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

**Análises genômica e transcriptômica de *Methylobacterium
mesophilicum* SR1.6/6 em interação com a planta hospedeira**

Francisco Dini Andreote

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

**Piracicaba
2011**

**Francisco Dini Andreote
Engenheiro Agrônomo**

**Análises genômica e transcriptômica de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6
em interação com a planta hospedeira**

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

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

**Piracicaba
2011**

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

Dini-Andreote, Francisco

Análises genômica e transcriptômica de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 em interação com a planta hospedeira / Dini-Andreote, Francisco. - - Piracicaba, 2011.
80p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.
Bibliografia.

1. Bactérias gram-negativas 2. Biofilmes 3. Expressão gênica 4. Genes 5. Plantas hospedeiras 6. Sequenciamento genético I. Título

CDD 632.32
D585a

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

*Aos meus pais, Fernando e
Fátima, pela educação e por todo
amor e apoio concedido em todas
as fases da minha vida*

DEDICO

*Aos meus irmãos Fernando e Ana
Paula, por estarem sempre ao meu lado
e dividirem comigo todos os meus momentos*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Este é o momento de expressar sinceros agradecimentos a todos familiares e amigos – os quais foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho, e me mostraram que as críticas são sementes que nos fortalece, tornando-nos profissionais mais competentes.

Desta maneira, após sete anos de história no laboratório de genética de microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” (ESALQ/USP), deixo aqui meu agradecimento a todas as pessoas e agências de fomento, as quais foram de grande valia em minha formação profissional e contribuíram enormemente para a conclusão desta etapa da minha vida. Meus sinceros agradecimentos:

À CAPES e FAPESP pelas concessões de bolsa de mestrado e financiamento do material de pesquisa, respectivamente;

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo, meu orientador, por todo apoio, ensinamento e confiança depositada em mim durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores Dr. João Lúcio de Azevedo, Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner e Dra. Claudia Monteiro de Barros Vitorello por todo apoio e amizade;

Ao meu irmão Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, por todo ensinamento, amor e conversas científicas, as quais me guiaram até o presente momento e me ajudarão sempre durante minha vida científica;

Ao Dr. Jan Dirk van Elsas e a todos os amigos e funcionários da Universidade de Groningen na Holanda;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP;

A todos os colegas de trabalho que passaram pelo laboratório de genética de microrganismos: Ademir Durrer, Aldo Procópio, Alessandro Riffel, Aline S. Romão, Ana Paula Pallu, Anderson Ferreira, Andrea Bogas, Armando Dias, Carlos Ivan Aguilar, Claudia Gai, Cristiane C. Fasanella,

Cristina S. Maki, Danice Luvizotto, Fernanda Sebastianes, Joelma Marcon, José Antonio da Silva, Laura Assumpção, Léia Fávaro, Manuella Dourado, Maria Beatriz Calderan, Maria Carolina Quecine, Marise Suziki, Michele Silva, Paulo T. Lacava, Priscilla Rossetto, Renata Assis, Ricardo Yara, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Uira Belmonte e Viviane Colombari;

Ao pessoal do laboratório da Universidade de Mogi das Cruzes, professores Luiz Nunes e Regina, e alunos Aline, Almir, Carol, Daiane, Deibs, Emy e Fernanda;

Ao Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka – Coordenador do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA-ESALQ/USP), pela parceria;

Ao Prof. Dr. Maurício Bacci (Laboratório de Evolução Molecular do Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP), e seus alunos Milene e Welliton pela parceria e tempo dedicado no auxílio às análises presentes neste trabalho.

Aos amigos Rodrigo Taketani (EMBRAPA Meio Ambiente) e Rodrigo Costa (Universidade de Algarve – Portugal), pela parceria científica e amizade;

À minha namorada Maria Julia por dividir comigo esta etapa da minha vida, por todo amor, carinho e amizade.

As famílias Dini, Andreote e Sacilotto (em especial à Fátima e Juliana), cada qual a sua maneira, presentes em minha vida, me apoiando durante esta etapa;

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“Do not place hope in finding a secret technique. Polish the mind through ceaseless training;
that is the key to effective techniques”*

Kyuzo Mifune

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 O gênero <i>Methylobacterium</i>	23
2.2 Interação <i>Methylobacterium</i> -planta hospedeira.....	25
2.3 Breve histórico sobre a ciência genômica	27
2.4 Sequenciadores de nova geração (<i>New generation Sequencing</i> - NGS)	30
2.4.1 Pirosequenciamento de DNA.....	32
2.5 RNA-Seq – histórico e aplicações	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6.....	35
3.2 Metodologia experimental	35
3.2.1 Crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de soja	35
3.2.2 Inoculação de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	36
3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
3.4 Delineamento e obtenção dos tratamentos para análise da expressão gênica.....	37
3.5 Extrações de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e processamento de RNA.....	37
3.5.1 Extração de DNA de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	37
3.5.2 Extração de RNA total das células de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 obtidas em cada tratamento	37
3.5.3 Gel de eletroforese de RNA.....	38
3.5.4 Enriquecimento de RNA mensageiro (mRNA).....	38
3.5.5 Amplificação de mRNA por meio de poliadenilação.....	39
3.5.6 Síntese de cDNA.....	39
3.6 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	40
3.7 Pirosequenciamento de DNA e RNA	42
3.7.1 Sequenciamento genômico <i>GS FLX Titanium System</i>	42

3.7.2 Sequenciamento de RNA (RNA-Seq)	42
3.7.3 Obtenção das sequências e arquivos de saídas (<i>output files</i>)	43
3.8 Análises genômica e transcriptômica	43
3.8.1 Montagem e anotação genômica de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	43
3.8.2 Análise dos transcritos sequenciados por RNA-seq	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Crescimento axênico das plântulas <i>in vitro</i>	45
4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
4.3 Processamento de ácidos nucleicos	49
4.3.1 Processamento do DNA genômico	49
4.3.2 Processamento do RNA	49
4.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	52
4.5 Obtenção das sequências e montagem genômica	54
4.6 Anotação genômica	57
4.7 Análise transcriptômica de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 em interação com a planta hospedeira	59
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	69

RESUMO

Análises genômica e transcriptômica de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 em interação com a planta hospedeira

Methylobacterium mesophilicum SR1.6/6 é uma bactéria endofítica isolada de ramo de citros previamente esterilizado superficialmente. Esta bactéria possui a capacidade de associar-se com uma ampla variedade de espécies e tecidos de plantas, principalmente nas raízes, mediado pela formação de biofilme e superfícies do hipocótilo de plântulas *in vitro*. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a aplicação de um modelo para o estudo *in vitro* da associação entre esta bactéria e plântulas de soja. Metodologias de genômica e transcriptômica foram aplicadas para a obtenção do *draft* genômico desta bactéria e de um amplo perfil de sequências expressas, obtidas em dois tratamentos distintos; *i*) células de biofilme – células bacterianas aderidas às raízes das plântulas removidas por sonicação, e *ii*) células planctônicas – células bacterianas em suspensão (i.e. interagindo somente com exsudados radiculares). Os dados genômicos obtidos por 454-pirosequenciamento resultaram em uma cobertura de 37 vezes o tamanho do genoma e geraram 242 *contigs*. Entre estes, 187 *contigs* grandes representaram 96% do genoma (tamanho estimado de 6.8 Mb), com um conteúdo GC de 69.5%. Considerando a análise da expressão gênica, um procedimento para monitorar a aderência das células bacterianas às raízes das plântulas foi realizado por meio de microscopia eletrônica de varredura de amostras de raízes coletadas durante o experimento (i.e. 24, 48 e 72h após a inoculação). As células bacterianas obtidas em cada tratamento foram inicialmente submetidas à extração de RNA total, seguida de um processo de enriquecimento de mRNA e sequenciamento por meio da tecnologia de 454-pirosequenciamento (RNA-Seq). O amplo perfil de expressão gênica obtido foi mapeado no *draft* genômico, resultando em um total de 1.930 *clusters* gênicos. Posteriormente, estes *clusters* foram filtrados de acordo com sua abundância e ocorrência diferencial em cada tratamento, resultando em 280 genes diferencialmente expressos. Funções relacionadas ao metabolismo de etanol/metanol, divisão celular, resposta ao estresse oxidativo, produção de sideróforos, biossíntese de peptidoglicanos e hopanóides foram induzidas nas células bacterianas aderidas às raízes das plântulas, enquanto que genes relacionados ao metabolismo essencial das células foram observados principalmente nos tratamentos controle e planctônico. Estes dados fornecem uma base para estudos relacionados a mecanismos moduladores da interação bactéria-planta, distinguindo significativamente os tratamentos biofilme e planctônico, mostrando assim que o contato físico é essencial para o sucesso da interação em estudo. Por fim, estas análises permitiram uma ampla visualização de perfis de expressão gênica desta bactéria, utilizando o *draft* genômico primeiramente obtido como base para o estudo desta interação com a planta hospedeira. Estudos futuros podem ser desenvolvidos visando caracterizar os mecanismos adaptativos desta bactéria, como seu metabolismo metilotrófico e outros metabolismos específicos, os quais podem dar suporte ao comportamento endofítico deste organismo.

