.; QUAGGIO, J.A.; LAGOA, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com Clorose Variegada dos Citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, p. 53-57, 1994.

MACHADO, M.A.; SILVÉRIO, J.L.; BAPTISTA, C.R.; CRISTOFANI, M.; TEOFILO-SOBRINHO, J. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (CVC). **Laranja**, Cordeirópolis, v. 13, p. 515-531, 1992.

MADHAIYAN, M.; SURESH REDDY, B.V.; ANANDHAN, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; TONGMIN SA. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 4, p. 270-276, 2006.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SUNDARAM, S.P.; SA, T. Nodulation and plant-growth promotion by methylotrophic bacteria isolated from tropical legumes. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 164, p. 114-120, 2009.

MARX, C.J.; LIDSTROM, M.E. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. **Microbiology**, New York, v. 147, p. 414-419, 2001.

MICHELI, F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 414-419, 2001.

MILLER, T.A. Symbiotic control in agriculture and medicine. **Symbiosis**, Rehovot, v. 42, p. 67-74, 2007.

MONIER, J.M.; LINDOW, S.E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 100, p. 15977-15982, 2003.

MONTEIRO, P.B.; RENAUDIN, J.; JAGOUÉIX-EVEILARD, S.; AYRES, A.J.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 246-251, 2001.

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

NANKAI, H.; HASHIMOTO, W.; MIKI, H.; KAWAI, S.; KOUZAKU, M. Microbial system for polysaccharide depolymerization: enzymatic rout for xanthan depolymerization by *Bacillus* sp. Strain GL1. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, n. 6, p. 2520-2526, 1999.

NEMECECK-MARSHALL, M.; MACDONALD, R.C.; FRANZEN, J.J.; WOJCIECHOWSKI, C.L.; FALL, R. Methanol emission from leaves: Enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1359-1368, 1995.

NEWMAN, K.L., ALMEIDA, R.P.P., PURCELL, A.H., LINDOW, S.E. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 7319-7327, 2003.

OMER, Z.S.; TOMBOLINI, R.; BROBERG, A.; GERHARDSON, B. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 43, p. 93-96, 2004.

PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H. Evidence for noncirculate transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshoot leafhoppers. **Phytopathology**, Lancaster, v. 69, p. 393-395, 1979.

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

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

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

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

RYU, C.M.; KIM, J.; CHOI, O.; KIM, S.H.; PARK, C.S. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 282-289, 2006.

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

SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 25-29, 2007.

SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.C.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; BARROS, M.H.; BONACCORSI, E.D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J.M.; BRIONES, M.R.S.; BUENO, M.R.P.; CAMARGO, A.A.; CAMARGO, L.E.A.; CARRARO, D.M.; CARRER, H.; COLAUTO, N.B.; COLOMBO, C.; COSTA, F.F.; COSTA, M.C.R.; COSTA-NETO, C.M.; COUTINHO, L.L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EI-DORRY, H.; FACINCANI, A.P.; FERREIRA, A.J.S.; FERRERIA, V.C.A.; FERRO, J.A.; FRAGA, J.S.; FRANÇA, S.C.; FRACNO, M.C.; FROHME, M.; FURLAN, L.R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S.; GOMES, S.L.; GRUBER, A.; HO, P.L.; HOHEISE, J.D.; JUNQUEIRA, M.L.; KEMPER, E.L.; KITAJIMA, J.P.; KRIEGER, J.E.; KURAMAE, E.E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M.R.; LEITE, L.C.C.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; LOPES, S.A.; LOPES, C.R.; MACHADO, J.A.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.B.N.; MADEIRA, H.M.F.; MARINO, C.L.; MARQUES, M.V.; MARTINS, E.A.L.; MARTINS, E.M.F.; MATSUKUMA, A.Y.; MENCK, C.F.M.; MIRACCA, E.C.; MIYAKI, C.Y.; MONSTEIRO-VITORELLO, C.B.; MOON, D.H.; NAGAI, M.A.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; NETTO, L.E.S.; NHANI Jr, A.; NOBREGA, F.G.; NUNES, L.; OLIVEIRA, M.A.; de OLIVEIRA, M.C.; de OLIVEIRA, R.C.; PALMIERI, D.A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B.R.; PEREIRA, A.G.; PEREIRA Jr, H.A.; PESQUERO, J.B.; QUAGGIO, R.B.; ROBERTO, P.G.; RODRIGUES, V.; de M. ROSA, A.J.; de ROSA Jr, V.E.; de SÁ, R.G.; SANTELLI, R.V.; SAWASAKI, H.E.; da SILVA, A.C.R.; da SILVA, A.M.; da SILVA, F.R.; SILVA, W.A.; da SILVEIRA, J.F.; SILVESTRI, M.L.Z.; SIQUEIRA, W.J.; de SOUZA, A.A.; de SOUZA, A.P.; TERENCE, M.F.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; TSUHAKE, M.H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A.L.; ZAGO, M.A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J.C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, New York, v. 406, p. 151-157, 2000.

SOBRAL, J.K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 43, p. 777-780, 1982.

TOMASINO, S.F.; LEISTER, R.T.; DIMOCK, M.B.; BEACH, R.M.; KELLY, J.L. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene *cryA(c)* of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **BioControl**, Dordrecht, v. 5, p. 442-448, 1995.

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

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

VAN DIEN, S.J.; MARX, C.J.; O'BRIEN, B.N.; LIDSTROM, M.E. Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 7563-7566, 2003.

VORHOLT, J.A. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 178, p. 239-249, 2002.

4 AÇÃO DA N-ACIL-HOMOSERINA LACTONA NA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO ENTRE *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6-PLANTA HOSPEDEIRA

Resumo

Methylobacterium spp. são bactérias metilotróficas facultativas que apresentam a capacidade de utilizar metanol como fonte de carbono. Essas bactérias são frequentemente encontradas em ambientes terrestres e aquáticos, e também em associação simbiótica com as plantas, podendo beneficiá-las por meio da promoção de crescimento vegetal e/ou do controle de fitopatógenos. Isolados de *Methylobacterium* tendem a formar agregados na filosfera, facilitando a comunicação celular, cuja regulação pode ocorrer por meio do sistema *Quorum-sensing* (QS). Dessa forma, as bactérias podem coordenar mudanças adaptativas e fisiológicas na população, favorecendo sua adaptação em ambientes específicos, como durante a interação bactéria-planta. Alguns sistemas QS utilizam as N-acil-homoserina lactonas (AHLs) como moléculas sinalizadoras, comumente encontradas em bactérias Gram-negativas que vivem em associação com plantas, incluindo membros do gênero *Methylobacterium*. Dentro desse contexto, o presente trabalho avaliou, por PCR quantitativo em tempo real, a ação da (S)-N-dodecanoil-HSL sobre a expressão de genes envolvidos na interação entre *M. mesophilicum* SR1.6/6 e planta hospedeira. Para isso, foram selecionados genes envolvidos com o metabolismo metilotrófico e o estabelecimento da bactéria na planta (*mxoF*), respostas a estresse e transporte de compostos (*crtI*), vantagens adaptativas e competitivas durante a colonização da planta (*pat*), metabolismo bacteriano e modulação dos níveis hormonais na planta (*acdS*), transporte de compostos e reconhecimento (*sss*), e com patogenicidade (*phoU*). Nas condições avaliadas, foi observado que a expressão dos genes *mxoF*, *acdS* e *pat* foi ativada na presença de AHL, sugerindo a importância dessa molécula no favorecimento da interação bactéria-planta. No entanto, a presença da AHL parece não ter influência na expressão dos genes *crtI*, *sss* e *phoU*. Os resultados obtidos nesse estudo fornecem uma base para futuros estudos das funções reguladas por AHLs em *Methylobacterium* spp.

Palavras-chave: AHL; *Methylobacterium*; Interação bactéria-planta

4 N-ACYL-HOMOSERINE LACTONE ACTION ON THE GENE EXPRESSION DURING *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6-PLANT INTERACTION

Abstract

Methylobacterium spp. are methylotrophic facultative bacteria that can use methanol as source of carbon. These bacteria are commonly found in terrestrial and aquatic environments, and also in symbiotic associations with plants can be benefited by them that act promoting the plant-growth and/or controlling of phytopathogens. *Methylobacterium* isolates tend to form aggregates on the phyllosphere, facilitating cell communication, whose regulation can occurs through regulation of Quorum Sensing system (QS). Thus, the bacterial cells can coordinate physiological and adaptive changes in their population, favoring its adaptation to specific environments, such as during bacterium-plant interaction. Some QS systems use N-acyl-homoserine lactones (AHLs) as signaling molecules, commonly found in Gram-negative bacteria that living in association with plants, including members of the *Methylobacterium* genus. Within this context, this work evaluated, by quantitative real time PCR, the action of (S)-N-dodecanoil-HSL on the expression of genes related in the interaction between *M. mesophilicum* SR1.6/6-plant. For this, were selected genes related to methylotrophic metabolism and establishment in the plant (*mxoF*), stress sensed by the bacteria and transport of compounds (*crtI*), adaptive and competitive advantages during the plant colonization (*pat*), bacterial metabolism and modulation of hormone levels in the plant (*acdS*); transport of compounds and recognition (*sss*); and pathogenicity (*phoU*). Under the evaluated conditions, it was observed that *mxoF*, *acdS* and *pat* were overexpressed in the presence of AHL, suggesting the importance of this molecule during the bacteria-plant interaction. However, the AHL presence seems to have not influence on the expression of *crtI*, *sss* and *phoU* genes. These results provide a basis for future studies of the functions regulated by AHLs in *Methylobacterium* spp.

Keywords: AHL; *Methylobacterium*, Bacteria-plant interaction

4.1 Introdução

Methylobacterium spp. são bactérias Gram-negativas pertencentes à subclasse α -2 de Proteobactéria, róseas e metilotróficas facultativas, capazes de crescer sobre compostos de um carbono como metanol e metilamina (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998). Essas bactérias são ubíquas na natureza, e, frequentemente encontradas no solo, ambientes aquáticos (VAN AKEN et al., 2004) e em associação simbiótica com várias espécies vegetais (ARAÚJO et al., 2002; MADHAIYAN et al., 2009a; MADHAIYAN et al., 2009b; SENTHILKUMAR et al., 2009; SY et al., 2001). Quando em associação com as plantas, *Methylobacterium* spp. podem promover o crescimento vegetal de forma direta, possivelmente por meio da produção de fitohormônios e da fixação de nitrogênio (LEE et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2005; OMER; TOMBOLINI; GERHARDSON, 2004; SENTHILKUMAR et al., 2009; SY et al., 2001) ou indiretamente por meio da supressão de fitopatógenos (FERREIRA FILHO; ARAÚJO; KULINSKY- SOBRAL, 2001; MADHAIYAN et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2006). *Methylobacterium* spp. podem ser a população potencialmente dominante na filosfera (CORPE; RHEEM, 1989), e desde que bactérias metilotróficas tendem a formar agregados sobre as partes aéreas das plantas (SY et al., 2005), o estudo da regulação do metabolismo bacteriano por *Quorum Sensing* (QS) tem ganhado importância para o entendimento desta interação bactéria-planta.

QS é um mecanismo através do qual as bactérias são capazes de responder às mudanças na densidade populacional e coordenar o comportamento de células individuais em uma população local. Isso ocorre por meio de troca de sinais moleculares extracelulares que agem como coindutores para regular a transcrição de genes alvo, permitindo, assim, às bactérias coordenar mudanças adaptativas e fisiológicas na população de forma a beneficiá-las em um ambiente particular (BAUER; MATHESIUS, 2004; JOINT, 2006; SANCHES-CONTRERAS et al., 2007; SOTO; SANJUÁN; OLIVARES, 2006). Além de atuar sobre a expressão de genes envolvidos na interação bactéria-bactéria, QS também é importante na regulação de genes envolvidos na interação bactéria-planta (BARNARD et al., 2007; SANCHES-CONTRERAS et al., 2007; WHITE; WINANS, 2007).