Palavras-chave: Interação bactéria-planta; 454-pirosequenciamento; RNA-Seq; Biofilme

ABSTRACT

Genomic and transcriptomic analyses of *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 in interaction with host plant

Methylobacterium mesophilicum strain SR1.6/6 is an endophytic bacterium, which has originally been isolated from surface-sterilized healthy citrus branch. This bacterium is able to associate with a range of plant species, rather in the roots, mediated by a biofilm structure, and in hypocotyl surfaces of *in vitro* seedlings. The aim of the present study was the development and application of a model to study *in vitro* the association between this bacterium and soybean seedlings. Genomic and transcriptomic approaches were applied resulting a draft of this bacterium genome and a broad profile of mapped mRNA sequences obtained in two different treatments; *i*) biofilm cells – root adhered bacterial cells were removed by sonication, and *ii*) planktonic cells – bacteria cells in suspension (i.e. interacting only with root exudates). Genomic data, obtained by 454-pyrosequencing have had an average depth of 37-fold coverage of the genome and yielded 242 contigs. Among these, 187 large contigs represented 96% of the genome sequence (estimate size of 6.8 Mb) with a GC content of 69.5%. Concerning the gene expression survey, the process to monitor the adherence of bacteria cells to the roots was performed by scanning electron microscopy of roots collected along the experiment (i.e. 24, 48 and 72 hours after inoculation). Bacterial cells obtained in each treatment were firstly submitted to RNA extraction, followed by mRNA enrichment and RNA-Seq using 454-pyrosequencing technology. The broad gene expression profile obtained was mapped into the drafted genome, resulting in a total of 1.930 gene clusters. After that, these clusters were filtered according to their abundance and differential occurrence in each treatment resulting in 280 differential expressed genes. Functions related to methanol/ethanol metabolism, cell division, oxidative stress response, siderophore production, peptidoglycan and hopanoid biosynthesis were induced in bacterial cells adhered to plant roots, while genes related to essential cell metabolism were observed mostly in control and planktonic treatment. Also, these data provide insights into the mechanisms modulating plant microbe-interaction, significantly distinguishing biofilm and planktonic treatment, showing that the physical contact is a crucial step on plant-microbe interactions. In conclusion, results allowed a strongly supported analysis of gene expression, based on the genome draft of an endophytic bacterium interacting with the host plant. Further studies should focus on the adaptive mechanisms present in this bacterium, like the methylotrophic lifestyle and other specific metabolisms which might support its behavior as an endophytic bacterium.

Keywords: Plant-bacteria interaction; 454-pyrosequencing; RNA-Seq; Biofilm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Distribuição filogenética dos projetos genomas (Domínios Archaea e Bacteria). Os dados foram obtidos no <i>Genome OnLine Database</i> (GOLD) (http://www.genomesonline.org/), acessado em novembro de 2010. A distribuição filogenética foi obtida pelo programa ARB (LUDWIG et al., 2004) utilizando o banco de dados Silva Ref SSU versão 104 (http://www.arb-silva.de).....	28
Figura 1.2 -	Genômica microbiana e suas aplicações. Os círculos azuis representam áreas da genômica estudadas atualmente e os quadrados verdes permitem uma visualização resumida de ferramentas, técnicas e enfoques comumente envolvidos nestes estudos.....	29
Figura 1.3 -	Fluxograma ligando as características das novas tecnologias de sequenciamento e as abordagens experimentais. Figura adaptada de MACLEAN; JONES; STUDHOLME (2009). *SNP – <i>single-nucleotide polymorphism</i>	31
Figura 1.4 -	Fluxo de trabalho aplicado à tecnologia de RNA-Seq. Os quadrantes azuis representam o fluxograma experimental e, os vermelhos uma descrição detalhada de cada processo com opções metodológicas disponíveis no mercado.....	34

- Figura 2.1 - Representação esquemática do processo de captura dos rRNAs 16S e 23S utilizado pelo kit MICROBExpress™ (Ambion). Um oligo de captura contendo sequências homólogas às regiões altamente conservadas dos rRNAs bacterianos é utilizada em uma reação de hibridação *in vitro* com amostras de RNA bacteriano total. Em seguida, uma resina magnética (*Oligo MagBead*) é adicionada à reação. As partículas desta resina possuem um oligonucleotídeo acoplado, que é complementar à região 5' do oligo de captura. Uma vez formado o sistema *OligoMagBead/Oligo de captura/rRNA*, um ímã é utilizado para precipitar este complexo da solução de RNA. Por fim, o sobrenadante, contendo o RNA mensageiro enriquecido, é transferido para outro tubo. *Figura adaptada do manual de instruções fornecido pelo fabricante..... 38
- Figura 3.1 - (A) Plântula de soja M-SOY 8001 com proporções raízes/parte aérea padrão, utilizada na condução dos experimentos; (B) detalhe da superfície radicular (1) coloração da raiz no tratamento controle (2) coloração da raiz 72h após a inoculação; e (C) frascos padrões onde foram realizados os experimentos – detalhe para a lâmina d'água cobrindo a superfície radicular, possibilitando um amplo contato entre o inóculo bacteriano e as raízes das plântulas..... 45
- Figura 3.2 - Monitoramento da aderência e crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 no tecido radicular das plântulas de soja. (A) material coletado 24h após a inoculação; (B) 48h após a inoculação e (C) 72h após a inoculação; (D) tratamento controle – não inoculado; e (E) raízes após o tratamento por sonicação para remoção das células bacterianas aderidas por meio da formação de biofilme..... 48
- Figura 3.3 - Perfis eletroforéticos das amostras de RNA utilizadas no presente estudo. (a) amostras de RNA total extraídos em duplicata para cada um dos tratamentos; e (b) amostras amplificadas para cada um dos tratamentos, comparativamente a uma amostra controle não enriquecida..... 50

Figura 3.4 -	Expressão relativa de seis genes de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6, candidatos a serem expressos diferencialmente na interação bactéria-planta.....	53
Figura 3.5 -	(a) Distribuição dos <i>contigs</i> obtidos no presente estudo de acordo com seu tamanho em bases; e (b) cobertura genômica obtida no sequenciamento de acordo com o tamanho médio estimado pelo programa Newbler.....	55
Figura 3.6 -	Distribuição dos genes anotados por meio da plataforma RAST de acordo com sua categoria em cada subsistema.....	57
Figura 3.7 -	<i>Heat map</i> dos 280 <i>contigs</i> de transcritos diferencialmente expressos entre os tratamentos controle, biofilme e planctônico. Os dados estão plotados com relação à média de expressão de cada gene, calculada individualmente. A visualização gráfica foi gerada por meio do programa GeneCluster 3.0. A coloração verde e vermelha indica, respectivamente, a diminuição e o aumento da expressão de cada <i>contig</i> de transcrito em cada tratamento.....	61
Figura 3.8 -	Detalhes do perfil de expressão de genes diferencialmente expressos entre os tratamentos, relacionados a diferentes metabolismos celulares, como processamento de metanol/etanol (a); transporte de macromoléculas e produção de sideróforos (b); metabolismo de peptidoglicanos (c); multiplicação celular e maturação de biofilme (d); biossíntese de hopanóides (e); genes envolvidos com patogênese e produção de toxinas (f); e genes associados a estresse oxidativo (g). A primeira coluna a esquerda representa o tratamento biofilme, seguida do tratamento controle e planctônico, respectivamente. A coloração verde e vermelha indica, respectivamente, a diminuição e o aumento da expressão.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Características dos genomas completos já sequenciados, pertencentes ao gênero <i>Methylobacterium</i>	24
Tabela 2.1 -	Conjuntos de iniciadores utilizados para a quantificação de genes de <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6, quando da interação com a planta hospedeira e no tratamento controle.....	41
Tabela 3.1 -	Detalhamento das concentrações de RNA empregadas em cada processamento e eficiência do processo de enriquecimento de mRNA *[] – concentração.....	51
Tabela 3.2 -	Rendimento do processo de amplificação de mRNA, realizado por meio do kit MessageAmp™ II-Bacteria Kit, durante 14h.....	51
Tabela 3.3 -	Valores de eficiência (E) e R^2 médios para cada conjunto de iniciadores utilizados na quantificação relativa dos genes <i>mxoF</i> , <i>acdS</i> , <i>patatin</i> , <i>crtI</i> , <i>phoU</i> e <i>sss</i>	53
Tabela 3.4 -	Características da montagem do genoma de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 sobre os demais genomas de (<i>Methylobacterium</i> spp.).....	56
Tabela 3.5 -	Comparação de parâmetros anotados entre <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6, <i>M. extorquens</i> PA1 e <i>M. sp.</i> 4-46. Dados obtidos na plataforma RAST (http://www.rast.nmpdr.org) *CDS – <i>coding sequence</i> ; **RNAs – incluem tRNAs, rRNAs e outros pequenos RNAs.....	58
Tabela 3.6 -	Descrição quantitativa dos <i>reads</i> transcriptômicos obtidos em cada tratamento, porcentagem de <i>reads</i> mapeados e abundância de rRNAs obtidos nas amostras.....	59

1 INTRODUÇÃO

Os recentes avanços das tecnologias de sequenciamento de DNA têm possibilitado uma revolução nos mais diversos contextos das ciências biológicas, em especial àqueles aplicados a genômica. Desta forma, as plataformas atuais de sequenciamento em larga escala vêm sendo empregadas com o objetivo de compreender melhor a ampla diversidade genômica microbiana existente, bem como os mecanismos envolvidos na expressão de genes destes organismos nos mais diversos ambientes.