Alguns sistemas QS envolvem as N-acil-homoserina lactonas (AHLs) como coindutores. Essas moléculas são comuns entre bactérias Gram-negativas que vivem em associação com plantas, e parecem ser importantes para a colonização do hospedeiro (BARNARD et al., 2007; CHA et al., 1998; CAMILLI; BASSLER, 2006; LOH et al., 2002; SANCHES-CONTRERAS et al., 2007; WHITE; WINANS, 2007). Além disso, estudos mostram que AHLs podem elicitar uma diversidade de respostas na planta, incluindo respostas de defesa, hormonais e ativação da regulação gênica (BAUER; MATHESIUS, 2004).

A presença de AHLs tem sido descrita para membros do gênero *Methylobacterium*. Penálver et al. (2006) identificaram em *M. extorquens* AM1 a presença de dois sistemas QS e a produção de um novo tipo de AHL contendo uma cadeia acil com ligações duplas insaturadas. Poonguzhali, Madhaiyan e Sa (2007) caracterizaram a produção de AHLs por *Methylobacterium* spp. isoladas de água potável, solo e arroz. Recentemente, Pomini et al. (2009) realizaram um estudo químico das AHLs produzidas por *M. mesophilicum* SR1.6/6, endófito de citros (ARAÚJO et al., 2002). As configurações absolutas de 6 AHLs foram determinadas e duas delas, (S)-N-(2E,7Z)-tetradecanoil-HSL e (S)-N-(2E)-dodecanoil-HSL, foram sintetizadas pela primeira vez. Os autores também realizaram estudos relacionados aos efeitos das AHLs sintéticas sobre bactérias endofíticas Gram-positivas co-isoladas de citros com *M. mesophilicum* SR1.6/6, e verificaram que essas moléculas parecem não estar associadas com competição antimicrobiana e, conseqüentemente, com a prevalência de *M. mesophilicum* SR1.6/6 sobre as demais bactérias em citros. Os autores ainda buscam entender os efeitos dessas AHLs sobre a expressão de genes em *X. fastidiosa*. Nesse sentido, vários outros trabalhos têm sido realizados. Estudos de microarranjo com *Pseudomonas aeruginosa*, defectiva para a produção de AHL, mostraram que 616 genes nessa espécie tiveram sua expressão afetada com a adição da molécula, sendo 222 genes reprimidos (WAGNER et al; 2003). Análises proteômicas com *Sinorhizobium meliloti* revelaram que a presença de AHLs exógenas na cultura afetou os níveis de proteínas expressas (CHEN et al., 2003). Schwartz et al. (2007) mostraram por qPCR, que alguns genes foram positivamente regulados no biofilme maduro produzido por *P. aeruginosa* na presença de AHLs.

Em *Methylobacterium*, embora vários trabalhos mostrem a importância da sua associação com as plantas (LEE et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2009a; MADHAIYAN et al., 2009b; PIRTTILA et al., 2000; SY et al., 2001), pouco se conhece sobre a atuação das AHLs na expressão dos genes envolvidos nessa interação. Estudos mostram que a produção de biofilme parece ser dependente da produção de AHLs (PENÁLVER et al., 2006), e que a sua formação sobre a planta pode ser a primeira etapa para a colonização endofítica por *Methylobacterium* (ANDREOTE et al., 2006). No entanto, muitos aspectos dessa e outras relações ainda devem ser entendidos.

A maioria dos trabalhos que buscam uma melhor compreensão para o processo de interação bactéria-planta avalia genes diferencialmente expressos na planta em resposta a um microrganismo patogênico (BOGACKI; OLDACH; WILLIAMS, 2008; WANG et al., 2010). Sendo assim, também ainda pouco se conhece sobre a diferença na expressão dos genes da bactéria durante a sua interação com a planta. Neste contexto, Dourado (2010) avaliou a expressão de genes envolvidos na interação entre *M. mesophilicum* SR1.6/6-planta. A autora verificou que a ativação de alguns genes nessa linhagem aumentou sua adaptação à planta, favorecendo a interação. Em contrapartida, a bactéria reprimiu genes associados ao estresse e não expressou genes associados à patogenicidade, mostrando que a sua interação com a planta parece não gerar estresse para ambas as partes envolvidas.

Visando mais informações a cerca da diferença na expressão dos genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por qPCR, o efeito da (S)-N-dodecanoil-HSL sobre a expressão dos genes *mxoF*, *acdS*, *crtI*, *pat*, *sss* e *phoU*, envolvidos na interação da bactéria com a planta.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Linhagem bacteriana, cultivo e tratamento

M. mesophilicum SR1.6/6 (ARAÚJO et al., 2002) foi a linhagem utilizada para os estudos de expressão gênica. A AHL usada como tratamento nos ensaios, (S)-N-dodecanoil-HSL, foi purificada a partir dessa mesma linhagem e sintetizada no Instituto de Química da Unicamp pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Anita J. Marsaioli (POMINI et al., 2009)

Para minimizar os níveis de AHL endógena, inicialmente a bactéria foi cultivada em 25 mL de meio CHOI3 (28° C, 180 rpm) até uma D.O.₆₀₀ de 0.5. As células foram coletadas, lavadas em tampão PBS, inoculadas em 50 mL de CHOI3 e cultivadas novamente até a D.O.₆₀₀ de 0.5. Prosseguindo-se como anteriormente, as células foram coletadas, lavadas e finalmente transferidas para 100 mL de CHOI3. Nesse ponto, foi adicionada a AHL (0,1 µg/mL). As culturas tratadas foram incubadas até a transição da fase log para a fase estacionária (18 horas). Culturas controle também foram preparadas e cultivadas sob as mesmas condições. O experimento foi realizado em três repetições biológicas.

4.2.1.2 Extração de RNA total

O RNA foi extraído na transição da fase log para a estacionária. O protocolo de extração seguido foi o da Invitrogen (TRIzol[®], Invitrogen), com algumas modificações.