A associação simbiótica entre bactérias e plantas hospedeiras pode ocorrer por meio da colonização dos diferentes tecidos vegetais interna ou externamente, e por meio ou não da formação de biofilme. Esta associação pode trazer diversos benefícios à planta hospedeira (e.g. auxílio na obtenção de nutrientes, produção de fitormônios, indução de resistência sistêmica). Por outro lado, a especificidade e os mecanismos adaptativos envolvidos no processo de interação destas espécies microbianas amplamente associadas às plantas ainda são pouco conhecidos.

Entre as espécies bacterianas comumente descritas em associação com as plantas, destacam-se as pertencentes ao gênero *Methylobacterium*, o qual tem sido descrito em interação com as mais diversas espécies vegetais. O sucesso desta associação é conferido, em parte, devido ao seu metabolismo metilotrófico, o qual confere capacidade a estes organismos em utilizarem compostos de um único carbono como o metanol – comumente liberado pelas plantas, por exemplo, durante a síntese de parede celular – no processo de síntese de energia.

Desta forma, no presente trabalho, por meio da técnica de pirosequenciamento, foi obtido um *draft* do genoma da bactéria endofítica *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6, originalmente isolada como endófito de *Citrus sinensis*. Posteriormente, foi desenvolvido um modelo para o estudo *in vitro* da interação entre esta bactéria e plântulas de soja. O estabelecimento de tal modelo permitiu monitorar a colonização visualmente, e posteriormente, avaliar o padrão de genes expressos diferencialmente quando da interação bactéria-planta. Foram analisadas células bacterianas aderidas às raízes formando biofilme, e células bacterianas em suspensão (chamadas de planctônicas - interagindo somente com exsudados radiculares), sempre comparadas a um tratamento controle. Estas análises foram realizadas por meio da tecnologia de RNA-Seq, a qual gerou um amplo padrão da expressão de genes, analisado comparativamente ao *draft* genômico obtido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Methylobacterium*

A primeira linhagem bacteriana pertencente ao gênero *Methylobacterium* referenciada na literatura foi isolada em associação com minhocas (BASSALIK, 1913), e nesta época foi classificada como *Bacillus extorquens*. Em 1974 Patt e colaboradores criaram o gênero *Methylobacterium*, com o objetivo de acomodar um isolado bacteriano (*M. organophilum*) capaz de utilizar metano como fonte primária no processo de síntese de energia. A criação deste gênero foi baseada na descrição de um único isolado, e somente em 1982, Green & Bousfield, analisando diversos outros isolados já descritos, comparativamente a *M. organophilum*, observaram que muitos, apesar de não possuírem a capacidade de processar metano, eram capazes de utilizar outros compostos uni-carbonados e apresentavam características fenotípicas e bioquímicas muito similares a *M. organophilum*, sugerindo então que todas estas linhagens fossem inseridas ao gênero *Methylobacterium* (GREEN; BOUSFIELD, 1983).

Atualmente o gênero *Methylobacterium* pertence à classe *Alfaproteobacteria* e possui 34 espécies descritas (<http://www.bacterio.cict.fr/m/methylobacterium.html>). Deste total, oito isolados distribuídos em cinco espécies já possuem seus genomas completamente sequenciados: *M. extorquens* (linhagens AM1, DM4, PA1), *M. chloromethanicum* CM4, *M. nodulans* ORS2060, *M. populi* BJ001 e *M. radiotolerans* JCM2831; e um isolado pertencente a uma espécie ainda não classificada (*M. sp* 4-46). A tabela 1.1 apresenta um resumo das características de cada um destes genomas.

Este gênero bacteriano caracteriza-se por apresentar pigmentação rósea devido à síntese de carotenóides (VAN DIEN et al., 2003) e capacidade de utilizar tanto compostos de um único carbono (C_1) (i.e. metanol e metilamina) como compostos multi-carbonados, no processo de síntese de energia (GREEN, 1992; TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998), sendo por isso denominados de *Pink-Pigmented Facultative Methylophiles* (PPFMs). Membros deste gênero estão distribuídos nos mais diversos ambientes naturais, como solo e sedimentos, ar, poeira, água (doce e salgada) e ambientes urbanos (e.g. tubulações de água, banheiros e ar condicionado) (VAN AKEN et al., 2004).

Tabela 1.1 - Características dos genomas completos já sequenciados, pertencentes ao gênero *Methylobacterium*

Organismo	Tamanho do genoma (Mpb)	Conteúdo GC (%)	Número de plasmídeos	Centro de Sequenciamento
<i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4	5.78	68,0	2	DOE Joint Genome Institute
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	5.50	68,0	4	Universidade de Washington
<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4	5.94	68,0	2	Genoscope
<i>Methylobacterium extorquens</i> PA1	5.47	68,0	-	DOE Joint Genome Institute
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS2060	7.78	68,0	7	DOE Joint Genome Institute
<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	5.80	69,3	2	DOE Joint Genome Institute
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM2831	6.08	71,5	8	DOE Joint Genome Institute
<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46	7.66	71,4	2	DOE Joint Genome Institute

Diversos autores descreveram a presença de bactérias deste gênero interagindo com mais de 70 diferentes espécies de plantas (OMER; TOMBOLINI; GERHARSON, 2004), dentre os quais podemos citar a soja (HOLLAND; POLLACO, 1994; KUKLINSKYSOBRAL, 2003), cana de açúcar, algodão (MADHAIYAN et al., 2006b), amendoim (MADHAIYAN et al., 2006c), citros (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002), pinus (PIRTTILA et al., 2000), eucalipto (ANDREOTE et al., 2009), crotalária (SY et al., 2001), *Catharanthus roseus* e tabaco (ANDREOTE et al., 2006). Esta interação se dá por colonização epifítica e endofítica, podendo até mesmo ocorrer colonização intracelular de alguns tecidos (CORPE; RHEEM, 1989; DELMOTTE et al., 2009).

O metabolismo metilotrófico facultativo destas bactérias, o qual gera formaldeído a partir de compostos C₁, ocorre por meio da enzima metanol desidrogenase (MDH), codificada pelo gene *mxoF*. Tal metabolismo é referenciado por alguns autores como sendo o responsável pelo sucesso deste gênero na colonização e interação com plantas hospedeiras (SY et al., 2005), uma vez que durante processo de síntese de parede celular, mais especificamente na desmetilação da pectina, ocorre a geração de C₁ como subproduto (GALBALLY; KIRSTINE, 2002).

Adicionalmente ao metabolismo metilotrófico, Sy et al. (2001) relataram a presença de genes da nitrogenase (*nifH*) e de nodulação (*nodA*) em isolados de *M. nodulans*, mostrando que este grupo pode estar associado a processos de fixação de nitrogênio atmosférico quando em associação com as plantas. A capacidade de induzir resistência sistêmica na planta hospedeira

também foi descrito como característica de *Methylobacterium* spp. em plantas de arroz (MADHAIYAN et al., 2004) e amendoim (MADHAIYAN et al., 2006c).

A ampla distribuição deste gênero bacteriano interagindo com plantas, direcionou alguns estudos visando caracterizar a especificidade da interação planta-*Methylobacterium*. Knief et al. (2008) mostrou, por meio de técnicas independentes de cultivo, que diferentes espécies de plantas, cultivadas em um mesmo local, podem abrigar espécies de *Methylobacterium* distintas. Mais recentemente, os mesmos autores concluíram que tanto a espécie da planta, como o ambiente, possuem um papel crucial na determinação da comunidade de *Methylobacterium* associada às plantas (KNIEF et al., 2010).

2.2 Interação *Methylobacterium*-planta hospedeira

Os avanços da microbiologia molecular nos últimos anos traz uma nova visão sobre a diversidade microbiana existente e as mais diversas formas de interação destes organismos com aqueles pertencentes a outros grupos taxonômicos (macro-organismos). O fato é que uma nova perspectiva sobre a importância dos microrganismos atuando não somente no ambiente, mas interagindo com plantas e animais vêm sendo cada vez mais descrita e explorada.

Tomando *Methylobacterium* como exemplo, este gênero se apresenta entre um dos mais abundantes na colonização de plantas, crescendo ativamente em tecidos meristemáticos – formando populações entre 10^4 e 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido da planta (DORONINA et al., 2002); e na filosfera – entre 10^4 e 10^7 UFC por grama de peso seco de superfície foliar (HOLLAND; LONG; POLACCO, 2002).

Considerando dessa forma *Methylobacterium* como um simbiote de plantas, pode-se dizer que a utilização de C_1 fornecido pela planta é contrabalanceada por benefícios supridos à planta, os quais incluem a produção de fitormônios como o ácido indol-acético ou citocininas, e vitaminas (BASILE et al., 1985; KOENIG; MORRIS; POLACCO, 2002; TROTSSENKO; IVANOVA; DORONINA, 2001); síntese de enzimas como urease ou 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACCD) o qual modula o crescimento de plantas (HOLLAND; POLACCO, 1992; MADHAIYAN et al., 2006a; MADHAIYAN; POONGUZHALI; SA, 2007) e produção de sideróforos (IDRIS et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2009).

Estudos sugerem que estas bactérias metilotróficas estimulam a germinação de sementes e crescimento de plântulas por meio da produção de reguladores de crescimento vegetal, como a

zeatina, as citocininas e os compostos análogos às auxinas, como o ácido indol-acético (AIA), alterando as características morfológicas do hospedeiro (HOLLAND, 1997). Diversos trabalhos demonstram o efeito benéfico de PPMFs no desenvolvimento vegetal de plantas de soja (HOLLAND; POLLACO, 1994), milho (MADHAIYAN; SUNDARAM; KANNAIYAN, 2002), cana de açúcar e algodão (MADHAIYAN et al., 2006b). Jourand et al. (2004) relatam que algumas espécies nodulíferas de *Methylobacterium* são capazes de fixar nitrogênio em associação com leguminosas. Cervantes-Martinez et al. (2004) atribuíram ao endófito *Methylobacterium* sp. maior atividade fotossintética pelo aumento no número de estômatos, concentração de clorofila e conteúdo de ácido málico. Nemecek-Marshall et al. (1995) detectaram uma maior população de *Methylobacterium* na superfície abaxial de folhas jovens, possivelmente, devido à liberação de metanol pelos estômatos, o qual seria utilizado pelas PPMFs como fonte nutricional. Holland (1997) constatou que microrganismos metilotróficos são capazes de sintetizar citocininas, e segundo Lee et al. (2006) estas citocininas sintetizadas por *Methylobacterium* sp. atuam como um sinal molecular, estimulando as células do tecido vegetal a se dividirem.

Em estudos realizados em citros, foi observado que o gênero *Methylobacterium* é dominante no interior de ramos, e devido a variação na frequência de isolamento observada, os autores sugerem uma possível interação com *Xylella fastidiosa* - agente causal da CVC (clorose variegada dos citros) (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; SANTOS, 2005). Os autores sugerem que *M. extorquens* poderia participar no desenvolvimento dos sintomas da CVC por favorecimento de *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2004). Por outro lado, a presença da bactéria endofítica *Curtobacterium flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* em tecidos internos de plantas assintomáticas de citros, que hospedam *X. fastidiosa*, poderia estimular a produção de compostos ou elicitar, de alguma forma, um aumento na resistência destas plantas a *X. fastidiosa*. Assim, este endófito poderia limitar o estabelecimento de *X. fastidiosa* em plantas assintomáticas. Andreote et al. (2006) e Gai et al. (2009) mostraram que o endófito *M. mesophilicum* coloniza o xilema das plantas e pode ser transmitido de planta para planta por meio de insetos vetores, como *Bucephalogonia xanthopis*. Tendo em vista que o xilema é o nicho de *X. fastidiosa* e que cigarrinhas como *B. xanthopis* são transmissoras deste patógeno, os autores sugerem que em diferentes momentos *M. mesophilicum* e *X. fastidiosa* podem interagir, e possivelmente co-habitar o interior da planta hospedeira. Contudo, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos neste processo.

2.3 Breve histórico sobre a ciência genômica

O advento da tecnologia de sequenciamento de DNA baseada em dideoxinucleotídeos, desenvolvida por Sanger et al. (1977a), viabilizou o desenvolvimento dos primeiros projetos de sequenciamento de genomas. Tal metodologia possibilitou que no mesmo ano fosse anunciado o sequenciamento completo do DNA do bacteriófago *phi* X174 (SANGER et al., 1977b). Apesar deste progresso inicial, foi somente após anos de avanços tecnológicos utilizando esta metodologia, que os primeiros genomas de organismos de vida livre - as bactérias *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium* - foram completamente sequenciados (FLEISCHMANN et al., 1995; FRASER et al., 1995). A partir de então, a ciência genômica começou a se desenvolver conjuntamente com a bioinformática, modificando completamente o cenário biológico e caracterizando os mais diversos organismos presentes na árvore da vida. Devido principalmente a menor complexidade e tamanho de genoma, os Domínios Bacteria e Archaea são os que atualmente apresentam o maior número de indivíduos com genomas completamente sequenciados e projetos genomas em desenvolvimento.

Entretanto, ao realizar uma análise mais detalhada da distribuição dos projetos genomas dentro destes dois Domínios, pode ser observado que há uma predominância de certos filos, em detrimento a outros (Figura 1.1). Tal tendência é explicada pela dificuldade encontrada na culturabilidade da grande maioria dos microrganismos, bem como na prioridade de sequenciamento de organismos já previamente estudados e caracterizados em laboratório por vários grupos de pesquisa alocados ao redor do mundo (KYRPIDES, 2009).

Dentro dos atuais 34 filos pertencentes ao Domínio Bacteria, há um total de 6.378 projetos genômicos (completos ou em andamento). Somente três destes filos (Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria) são responsáveis por representar 83,8% destes projetos, e dentro destes filos, estima-se que somente 10% de sua diversidade encontra-se descrita e incluída em projetos de sequenciamento (HUGENHOLTZ, 2002; BENSON et al., 2009; HUGENHOLTZ; KYRPIDES, 2009). Adicionalmente, do total de projetos de sequenciamento de genomas microbianos em andamento, somente 30% inclui novos gêneros (KYRPIDES, 2009). Esta tendência vem sendo criticada por alguns autores, os quais ressaltam a importância de estudar organismos dispersos filogeneticamente e a sua direta implicação na descrição de novas famílias de genes, proteínas, vias metabólicas; bem como no auxílio a estudos relacionados à filogenia de genomas (HUGENHOLTZ, 2002; WU et al., 2009).

Figura 1.1 - Distribuição filogenética dos projetos genomas (Domínios Archaea e Bacteria). Os dados foram obtidos no *Genome OnLine Database* (GOLD) (<http://www.genomesonline.org/>), acessado em novembro de 2010. A distribuição filogenética foi obtida pelo programa ARB (LUDWIG et al., 2004) utilizando o banco de dados Silva Ref SSU versão 104 (<http://www.arb-silva.de>)

O cenário atual da ciência genômica não se restringe mais somente ao sequenciamento, montagem e anotação de genes. O advento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA, juntamente com o crescimento contínuo de algoritmos de bioinformática e o desenvolvimento de tecnologias que possibilitam o sequenciamento genômico baseado no DNA extraído de uma única célula (*Single Cell Genomics* – ISHOEY et al., 2008), mostram-se como ferramentas promissoras para guiar a descrição e análise de genomas nos próximos anos. A figura 1.2 visa ilustrar, de maneira geral, alguns destes contextos atuais da ciência genômica aplicada principalmente a microrganismos.

Figura 1.2 - Genômica microbiana e suas aplicações. Os círculos azuis representam áreas da genômica estudadas atualmente e os quadrados verdes permitem uma visualização resumida de ferramentas, técnicas e enfoques comumente envolvidos nestes estudos

2.4 Sequenciadores de nova geração (*New generation Sequencing* - NGS)

Desde a publicação do *draft* do genoma humano (VENTER et al., 2001), a capacidade de geração de dados genômicos tem crescido intensivamente, guiados principalmente pelo desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA, os chamados ‘sequenciadores de segunda geração’. Existem atualmente diversas tecnologias disponíveis no mercado, voltadas ao sequenciamento de DNA em larga escala. Estas tecnologias diferem principalmente quanto ao mecanismo químico empregado no processo, ao volume de dados gerados, à precisão de bases, à tecnologia de operação, ao tamanho de fragmento gerado por leitura e ao custo operacional; sendo que a escolha da tecnologia deve basear-se principalmente no suprimento dos dados necessários para a abordagem experimental (MACLEAN; JONES; STUDHOLME, 2009) (Figure 1.3).