A cultura bacteriana foi centrifugada (15 minutos, 6000 g, 4°C) e as células ressuspendidas em 500 µl de tampão TE (TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Em seguida, 200 µl de SDS 10% e sílica foram adicionados, prosseguindo a lise celular com agitação em *bead beater* e incubação a 64°C por 2 minutos. Então, 1 mL do reagente TRIzol[®] foi adicionado e nova centrifugação realizada (15 minutos, 12000 g, 4°C). O sobrenadante coletado foi transferido para novos tubos de microcentrifuga e 200 µl de clorofórmio foram adicionados. As amostras foram novamente centrifugadas (15 minutos, 12000 g, 4°C) e a fase aquosa transferida para novos tubos de microcentrifuga, já contendo o mesmo volume de isopropanol absoluto gelado. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores e o pellet formado lavado uma vez com etanol gelado 75%. Após seco, o RNA foi ressuspendido em 30 µl de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) e estocado a -80°C.

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 de gel). Antes da corrida, o gel foi equilibrado por 30 minutos em tampão FA 1X. Para aplicação no gel, 2 µg de RNA, adicionados de 6 µl de Loading buffer 5X, foram aquecidos a 65°C por 5 minutos. Como marcador molecular foi utilizado Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Após a eletroforese o gel foi visualizado em transluminador com luz UV e fotodocumentado. O RNA também foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 a 260 nm.

4.2.1.3 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada por meio do kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total (1 µg) foi transcrito reversamente em cDNA utilizando-se primers hexâmeros randômicos e 200 U SuperscriptII RNase H-transcriptase reversa, de acordo com metodologia recomendada pelo fabricante.

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

Para confirmar a síntese correta do cDNA, foi realizada uma reação de PCR com primers específicos para a linhagem SR1.6/6. Os primers utilizados MMC1 (5' – AGTGCATGAAGGCGGAATCGC – 3') e MMC2 (5' - GCG AAAGCCTGATGCAGCAAC – 3') amplificam um fragmento de 390 pb do gene 16S rRNA para essa linhagem (LACAVA et al., 2006). A reação de PCR (50 µg de DNA, 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,1 µM de cada primer, 0,1U/µL de Taq DNA Polimerase) foi realizada em um volume final de 25 µL. Após a amplificação, os produtos da PCR foram avaliados em eletroforese em gel de agarose 1,2%.

4.2.1.5 Avaliação da expressão de genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os primers utilizados para avaliar a expressão dos genes envolvidos na interação bactéria-planta, assim como aquele usado como controle endógeno, foram desenhados com base no alinhamento de sequências dos genes de interesse presentes nos seis genomas de *Methylobacterium* disponíveis no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (DOURADO, 2010). Os primers, assim como suas características estão listados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Primers utilizados para análise em qPCR

Primers	Gene alvo	Sequência	Tamanho do fragmento	Referência
MxaFqPCRAF	<i>mxoF</i>	5'-CGTCAACGTCATGATGCT(C/G)T-3'	250pb	Dourado (2010)
MxaFqPCRAR		5'- GATGTCCTTGGCGAG(A/G)TG - 3'		Dourado (2010)
ACC Met1 f	<i>acdS</i>	5'- GACCGGGTCGGCAACATC - 3'	200pb	Dourado (2010)
ACC Met2 r		5'- AGCCCGCCGTACTTGTGC - 3'		Dourado (2010)
PatatinF	<i>pat</i>	5'-CTTCAACGCCAACCTGATG - 3'	250pb	Dourado (2010)
PatatinR		5'- CCGATCCGCTCGTAGTTCT - 3'		Dourado (2010)
PhyF	<i>crtI</i>	5'- AATACTTCAAGCCGGTGCTG - 3'	186pb	Dourado (2010)
PhyR		5'- GACATGCCGAGGTACTTGGT - 3'		Dourado (2010)
sssF	<i>sss</i>	5'- ATCGACGCCCTGTACAATTC - 3'	221pb	Dourado (2010)
sssR		5'- ACCGTGCGGTAGTTCGAC - 3'		Dourado (2010)
phoUF	<i>phoU</i>	5'- TTCGACGGGCTGATCTACTC - 3'	189pb	Dourado (2010)
phoUR		5'- GATCAGGTAGAAGGCCACCA - 3'		Dourado (2010)
RecAF	<i>recA</i>	5' - CGAACTGCATGGTC(G)ATCTTC -3'	232pb	Dourado (2010)
RecAR		5' - ATGTGGAAGTCGACCTGCTT - 3'		Dourado (2010)

A reação de amplificação por qPCR foi conduzida em termociclador iQTM5 (Bio-Rad) programado para uma desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°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 desde 60 até 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, 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, no caso *recA*, segundo o método matemático de Pfaffl (PFAFFL, 2001), 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* (C_t) de uma amostra desconhecida versus um controle, e é expresso em relação a um gene referência, de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Razão (RER)} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref.}})^{\Delta CP_{\text{ref.}} (\text{controle} - \text{amostra})}}$$

4.3 Resultados e Discussão

Muitas bactérias usam AHLs como sinais moleculares para coordenar o comportamento de células individuais em uma população local, e o sucesso da colonização da planta hospedeira parece depender da produção dessas moléculas (BAUER; MATHESIUS, 2004; JOINT, 2006; SOTO; SANJUÁN; OLIVARES, 2006; SANCHES-CONTRERAS et al., 2007). Assim, as AHLs são importantes não apenas na interação entre bactérias, mas também na interação bactéria-planta (BARNARD et al., 2007; SANCHES-CONTRERAS et al., 2007; WHITE; WINANS, 2007).