A empresa *Roche* foi a primeira a lançar no mercado, em 2005, uma tecnologia de sequenciamento de DNA em larga escala (o equipamento 454 GS20), baseada na tecnologia de pirosequenciamento. No início de 2007, foi a vez de a empresa *Illumina* disponibilizar a sua primeira plataforma (Solexa GA). E, posteriormente as plataformas SOLiD e Heliscope foram apresentadas pelas empresas *Applied Biosystems* e *Helicos*, respectivamente. Desde então, todas estas empresas voltaram suas pesquisas no aprimoramento de suas tecnologias, levando a um processo contínuo de atualização de plataformas capazes de gerar um volume de dados cada vez maior, com maior precisão de bases e/ou tamanhos de *reads* maiores. Dentre estas tecnologias, a Heliscope, juntamente com a tecnologia ainda em desenvolvimento pela empresa *Pacific Biosciences*, destacam-se por serem as únicas capazes de sequenciar moléculas únicas de DNA – ‘*single-molecule-sequencer*’. Tais tecnologias mostram-se como promissoras, uma vez que possibilitam o sequenciamento de moléculas de DNA sem a necessidade de um processamento de pré-amplificação, o qual é comum às outras tecnologias citadas acima, e por vezes criticadas por alguns autores devido ao favorecimento de *amplicons*.

Figura 1.3 - Fluxograma ligando as características das novas tecnologias de sequenciamento e as abordagens experimentais. Figura adaptada de MACLEAN; JONES; STUDHOLME (2009). *SNP – *single-nucleotide polymorphism*

Este crescente avanço nestas tecnologias, tem levado ao surgimento de diversos consórcios e projetos de grande escala ao redor do mundo. Em 2007, Turnbaugh e colaboradores anunciaram o Projeto Microbioma Humano (*Human Microbiome Project*), com o objetivo de caracterizar toda a comunidade microbiana associada aos diferentes tecidos do organismo humano, os autores prevêem que tal estratégia poderá contribuir para um melhor entendimento sobre a fisiologia humana e predisposição a doenças. Em 2009, o projeto Terragenome (<http://www.terragenome.org/>) surgiu com o objetivo de sequenciar o metagenoma completo (i.e. sequenciamento de todos os genomas procarióticos presentes) de diferentes amostras de solos ao redor do mundo. Por fim, o maior e mais ambicioso projeto de sequenciamento genômico atual, o *Earth Microbiome* (<http://www.earthmicrobiome.org/>), têm como objetivo a caracterização de 200,000 amostras ao redor do mundo, por meio de enfoques metagenômicos, metatranscriptômicos e sequenciamento de *amplicons*, os pesquisadores prevêem a reconstrução de aproximadamente 500,000 genomas microbianos, bem como a construção de um atlas de genes o qual conterá informações e modelos metabólicos específicos para cada bioma amostrado.

2.4.1 Pirosequenciamento de DNA

O princípio da tecnologia de pirosequenciamento de DNA foi introduzido por Hyman (1988). Entretanto, foi somente em 2005 que Margulies e colaboradores, trabalhando junto a *454 Life Sciences Corp.* desenvolveram o primeiro sequenciador de segunda geração disponível no mercado empregando esta bioquímica de processamento. Para mostrar a eficiência do equipamento produzido, os autores sequenciaram e montaram o genoma completo da bactéria *Mycoplasma genitalium* (508.069 bases), com 96% de cobertura e 99.96% de precisão de bases, em um único processamento de 4 horas.

Este primeiro equipamento disponibilizado pela *454 Life Sciences Corp.* foi o *Genome Sequencer 20 System*, capaz de produzir 200.000 *reads*, com tamanho médio variando entre 100-120 bases, em apenas 4,5h de processamento. Posteriormente, esta plataforma foi atualizada para *GS FLX*, a qual é capaz de produzir até 400.000 *reads* por processamento, com tamanho médio de 220-240 bases. Atualmente, a plataforma *GS FLX Titanium* (disponível no mercado desde outubro de 2008) possui a capacidade de gerar em média 1 milhão de *reads* de tamanho médio entre 350-450 bases, em um processamento de 10 horas. Tais avanços têm se mostrado contínuo, não somente por parte da *454 Life Sciences Corp.* como por parte de tecnologias e empresas concorrentes (i.e. SOLiD, Solexa), as quais, de maneira geral, competem no mercado baseando-se no *trade-off* tamanho de fragmento/precisão de bases, os quais são específicos de cada tecnologia.

A tecnologia de pirosequenciamento de DNA tem sido empregada por diversos autores para a obtenção do *draft* genômico *de novo* de diversas espécies bacterianas, como por exemplo, no sequenciamento de *Campylobacter jejuni* Strain 81116 (PEARSON et al., 2007), *Anaerocellum thermophilum* DSM 6725 (KATAEVA et al., 2009), *Lactobacillus plantarum* JDM1 (ZHANG et al., 2009), *Helicobacter pylori* Strain G27 (BALTRUS et al., 2009). É comum observar nestes anúncios de sequenciamento genômico que, apesar do elevado número de sequências geradas, com uma cobertura genômica variando entre 13 a 35 vezes, sempre foi necessário a aplicação de tecnologias de sequenciamentos adicionais (geralmente sequenciamento por Sanger) para que o fechamento de todos os *gaps* fosse concluído.

Adicionalmente ao sequenciamento de genomas, mais recentemente a 454 lançou um protocolo específico para o sequenciamento de cDNA partindo de amostras de mRNA. Esta metodologia, comumente chamada de RNA-Seq, tem possibilitado a obtenção de um amplo perfil

de expressão gênica em isolados microbianos (i.e. transcriptômica), bem como em amostras complexas (i.e. metatranscriptômica).

2.5 RNA-Seq – histórico e aplicações

O ‘transcriptoma’ pode ser definido como sendo o conjunto completo de transcritos em uma célula, e suas quantidades, em um estágio específico do desenvolvimento ou condição fisiológica (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009), incluindo, portanto RNA codificante (mRNA) e não codificante (rRNA, tRNA, RNA estrutural, RNA regulatório, e outros tipos de RNAs). Assim sendo, desde o início da biologia molecular, diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos no processo de transcrição nas células (SESHASAYEE et al., 2006), uma vez que a alteração nos níveis de expressão está diretamente relacionada às modificações na fisiologia, metabolismo e consequentemente ao processo de adaptação celular (VAN VLIET, 2010).

Até recentemente, a aplicação de técnicas moleculares baseadas em microarranjos de DNA eram as mais eficientes ferramentas para a determinação de um amplo padrão de expressão gênica a nível celular (HINTON et al., 2004). Entretanto, algumas limitações no uso desta tecnologia têm surgido (BLOOM et al., 2009), como por exemplo, a especificidade do arranjo para cada isolado, a saturação do fundo (*background*) e a qualidade e densidade variáveis dos *spots*; fatores os quais têm dificultado a análise comparativa entre experimentos e, geralmente, levados a necessidade de métodos normalizadores complexos (HINTON et al., 2004). Devido a isto, a aplicação de sequenciamento de cDNA surgiu como uma alternativa eficiente para solucionar estes problemas, bem como para suprir dados transcriptômicos independentemente da necessidade de uma sequência genômica de referência previamente descrita.

O sequenciamento de cDNA por técnicas convencionais (i.e. sequenciamento por ‘Sanger’) pode também ser realizado. Todavia, este tipo de análise é muito dispendioso e, por vezes, inviável economicamente devido ao grande número de sequências a serem geradas. Desta forma, foi somente após o surgimento de NGS e o desenvolvimento de protocolos específicos aplicados para a síntese e sequenciamento de cDNA em larga escala, que a tecnologia RNA-Seq tornou-se possível, levando à obtenção de uma alta resolução em perfis transcriptômicos. A Figura 1.4 apresenta uma visão simplificada da aplicação desta tecnologia.

Figura 1.4 - Fluxo de trabalho aplicado à tecnologia de RNA-Seq. Os quadrantes azuis representam o fluxograma experimental e, os vermelhos uma descrição detalhada de cada processo com opções metodológicas disponíveis no mercado

Passalacqua et al. (2009), utilizando RNA-Seq, estudaram o transcriptoma de *Bacillus anthracis* sob diferentes condições. Os autores relatam uma elevada resolução no perfil de expressão de genes desta bactéria obtido por esta tecnologia, a qual possibilitou a obtenção de novas sequências transcritas, previamente não anotadas no genoma de referência. Assim sendo, os autores concluem que tal metodologia pode suprir dados quantitativos e qualitativos sobre a expressão gênica, bem como contribuir para uma maior precisão na anotação genômica.

Este novo enfoque no estudo de sequências expressas tem possibilitado a interpretação não somente a nível celular como também suprimindo uma visão global de transcritos em amostras de diferentes ambientes (i.e. metatranscriptômica) (para uma revisão ver MORAN, 2009). Gilbert et al. (2008) descrevem uma metodologia inédita e eficiente na aplicação de RNA-Seq para o estudo metatranscriptômico da diversidade microbiana presente em amostras marinhas. Uma combinação metagenoma/metatranscriptoma gerou uma visão com maior resolução da estrutura e funcionalidade desta comunidade natural.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

A bactéria *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 foi previamente isolada como endofítica de *Citrus sinensis*, durante o desenvolvimento da tese de doutorado do Dr. Welington Luiz de Araújo (primeiramente referenciada em publicação em ARAÚJO et al., 2002). A partir daí, diversos estudos vêm sendo realizados com esta bactéria, visando principalmente caracterizar a interação desta bactéria com *Xylella fastidiosa* (ANDREOTE et al., 2006) ou com as plantas hospedeiras, tais como cana-de-açúcar (ROSSETTO, 2008), arroz, eucalipto (DOURADO, 2010) e citros (BOGAS, 2010). Para este trabalho, esta bactéria foi obtida da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio Azevedo” (ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil).

3.2 Metodologia experimental

3.2.1 Crescimento *in vitro* de plântulas de soja

As sementes de soja (*Glycine max* L.) variedade M-SOY 8001 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Natal Antonio Vello do Departamento de Genética (ESALQ/USP). A desinfecção superficial das sementes foi realizada por imersão em etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio (1.5% ClO_3^- como composto ativo) por 2 min, etanol 70% por 1 min, seguida de duas lavagens em água deionizada esterilizada. Estas sementes foram então depositadas sobre papel filtro previamente esterilizado para remoção parcial da umidade e posteriormente semeadas em frascos contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O desenvolvimento das plântulas foi realizado em condições axênicas, em câmara de crescimento com temperatura variando entre 25 e 28°C e fotoperíodo de 16 h, por seis dias.

Após este período de seis dias, estas plântulas foram transplantadas para frascos contendo 20 mL de água deionizada esterilizada (uma plântula por frasco) e mantidas por um período de 72 h a 28°C em agitador orbital. Tal procedimento foi realizado para permitir que exsudados das plântulas pudessem ser produzidos durante este período, antes de se proceder a inoculação com a bactéria *M. mesophilicum* SR1.6/6. Este processamento foi realizado para testar a hipótese de que estes exsudados pudessem ter um efeito sobre o padrão de expressão gênica da bactéria posteriormente inoculada.

3.2.2 Inoculação de *M. mesophilicum* SR1.6/6

Para inoculação, a bactéria *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi cultivada em meio SPW modificado (contendo 4 g.L⁻¹ de peptona de soja; 1 g.L⁻¹ de triptona; 2,4 g.L⁻¹ de extrato de malte; 10 g.L⁻¹ de sacarose; 1,2 g.L⁻¹ de K₂HPO₄; 1 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,4 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,4 g.L⁻¹ de glutamina; 0,2 g.L⁻¹ de histidina; pH 6,6). Após o cultivo desta bactéria (feito por 72 horas a 28°C), alíquotas de 2 mL da suspensão celular na concentração de 2x10⁷ UFC.mL⁻¹ (densidade óptica de 600nm = 0.8) foram adicionados em cada frasco contendo as plântulas transplantadas em 20 mL de água, resultando em uma concentração celular final de 2x10⁶ UFC.mL⁻¹. Estes frascos foram mantidos a 28°C por 72 h em agitador orbital (150 rpm), sendo ao longo do período realizadas as amostragens para as análises posteriores. Um total de 60 frascos foram utilizados com o objetivo de obter, *a posteriori*, uma quantidade de células bacterianas suficiente para se proceder a extração de RNA.

Para a inoculação, os frascos contendo somente água e as plântulas foram suplementados com 10% de meio de cultivo SPW modificado (concentração final), pressupondo que desta forma o metabolismo bacteriano pudesse se manter constante mesmo no tratamento controle (onde há ausência de exsudados radiculares – item 3.4). Em outras palavras, se todo o experimento (i.e. transplante, inoculação e incubação) tivesse sido realizado em água, o metabolismo bacteriano do tratamento controle, na ausência total de nutrientes, poderia ser reduzido, levando a uma falsa interpretação na análise de genes diferencialmente expressos na interação bactéria-planta.

3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura, foram coletadas amostras de raízes destas plântulas 24, 48 e 72 h após a inoculação. As amostras foram imediatamente fixadas em solução Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5%; em tampão cacodilato de sódio 0,05 M - pH 7,2; e cloreto de cálcio 0,001 M), e armazenadas à 7°C. A desidratação se deu por imersões sucessivas em etanol (30, 50, 70, 90 e 100% - 30 min cada). Após a desidratação as sementes foram secas ao ponto crítico (*CPD 050 - Balzers*), metalizadas com ouro (*MED 010 - Balzers*) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura de pressão variável *LEO 435-VP Cambridge Instruments-England* (Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA-ESALQ/USP)).

3.4 Delineamento e obtenção dos tratamentos para análise da expressão gênica

Os tratamentos avaliados neste trabalho foram: *i*) biofilme: onde células aderidas às raízes das plântulas (aproximadamente 20 plântulas por triplicata), após um período de tratamento de 72 h, foram removidas por meio de sonicação (Sonicador Odontobrás modelo *Ultrasonic Cleaner 2840D*) por 2 min, na frequência de 40 KHz; *ii*) planctônico: este tratamento foi caracterizado pelas células bacterianas livres em solução, ou seja, interagindo somente com os exsudados das plântulas (4 frascos por triplicata) e, *iii*) controle: o tratamento controle foi realizado por meio do inóculo bacteriano em frasco com água, porém na ausência de plântulas (4 frascos por triplicata). Este delineamento experimental possibilitou isolar efeitos no padrão de expressão gênica de *M. mesophilicum* SR1.6/6, tais como aderência e formação de biofilme e exsudados das plântulas, comparativamente ao tratamento controle.

Por fim, as células bacterianas oriundas de cada tratamento foram precipitadas por meio de centrifugação a 4000 rpm por 10 min à 4°C, imediatamente congeladas por imersão em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C até a extração de RNA.

3.5 Extrações de ácidos nucléicos (DNA e RNA) e processamento de RNA

3.5.1 Extração de DNA de *M. mesophilicum* SR1.6/6

A extração do DNA das células de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi realizada utilizando o kit QIAGEN - *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen). A concentração e qualidade do DNA obtido foi determinada em espectrofotômetro (*NanoDrop ND-1000*) e por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (w/v). O DNA obtido apresentando valor de razão de absorbância (A) A_{260}/A_{280} acima de 1,8 e com concentração de aproximadamente 100 ng.μL⁻¹ foi armazenado a -80°C e posteriormente 10 μL foram enviados para sequenciamento junto a 454-Roche *Life Science* (Branford CT, EUA).

3.5.2 Extração de RNA total das células de *M. mesophilicum* SR1.6/6 obtidas em cada tratamento

A extração de RNA total das células foi realizada por meio do kit *RiboPureTM – Bacterial kit* (Ambion), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Quantidades iniciais similares de células representando os três tratamentos foram submetidas a tal protocolo. A concentração e qualidade do RNA obtido foi verificada em NanoDrop e em gel de eletroforese de RNA.

3.5.3 Gel de eletroforese de RNA

A integridade e a qualidade dos RNAs extraídos 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 mg.mL⁻¹ de gel). O gel foi equilibrado por 30 min em tampão FA 1X antes de proceder à eletroforese. Aproximadamente 1 µg de RNA foi previamente aquecido a 65°C por 5 min e posteriormente carregado no gel. A eletroforese foi realizada a 60V por 1 h, e o gel fotodocumentado sob luz UV.

3.5.4 Enriquecimento de RNA mensageiro (mRNA)

O enriquecimento de mRNA das amostras de RNA total extraídos foi realizado por aplicação dos kits MICROBExpress™ (Ambion) e MEGAClear™ (Ambion), de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, o kit MICROBExpress baseia-se em um sistema de hibridação sanduíche (Figura 2.1) para realizar a remoção dos RNAs ribossomais (rRNA) 16S e 23S.

Figura 2.1 - Representação esquemática do processo de captura dos rRNAs 16S e 23S utilizado pelo kit MICROBExpress™ (Ambion). Um oligo de captura contendo sequências homólogas às regiões altamente conservadas dos rRNAs bacterianos é utilizada em uma reação de hibridação *in vitro* com amostras de RNA bacteriano total. Em seguida, uma resina magnética (*Oligo MagBead*) é adicionada à reação. As partículas desta resina possuem um oligonucleotídeo acoplado, que é complementar à região 5' do oligo de captura. Uma vez formado o sistema *OligoMagBead/Oligo de captura/rRNA*, um ímã é utilizado para precipitar este complexo da solução de RNA. Por fim, o sobrenadante, contendo o RNA mensageiro enriquecido, é transferido para outro tubo. *Figura adaptada do manual de instruções fornecido pelo fabricante

O RNA resultante deste procedimento contém, segundo o fabricante, somente moléculas de mRNA, tRNAs, rRNA 5S, e outros pequenos RNAs. Por esse motivo, um segundo enriquecimento foi realizado por meio da utilização do kit MEGAClearTM, o qual visa por meios físicos eliminar significativamente a quantidade de tRNAs, 5S rRNA e outros pequenos RNAs, favorecendo ainda mais o enriquecimento de mRNA.