A presença de AHLs tem sido relatada dentro do gênero *Methylobacterium* (PENÁLVER et al., 2006; POMINI et al., 2009; POONGUZHALI; MADHAIYAN; SA, 2007), mas faltam informações quanto à atuação dessas moléculas sobre a regulação gênica na interação bactéria-planta. Assim, no presente estudo foi avaliado o efeito da (S)-N-dodecanoil-HSL de *M. mesophilicum* SR1.6/6 sobre a expressão dos genes *mxoF*, *acdS*, *crtI*, *pat*, *sss* e *phoU*, os quais estão envolvidos na interação dessa bactéria com a planta. Dourado (2010) avaliou os mesmos genes, verificando diferenças na expressão durante a interação entre *M. mesophilicum* SR1.6/6 com a planta hospedeira. Neste trabalho, as análises de qPCR também mostraram diferenças na expressão dos genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 quando esta linhagem foi cultivada na presença da (S)-N-dodecanoil-HSL (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Influência da (S)-N-dodecanoil-HSL sobre a expressão dos genes *mxoF*, *acdS*, *crtI*, *pat*, *sss* e *phoU* em *M. mesophilicum* SR1.6/6. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *recA*; as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas

A expressão do gene *mxoF* foi ativada na presença da AHL, apresentando variação significativa com relação ao controle (Figura 4.1). A principal característica dos membros do gênero *Methylobacterium* é a habilidade de oxidar metanol, uma propriedade baseada na presença da enzima metanol desidrogenase (MDH) (ANTHONY; GHOSH; BLAKEI, 1994). O gene *mxoF* faz parte do *cluster* gênico envolvido no metabolismo metilotrófico, e codifica para a subunidade α da MDH (ANDERSON et al., 1990; NUNN; DAY; ANTHONY, 1989). Na presença de metanol, o

promotor *Pmx_AF* é ativado e os genes do *cluster mx_A* envolvidos na sua metabolização são transcritos na bactéria (ZHANG; LIDSTROM, 2003). Estudos têm sugerido que o sucesso do estabelecimento de *Methylobacterium* na filosfera é devido à habilidade dessas bactérias em utilizar o metanol como fonte de carbono (CORPE; RHEEM, 1989). É assumido que o metanol emitido pelas folhas das plantas é produzido principalmente como um sub-produto do metabolismo da pectina durante a síntese da parede celular (McDONALD; FALL, 1993; NEMECEK-MARSHALL et al., 1995), e parece ser primariamente emitido através dos estômatos (NEMECEK-MARSHALL et al., 1995). Dessa forma, tem sido sugerido que *Methylobacterium* spp. são capazes de metabolizar o metanol emitido pelos estômatos das folhas durante a interação com a planta e utilizá-lo como fonte de energia para seu crescimento (LIDSTROM; CHISTOSERDOVA, 2003; NEMECEK-MARSHALL et al., 1995). Alguns estudos ainda sugerem que o metabolismo metilotrófico possa conferir vantagem à bactéria durante a colonização da filosfera em condições competitivas (SY et al., 2001), podendo ser ativado durante a simbiose (JOURAND et al., 2005). Durante a colonização das partes aéreas da planta ocorre a comunicação entre células bacterianas, a qual pode ser mediada por AHLs. Estas atuam como coindutores regulando a transcrição de genes alvos, possibilitando à população bacteriana uma melhor adaptação ao ambiente (BAUER; MATHESIU, 2004; JOINT, 2006; SANCHES-CONTRERAS et al., 2007; SOTO; SANJUÁN; OLIVARES, 2006). Conforme verificado neste estudo, a presença da AHL ativou a expressão do gene *mx_AF* em *M. mesophilicum* SR1.6/6. Este resultado reforça a idéia de que essa molécula regula a expressão de genes importantes à bactéria, de modo que esta consiga utilizar o metanol emitido pelas folhas como fonte de energia para seu crescimento, estabelecendo uma melhor interação com a planta hospedeira.

A expressão do gene *acdS* também foi ativada na presença da AHL, apresentando diferença significativa em relação ao controle (Figura 4.1). A presença desse gene em bactérias está relacionada à produção da ACC deaminase, que cliva o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) liberando amônia e alfa-cetobutirato para seu metabolismo. Como o ACC é precursor do etileno, sua hidrólise pela bactéria modula os níveis desse hormônio na planta (HARDOIM; OVERBEECK; VAN ELSAS,

2008). O etileno é um importante hormônio que pode gerar efeitos positivos ou negativos sobre o crescimento e desenvolvimento da planta, e está envolvido nas respostas da planta a doenças e a estresses abióticos, e também na interação bactéria-planta (HARDOIM; OVERBEECK; VAN ELSAS, 2008). A presença da ACC deaminase produzida pela bactéria reduz o estresse da planta causado pelo acúmulo de etileno que ocorre em resposta a situações ambientais adversas, promovendo o crescimento vegetal e a germinação de sementes em plantas sensíveis ao fitohormônio (GLICK et al., 2007). A redução nos níveis de etileno também leva a um equilíbrio com os níveis de AIA, estimulando a proliferação e alongação celular sem os efeitos negativos do etileno quando este está em altos níveis (GLICK et al., 2007). Assim, as bactérias com alta atividade de ACC deaminase tendem a ser selecionadas pela planta hospedeira a favor de seu benefício. Em contrapartida, as bactérias selecionadas também se beneficiam, encontrando na planta proteção e nutrientes disponíveis para a sua sobrevivência. O equilíbrio entre a produção de AIA e etileno parece ser de fundamental importância para a manutenção da bactéria no interior da planta hospedeira (HARDOIM; OVERBEECK; VAN ELSAS, 2008). Recentemente, a presença de ACC deaminase foi relatada em *Methylobacterium*. Madhaiyan et al. (2006) demonstraram que a presença de ACC deaminase em *Methylobacterium* está envolvida na redução dos níveis de etileno e promoção de alongação das raízes em canola, além de beneficiar a própria bactéria, que utiliza ACC como fonte de nitrogênio para o seu metabolismo. Chinnadurai, Balachandar e Sudaram (2009) mostraram que a pulverização de arroz e tomate com isolados de *Methylobacterium* positivos para a produção de ACC deaminase, aumentou o comprimento das raízes e da parte aérea das plantas, e reduziu o nível de etileno em 60-80% nessas espécies. Nesse sentido, a ativação da expressão do gene *acdS* em *M. mesophilicum* SR1.6/6 na presença da AHL parece ser importante para o metabolismo e sobrevivência da bactéria e também para a modulação dos níveis hormonais na planta, promovendo uma melhor interação, de modo que ambos sejam favorecidos. Talvez isso também possa ser uma explicação para os resultados positivos de *M. mesophilicum* SR1.6/6 sobre a promoção de crescimento de citros verificada no Capítulo 2.