Os RNAs resultantes destes tratamentos foram armazenados a -80°C e posteriormente enviados para sequenciamento junto a 454-Roche *Life Science* (Branford CT, EUA). Uma breve descrição da metodologia empregada para o sequenciamento de mRNA (RNA-Seq) encontra-se descrita no item 3.7.2.

3.5.5 Amplificação de mRNA por meio de poliadenilação

Uma amostra deste mRNA enriquecido foi amplificada por meio do MessageAmpTM II-Bacteria Kit (Ambion), seguindo as informações fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, este sistema se baseia na poliadenilação da extremidade 3' das moléculas de mRNA, seguida da síntese das duas fitas de cDNA realizada por meio da utilização de iniciadores 5' poliT. Por fim, uma transcrição contínua é conduzida por um período de 4 a 14 h, e os mRNA amplificados são purificados da solução. A eficiência de amplificação em um sistema tratado por 14h é da ordem de aproximadamente 1000 a 1500 vezes.

Os mRNAs amplificados foram submetidos à eletroforese desnaturante (como descrito no item 3.5.3). Tal procedimento foi realizado com o objetivo de verificar a eficiência de enriquecimento do mRNA. Esta eficiência foi verificada pela ausência de bandas específicas, as quais seriam resultantes de uma amplificação preferencial de um fragmento possivelmente abundante na amostra inicial. Posteriormente à eletroforese, uma alíquota destes mRNAs amplificados foram utilizados para síntese de cDNA.

3.5.6 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA a partir do mRNA amplificado foi realizada por meio do kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) utilizando iniciadores randômicos (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

As análises de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas para as amostras de cDNA sintetizadas a partir de mRNA previamente amplificado. Tal análise teve como objetivo inicial a quantificação de um gene constitutivo (*housekeeping*) nos três tratamentos, com a finalidade de analisar o favorecimento ou não destes fragmentos durante o processo de amplificação de mRNA. Conjuntamente, um total de seis outros iniciadores desenvolvidos para a quantificação de genes candidatos a serem diferencialmente expressos durante a interação entre *M. mesophilicum* SR1.6/6 e planta hospedeira também foram utilizados na análise por qPCR (Dourado, 2010) (Tabela 2.1). Tal metodologia não teve a finalidade de inferir sobre a expressão de genes nestes tratamentos e sim fornecer uma primeira informação referente à expressão diferencial de genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 nos diferentes tratamentos.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *StepOneTM System* (*Applied Biosystems*) programado para uma desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 15 s a 94°C e 1 min a 62°C. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 1 µL de cDNA (~100 ng), 10 mM de cada iniciador e 12,5 µL da solução do kit *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). A especificidade das reações foi avaliada por meio da curva de desnaturação com gradiente variando de 60 a 96°C, com a taxa de 1°C a cada 30 s.

Tabela 2.1 - Conjuntos de iniciadores utilizados para a quantificação de genes de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6, quando da interação com a planta hospedeira e no tratamento controle

Iniciador	Gene alvo	Sequência (5'-3')	Fragmento	Descrição do gene
<i>MxaFqPCRAF</i>	<i>mxoF</i>	CGTCAACGTCATGATGCT(C/G)T	250pb	Codifica para a subunidade α da enzima MDH – a qual está diretamente envolvida no metabolismo metilotrófico (ZHANG; LIDSTROM, 2003)
<i>MxaFqPCRAR</i>		GATGTCCTTGGCGAG(A/G)TG'		
<i>PatatinF</i>	<i>patatin</i>	CTTCAACGCCAACCTGATG	250pb	Gene normalmente ativado durante o processo de patogenicidade (CAMERA et al., 2009), associado a produção de fosfolipases
<i>PatatinR</i>		CCGATCCGCTCGTAGTTCT		
<i>sssF</i>	<i>sss</i>	ATCGACGCCCTGTACAATTC	221pb	<i>Sodium solute symporter</i> - realiza o transporte simpórtico Na ⁺ /soluto (pantotenato/Na ⁺ , prolina/Na ⁺ , glicose ou galactose/Na ⁺ (SCIEN, 1998)
<i>sssR</i>		ACCGTCGCGTAGTTCGAC		
<i>phoUF</i>	<i>phoU</i>	TTCGACGGGCTGATCTACTC	189pb	Envolvido no controle da homeostase do fósforo e da expressão de genes relacionados a estresse, produção de antibióticos e virulência (GRISTWOOD et al., 2009; LI; ZHANG, 2007; CHENG et al., 2009a)
<i>phoUR</i>		GATCAGGTAGAAGGCCACCA		
<i>PhyF</i>	<i>crtI</i>	AATACTTCAAGCCGGTGCTG	186pb	Codifica uma enzima catalisadora, envolvida na síntese de licopeno, o qual confere proteção à célula contra danos oxidativos, diferentes tipos de radiações e dissecação (XU et al., 2007)
<i>PhyR</i>		GACATGCCGAGGTACTTGGT		
ACC MetI F	<i>acdS</i>	GACCGGGTCGGCAACATC	200pb	Codifica a enzima ácido carboxílico aminociclopropano deaminase que degrada ACC (1-carboxilato 1-aminociclopropano), precursor do etileno (HARDOIM; OVERBEECK; VAN ELSAS, 2008)
ACC MetI R		AGCCCGCCGTACTTGTGC		
<i>RecAF</i>	<i>recA</i>	CGAACTGCATGGTC(G)ATCTTC	232pb	Gene de expressão constitutiva, associado a processos de recombinação e reparo de DNA
<i>RecAR</i>		ATGTCGAACTCGACCTGCTT		

A eficiência de cada reação foi calculada individualmente utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). A quantificação da expressão gênica por meio de qPCR foi baseada na expressão de um gene alvo em relação a um gene de referência (gene com expressão reconhecidamente constitutiva - *recA*) pelo modelo matemático de Pfaffl, que calcula a razão da expressão relativa (R) de um gene alvo, baseado na eficiência da reação de qPCR (E) e no ponto em que a fluorescência ultrapassa satisfatoriamente a fluorescência de *background* (Ct). Esta metodologia resulta sempre em um valor calculado a partir de uma amostra desconhecida vs. um controle. Este valor é expresso em relação a um gene referência, de acordo com a fórmula $R = [((E_{\text{alvo}})^{\Delta C_{\text{t}}}_{\text{alvo}}) \cdot ((E_{\text{normalizador}})^{\Delta C_{\text{t}}}_{\text{normalizador}})^{-1}]$, onde ΔC_{t} é a diferença calculada por $(C_{\text{t}_{\text{controle}}} - C_{\text{t}_{\text{amostra}}})$.

3.7 Pirosequenciamento de DNA e RNA

O serviço de sequenciamento de DNA e RNA foi realizado junto a 454-Roche *Life Science* (Branford CT, EUA). O presente projeto foi delineado para o sequenciamento do DNA genômico de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6, utilizando ½ placa; e o sequenciamento de RNA – transcriptoma desta bactéria em três tratamentos distintos (biofilme, planctônico e controle), utilizando ¼ placa. O restante, ¼ placa, foi utilizado com amostras não referentes ao presente trabalho. O delineamento foi realizado calculando-se um número de *reads* com uma cobertura satisfatória para cada uma das amostras submetidas à análise.

3.7.1 Sequenciamento genômico *GS FLX Titanium System*

Resumidamente, o fluxo de trabalho do sistema *Genome Sequencer FLX Titanium* se baseia em cinco etapas: i) *fragmentação da amostra*: a amostra de DNA genômico é fracionada em fragmentos de 300 a 800 pares de bases (pb) por meio de nebulização; ii) *preparação da biblioteca*: pequenos adaptadores (A e B) específicos são ligados nas extremidades 3' e 5' dos fragmentos; iii) *um fragmento = um bead*: cada fragmento de DNA único da biblioteca é imobilizado em um *bead*, a amostra é então purificada gerando micro reatores únicos onde cada *bead* representa uma sequência única da biblioteca; iv) *PCR de emulsão*: cada fragmento único ligado a um *bead* é amplificado, excluindo sequências competidoras e contaminantes, gerando para cada micro reator único, a ligação com vários milhões de sequências idênticas; v) *um bead = um read*: os *beads* carregando sequências únicas são então adicionados em uma placa *PicoTiter* onde se executa o sequenciamento. O diâmetro de cada cavidade na placa *PicoTiter* permite a inserção de somente um *bead*. Por fim, a placa é carregada no aparelho *GS FLX* e a leitura é feita por sinais de quimioluminescência registrados em uma câmera acoplada ao equipamento.