O gene *pat* também foi ativado na presença da AHL, com diferença significativa em relação ao controle (Figura 4.1). Esse gene faz parte da família gênica Patatin, cuja função é a síntese de fosfolipases que atuam na hidrólise dos fosfolipídios da membrana da planta hospedeira facilitando a colonização bacteriana (BANERJI; AURASS; FLIEGER, 2008). Os genes da família Patatin podem ser encontrados em grande número em bactérias patogênicas e simbioses, conferindo-lhes vantagens durante a interação com a planta, na adaptação a diferentes ambientes, além de vantagens competitivas sobre outros microrganismos (BANERJI; AURASS; FLIEGER, 2008; BANERJI; FLIEGER, 2004; KOUCHI et al., 2004). Dourado (2010) não observou alteração na expressão do gene *pat* em *M. mesophilicum* SR1.6/6 durante a sua com a planta hospedeira. Assim, a autora sugere que esta linhagem não apresentou, nas condições avaliadas, atividade lipolítica como ocorre em patógenos, colonizando o interior do hospedeiro sem lhe causar danos. Neste estudo, a expressão do gene *pat* foi ativada em *M. mesophilicum* SR1.6/6 na presença da AHL. Uma vez que isso não foi verificado na interação bactéria-planta (DOURADO, 2010), é possível sugerir que a ativação desse gene pode ocorrer dependendo das condições em que a bactéria se encontra. Essa ativação poderia, assim, ocorrer de modo a conferir ao microrganismo uma melhor adaptação a um determinado ambiente (BANERJI; AURASS; FLIEGER, 2008; BANERJI; FLIEGER, 2004) e não necessariamente para lhe conferir patogenicidade, como verificado para fitobactérias que utilizam o produto do gene *pat* durante o processo de patogênese.

Nas condições avaliadas, a expressão do gene *crtl* não apresentou diferenças significativas em relação ao controle na presença da AHL (Figura 4.1). O gene *crtl* codifica para a enzima fitoeno desidrogenase, precursora do licopeno. Este é responsável pela biossíntese de carotenóides, importantes na proteção bacteriana contra danos oxidativos causados por estresses ambientais como radiação e dissecação (SANDMANN, 2009; XU et al., 2007). Como se sabe, os membros do gênero *Methylobacterium* são abundantes na superfície das folhas (CORPE; RHEEM, 1989), sendo essa proteção de grande importância para a sobrevivência do microrganismo. Em *M. extorquens* AM1, uma fitoena desnaturase é conhecida por ser essencial para a pigmentação da bactéria, sendo importante em várias condições de

estresse (GOURION; FRANCEZ-CHARLOT; VORHOLT, 2008). O fato da expressão do gene *crtl* não ter sido se alterada na presença da AHL nas condições avaliadas, sugere que a ativação desse gene talvez só ocorreria sob condições adversas para autoproteção do microrganismo, favorecendo sua permanência na planta.

Similarmente ao observado para *crtl*, os genes *phoU* e *sss* não tiveram sua expressão alterada na presença da AHL quando comparados ao controle (Figura 4.1). O gene *phoU* é um dos genes do operon *Pho*. Este tem como componente chave o sistema Pst, cuja função é realizar a captura do fosfato inorgânico periplasmático e transportá-lo para dentro do citosol (CHENG et al., 2009; LAMARCHE et al., 2008). Além disso, *phoU* está relacionado à resistência da bactéria a antibióticos e estresses (GRISTWOOD et al., 2009; LI; ZHANG, 2007), aderência e, em alguns casos, também contribui para a virulência bacteriana (CHENG et al., 2009). O fato da expressão de *phoU* não ter sido alterada em *M. mesophilicum* 1.6/6 na presença da AHL nas condições em que o experimento foi realizado, sugere que a ativação desse gene só ocorreria numa situação na qual a bactéria teria que se proteger contra condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento e colonização. A AHL também parece não ser importante para a ativação do transporte de fosfato por esse gene, assim como parece não estar envolvida com aderência e virulência em *M. mesophilicum* SR1.6/6.

O gene *sss* está associado ao transporte simpórtico de solutos (açúcares, aminoácidos, vitaminas, ânions) juntamente com o sódio, e também está relacionado com reconhecimento de composto no ambiente (LOLKEMA; SLOTBOOM, 2008; SCIER, 1998; SEVERI et al., 2010). Conforme verificado nos resultados obtidos, a não ativação de *sss* pela AHL sugere que essa molécula não deva ter um papel relevante sobre a expressão desse gene em *M. mesophilicum* 1.6/6, não interferindo, dessa forma, nesse sistema de transporte bacteriano.

De modo geral, nas condições avaliadas, a (S)-N-dodecanoil-HSL de *M. mesophilicum* SR1.6/6 parece ser importante para ativação de alguns genes na interação entre essa bactéria e a planta hospedeira. Possivelmente, a presença dessa AHL favoreça o estabelecimento da bactéria em situações ambientais adversas, aumentando sua adaptabilidade, permitindo-lhe também beneficiar seu hospedeiro. É importante ressaltar que a concentração das AHLs, bem com a estrutura da molécula,

tempo de exposição do microrganismo ao tratamento, e fase de crescimento, são importantes para ativar, reprimir ou gerar efeitos nulos sobre a expressão de determinados genes. Cheng et al. (2003) ao testarem em uma análise proteômica o efeito de duas AHLs de diferentes estruturas, concentrações, e em diferentes tempos de exposição em culturas de *S. meliloti*, verificaram diferenças no padrão de expressão das proteínas presentes na bactéria. No presente trabalho, apenas uma das 5 AHLs produzidas por *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi testada e, portanto, não se sabe se ocorre interação entre estas AHLs na modulação da expressão dos genes avaliados. Os resultados obtidos nesse estudo fornecem, assim, uma base para futuros estudos das funções reguladas por AHLs em *Methylobacterium* spp., e, conseqüentemente, uma melhor compreensão da sua interação com a planta hospedeira.

Referências

- ANDERSON, D.J.; MORRIS, C.J.; NUNN, D.N.; ANTHONY, C.; LIDSTROM, M.E. Nucleotide sequence of the *Methylobacterium extorquens* AM1 *moxF* and *moxJ* genes involved in methanol oxidation. *Gene* 90. In: ANTHONY, C. **The Biochemistry of Methylootrophs**, London, v. 31, p. 173-176, 1990.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.
- ANTHONY, C.; GHOSH, M.; BLAKEI, C.C.F. The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrroloquinoline quinone. **Biochemical Journal**, London, v. 304, p. 665-674, 1994.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **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.

BARNARD, A.M.L.; BOWDOWN, S.D.; BURR, T.; COULTHURST, S.J.; MONSON, R.E.; SALMOND, G.P.C. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. **Philosophical Transactions the Royal Society B**, London, v. 362, p. 1165-1183, 2007.

BAUER, W.D.; MATHESIU, U. Plant responses to bacterial quorum sensing signals. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 429-433, 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. 645-660, 2008.

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

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

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, 2009.

CHEN, H.; TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J.B.; ROLFE, B.G.; BAUER, W.D. Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to *N*-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 185, p. 5029-5036, 2003.

CHINNADURAI, C.; BALACHANDAR, D.; SUNDARAM, S.P. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producing methylobacteria from phyllosphere of rice and their role in ethylene regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1403-1411, 2009.

CORPE, W.A.; RHEEM, S. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 243-250, 1989.

DOURADO, M.N. **Ecologia de Methylobacterium spp.** 2010. 132 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

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.

GOURION, B.; FRANCEZ-CHARLOT, A.; VORHOLT, J.A. PhyR is Involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens* AM1. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 3, p. 1027-1035, 2008.

GRISTWOOD, T.; FINERAN, P.C.; EVERSON, L.; WILLIAMSON, N.R.; SALMOND, G.P. The PhoBR two-component system antibiotics biosynthesis in *Serratia* in response to phosphate. **BioMed Central Microbiology**, London, v. 2, p. 80-112, 2009.

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**, Amsterdam, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

JOINT, I. Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping. A NERC Discussion Meeting held at the Royal Society on 7 December 2005. **Journal of Royal Society Interface**, London, v. 3, p. 459-463, 2006.

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.

KOUCHI, H.; SHIMOMUR, K.; HATA, S.; HIROTA, A.; WU, G.J.; KUMAGAI, H.; TAJIMA, S.; SUGANUMA, N.; SUZUKI, A.; AOKI, T.; HAYASHI, M.; YOKOYAMA, T.; OHYAMA, T.; ASAMIZU, E.; KUWTA, C.; SHIBATA, D.; TABATA, S. Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. **DNA Research**, Tokyo, v. 11, p. 263-274, 2004.

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

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

LEE, H.S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C.W.; 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 N₂-fixing methylotrophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 402-408, 2006.

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

LIDSTROM, M.E.; CHISTOSERDOVA, L. Plants in the Pink: Cytokinin production by *Methylobacterium*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 184, p. 1818, 2003.

LOH, J.; CARLSON, R.W.; YORK, W.S.; STACEY, G. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. **PNAS**, Washington, v. 99, p. 144 – 146, 2002.

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

MAcDONALD, R.C.; FALL, R. Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere. **Atmospheric Environment Part A. General Topics**, Oxford, v. 27, p. 1709-1713, 1993.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H.Y.; YANG, J.C.; SUNDARAM, S.; SA, T.M. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar C0-47 (*Oryza sativa*L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 45, n. 4, p. 315-324, 2004.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H.S.; SUANDARAM, S.P. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 41, n. 5, p. 350-358, 2005.

MADHAIYAN, M.; SURESH REDDY, B.V.; ANANDHAN, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; TONGMIN SA. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 4, p. 270-276, 2006.

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**, República da Coréia, v. 59, p. 22-27, 2009a.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SUNDARAM, S.P.; SA, T. Nodulation and plant-growth promotion by methylotrophic bacteria isolated from tropical legumes. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 164, p. 114-120, 2009b.

NEMECECK-MARSHALL, M.; MACDONALD, R.C.; FRANZEN, J.J.; WOJCIECHOWSKI, C.L.; FALL, R. Methanol emission from leaves: Enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1359-1368, 1995.

NUNN, D.N.; DAY, D.; ANTHONY, C. The second subunit of methanol dehydrogenase of *Methylobacterium extorquens* AM1. **Biochemical Journal**, London, v. 260, p. 857-862, 1989.

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

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

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.

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

POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; SA, T. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals is widespread in gram-negative *Methylobacterium*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, p. 226-233, 2007.

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, n. 12. p. 2130-2134, 2009.

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.

SANCHES-CONTRERAS, M.; BAUER, W.D.; GAO, M.; ROBINSON, J.B.; DOWNIE, A. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, London, v. 362, p. 1149-1163, 2007.

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.

SCHWARTZ, T.; WALTER, S.; MARTEN, S.M.; KIRSCHHOFFER, F.; NUSSER, M.; OBST, U. Use of quantitative real-time RT-PCR to analyse the expression of some quorum-sensing regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, p. 513-521, 2007.

SCIAR, M.H. Proposed independent evolution of different channel and carrier families. In: POOLE, R.K. (Ed.). **Advanced in microbial physiology**. London: Academic press, 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, v. 304, p. 47-54, 2010.

SENTHILKUMAR, M.; MADHAIYAN, M.; SUNDARAM, S.P.; KANNAIYAN, S. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 164, p. 92-104, 2009.

SOTO, M.J.; SANJUÁN, J.; OLIVARES, J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. **Microbiology**, New York, v. 152, p. 3167–3174, 2006.

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

SY, A.; TIMMERS, A.C.J.; KNIEF, C.; VORHOLT, J.A. Methylo-trophic metabolism is advantageous or *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 *mx* mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 166, p. 1-7, 1998.

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 methylo-trophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p.1191-1196, 2004.

WAGNER, V.E.; BUSHNELL, D.; PASSADOR, L.; BROOKS, A.I.; IGLEWSKI, B.H. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 185, p. 2080-2095, 2003.

WANG, X.; LIU, W.; CHEN, X.; TANG, C.; DONG, Y.; 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.

WHITE, E.W.; WINANS, S.C. Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. **Philosophical Transactions the Royal Society B**, London, v. 362, p. 1135-1148, 2007.

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. 1652-1652, 2007.

ZHANG, M.; LIDSTROM, M.E. Promoters and transcripts for genes involved in methanol oxidation in *Methylobacterium extorquens* AM1. **Microbiology**, New York, v. 149, p. 1033-1040, 2003.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O entendimento das interações bactéria-planta é um grande desafio, e muito ainda se tem para explorar e conhecer sobre os mecanismos envolvidos nas interações, sejam de mutualismo ou de patogenicidade.

Bactérias endofíticas têm sido encontradas associadas a todas as espécies vegetais estudadas até o momento, podendo contribuir para o desenvolvimento da planta através da promoção do crescimento e/ou do controle de fitopatógenos e pragas. Dentre estas, estão presentes membros do gênero *Methylobacterium*, os quais têm despertado interesse em função do potencial biotecnológico e agrônômico que possuem. Por apresentarem importante associação com citros e ocuparem o mesmo nicho que *X. fastidiosa* nessa cultura, *Methylobacterium* spp. despertam interesse no que diz respeito à sua aplicação na citricultura, visto que esta é uma importante atividade agrícola para o país. Dessa forma, o estudo da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros, se torna de grande importância do ponto de vista agrônômico.

No presente trabalho foi observado que *Methylobacterium* spp. de diferentes hospedeiros podem promover o crescimento de duas variedades de porta-enxerto de citros em condições comerciais, a partir de duas metodologias de inoculação. Quando foi utilizada a metodologia de bacterização de sementes, foi observado que as respostas sobre a germinação e sobre o desenvolvimento das plântulas parecem ter variado em função da especificidade da interação entre a bactéria e a variedade de porta-enxerto utilizada. Foi verificado que as linhagens provenientes de citros foram aquelas que geraram melhores resultados sobre o desenvolvimento das mudas. Quando as bactérias foram aplicadas diretamente no substrato, os efeitos positivos sobre o crescimento das mudas foram mais rápidos e parece ter ocorrido uma melhor interação entre bactéria-planta, inclusive entre uma linhagem proveniente de outro nicho. A promoção de crescimento observada deve ter sido mediada pela produção de AIA e pela fixação biológica de nitrogênio por *Methylobacterium* spp. Com relação à origem dessas bactérias, é sugerido que possivelmente são transmitidas horizontalmente em plantas cítricas. Os resultados obtidos mostraram que

Methylobacterium spp. têm potencial para serem empregadas comercialmente na produção de plantas cítricas, visando melhorar a produtividade das mudas e reduzir seu tempo de saída para o mercado. Além disso, esse estudo reforça a importância de se realizar uma seleção de microrganismos, bem como escolher o melhor método de aplicá-los num programa de melhoramento vegetal.

Foi observado também que *M. extorquens* AR1.6/2 expressando uma endoglicanase A (EglA) foi capaz de colonizar a planta hospedeira mesmo quando co-inoculada com *X. fastidiosa*. Dessa forma, tendo em vista que o sistema de transformação utilizado gerou resultados satisfatórios, existe a possibilidade da obtenção de novas linhagens de *Methylobacterium* por meio da manipulação genética, visando o aumento da produção de compostos de interesse para aplicação agrícola e também biotecnológico.

Ainda buscando entender os mecanismos pelos quais *Methylobacterium* spp. interagem com a planta hospedeira, foi observado que a expressão dos genes *mxoF*, *acdS*, *crtI*, *pat*, *sss* e *phoU* de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi aumentada ou não se alterou na presença de uma (S)-N-dodecanoil-HSL. Neste contexto, foi observado que, nas condições avaliadas, a presença da AHL parece ser importante para a ativação dos genes *mxoF*, relacionado ao metabolismo metilotrófico e estabelecimento da bactéria na planta; *pat*, que parece conferir vantagens adaptativas e competitivas durante a colonização da planta; e do gene *acdS*, importante para o metabolismo bacteriano e para modular os níveis hormonais na planta, de modo que esta possa ser beneficiada através da promoção do crescimento vegetal. Conforme verificado no Capítulo 2, *M. mesophilicum* SR1.6/6 promoveu o crescimento de citros e, assim, é possível sugerir que este efeito benéfico sobre a planta possa estar associado à ativação do gene *acdS* nessa linhagem. A expressão dos genes *crtI*, *phoU* e *sss* não foi alterada pela AHL nas condições avaliadas, sugerindo que essa molécula parece não ter um papel relevante para a função desses genes durante a interação da bactéria com a planta. Os resultados obtidos abrem perspectivas para mais estudos sobre as funções reguladas por AHLs em *Methylobacterium* spp..

Como verificado, ainda há muito para se entender sobre as interações bactéria-planta. Nesse aspecto, os dados gerados no presente trabalho vêm contribuir para a

geração de novas informações, abrindo caminhos para outras investigações sobre os mecanismos envolvidos na interação *Methylobacterium*-planta, colaborando para futuras aplicações práticas dessas bactérias na agricultura, visto que possuem potencial para este fim. Com relação à citricultura, os resultados obtidos neste estudo abrem boas perspectivas da aplicação de *Methylobacterium* spp. no controle biológico de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal, contribuindo, assim, para melhorar a qualidade e a sanidade das mudas cítricas.