3.7.2 Sequenciamento de RNA (RNA-Seq)

O sequenciamento de RNA por meio do sistema *GS FLX Titanium* baseia-se em um fluxo de trabalho desenvolvido em outubro de 2009, e revisado em Janeiro de 2010. Assim sendo, este trabalho é pioneiro na utilização desta tecnologia, aplicada com o objetivo de obter um amplo perfil transcriptômico de *M. mesophilicum* SR1.6/6 quando da interação *in vitro* com plântulas de soja.

O fluxo de trabalho para a aplicação de tal metodologia baseia-se em um sistema de preparação de bibliotecas de cDNA a partir do mRNA enriquecido (item 3.5.4). Resumidamente, uma fragmentação inicial da amostra é realizada por meio de uma reação contendo uma solução de ZnCl_2 , seguida de uma purificação dos fragmentos de tamanho desejado e síntese das duas fitas de cDNA por meio do kit *cDNA Synthesis System* (Roche), utilizando *Roche random primer*. Os procedimentos seguintes são específicos para RNA, entretanto, seguem o mesmo princípio descrito para o sequenciamento de DNA (item 3.7.1).

3.7.3 Obtenção das sequências e arquivos de saídas (*output files*)

No processo de sequenciamento pela tecnologia de pirosequenciamento, os sinais quimioluminescentes são registrados individualmente para cada sequência na câmera acoplada ao equipamento durante todo o processo. Ao final, estes dados são processados por um programa específico do equipamento, o qual, a partir dos sinais brutos obtidos, gera arquivos de *flowgrams* e *basecalls* contendo a identidade e a qualidade de cada base em cada *read* – estes arquivos possuem a extensão *.fn e *.qual, respectivamente. Um processamento posterior visa vincular a identidade à qualidade de cada base em um único arquivo, gerando arquivos *.sff. O serviço de sequenciamento contratado neste projeto junto a 454-Roche *Life Science* (Branford CT, EUA) disponibilizou os arquivos na extensão *.fn, *.qual e *.sff para cada uma das quatro amostras submetidas ao sequenciamento (DNA genômico, transcriptoma controle, transcriptoma biofilme e transcriptoma planctônico).

3.8 Análises genômica e transcriptômica

3.8.1 Montagem e anotação genômica de *M. mesophilicum* SR1.6/6

Os arquivos *.sff obtidos referentes a amostra de DNA genômico foram submetidos à montagem por meio da plataforma gsAssembler (montagem *de novo*) e gsMapper (montagem ancorada a um genoma de referência) do programa Newbler v. 2.3, fornecido pela Roche 454.

Alguns testes foram realizados neste item com o objetivo de obter uma montagem genômica eficiente e representativa. Assim sendo, foi conduzido a montagem *de novo* e montagens ancoradas em cada um dos genomas de *Methylobacterium* sp. disponíveis no banco de dados do NCBI. Em todos os casos foi considerado um valor de sobreposição mínimo e identidade de sobreposição de 40 bases e 90%, respectivamente. Foram realizados testes

modificando tais parâmetros, entretanto, nenhuma modificação significativa no número total de *contigs* gerados foi obtida. Assim sendo, o *default* do programa foi utilizado para se prosseguir com as análises.

Após a montagem genômica, os *contigs* obtidos foram submetidos à anotação automática por meio da plataforma RAST (*Rapid Annotations using Subsystems Technology*) v. 2.0, disponível em <http://rast.nmpdr.org/> (AZIZ et al., 2008).

3.8.2 Análise dos transcritos sequenciados por RNA-seq

Devido ao processamento inicial de obtenção de células de *M. mesophilicum* SR1.6/6 quando da interação com plântulas de soja, é possível que parte das sequências obtidas nestes tratamentos pudessem ser provenientes de tecidos das plântulas e não de *M. mesophilicum* SR1.6/6. Assim sendo, um processamento inicial de mapeamento destas sequências obtidas foi realizado por meio da plataforma gsMapper do programa Newbler v. 2.3, utilizando os *contigs* genômicos previamente montados como referência.

Após processar separadamente o mapeamento dos *reads* obtidos em cada tratamento sobre os *contigs* genômicos obtidos, foi desenvolvido um *script* (em parceria com o Laboratório de Evolução Molecular do Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Maurício Bacci), utilizando a linguagem de programação Perl, o qual renomeou e concatenou todos os tratamentos em um único arquivo. Este diretório, contendo todas as sequências em formato *.fasta e valores quantitativos de ocorrência de cada sequência em cada tratamento, foi submetido à análise de *cluster* por meio do programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) com o parâmetro *p* (*overlap percent identity cutoff*) de 90%. Tal processamento gerou *contigs* de transcritos, e informações quantitativas de ocorrência de *reads* oriundos de cada tratamento na composição dos *contigs*.

A identificação destes *contigs* de transcritos foi realizada por meio da plataforma Blast2GO (CONESA et al., 2005), utilizando o algoritmo blastx (ALTSCHUL et al., 1997) contra a base de dados nr (não redundante) do GenBank.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento axênico das plântulas *in vitro*

O crescimento axênico em meio MS por seis dias possibilitou a obtenção de plântulas de soja com um tamanho médio de 19 cm (± 2 cm) e com uma superfície radicular abundante, passível de se conduzir o experimento de interação com o inóculo de *M. mesophilicum* SR1.6/6. A figura 3.1 mostra um detalhamento do padrão de plântulas utilizadas no presente estudo.

Figura 3.1 - (A) Plântula de soja M-SOY 8001 com proporções raízes/parte aérea padrão, utilizada na condução dos experimentos; (B) detalhe da superfície radicular (1) coloração da raiz no tratamento controle (2) coloração da raiz 72h após a inoculação; e (C) frascos padrões onde foram realizados os experimentos – detalhe para a lâmina d'água cobrindo a superfície radicular, possibilitando um amplo contato entre o inóculo bacteriano e as raízes das plântulas

A coloração rósea da bactéria *M. mesophilicum* SR1.6/6 possibilitou a fácil visualização do seu crescimento e aderência na superfície das raízes. Este procedimento foi importante, pois permitiu um monitoramento visual do experimento e facilitou a remoção de frascos contendo

contaminantes. Outro fator importante é que somente plântulas saudáveis, após as 72h de experimento, foram processadas para a remoção das células bacterianas aderidas e planctônicas. As plântulas que apresentaram qualquer tipo de anomalia (ausência de crescimento aéreo e/ou radicular, ou deficiências nutricionais devido a seu processamento *in vitro*) foram descartadas. Estas plântulas foram descartadas, pois, foi assumido que por estarem debilitadas deveriam expressar genes de estresse, os quais poderiam afetar possíveis genes envolvidos na interação bactéria-planta.

Este modelo para o estudo de interação bactéria-planta foi desenvolvido com o intuito de proporcionar um amplo contato entre as células bacterianas, as raízes e exsudados das plântulas de soja. Mark et al. (2005) descrevendo o padrão de expressão gênica de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 na interação com exsudados radiculares de duas variedades distintas de beterraba, mostraram que mesmo na ausência de um contato direto entre as células bacterianas e tecidos das plantas, os exsudados produzidos por estas podem modificar o padrão de expressão gênica da bactéria. Tal efeito é referenciado pelos autores por influenciar na seleção da comunidade bacteriana associada às plantas (i.e. rizosfera, rizoplane e colonização endofítica).

4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de monitorar o desenvolvimento bacteriano e a formação de biofilme de *M. mesophilicum* SR1.6/6 na superfície das raízes de soja, o que é imprescindível para a determinação do tempo amostral a ser empregado na metodologia de RNA-Seq. As imagens mostram claramente um processo gradual de colonização de *M. mesophilicum* nos tecidos radiculares de soja (Figura 3.2). Nas primeiras 24h (Figuras 3.2A) foi observada a aderência de células únicas depositadas sobre o tecido radicular. Posteriormente, com 48 h o biofilme adquiriu camadas devido à deposição de células (Figuras 3.2B), e com 72 h, foi observada a formação de macro-colônias juntamente com a deposição de exopolissacarídeos entre as células (Figuras 3.2C). A capacidade deste isolado em formar biofilme sobre a superfície de raízes de plantas já havia sido descrita em trabalhos da mesma equipe (ANDREOTE et al., 2006; ROSSETTO et al, *in press*). Este processo como um todo ocorre de maneira dinâmica e diferentemente ao longo do tecido radicular analisado. Entretanto, uma análise detalhada das amostras mostrou que ocorre um processo gradual de colonização da superfície radicular (i.e. 24, 48 e 72h após a inoculação). Tendo em vista que após 72h foi possível observar uma grande

quantidade de células sobre os tecidos radiculares, este tempo foi utilizado para o estudo da análise do transcriptoma envolvido nesta interação bactéria-planta.

Uma amostra do material vegetal controle e do material sonicado (após o processamento para remoção de células aderidas por biofilme) também foram submetidas à análise por MEV. Os resultados mostram que a técnica de sonicação possibilitou uma remoção não total, porém significativa, das células bacterianas aderidas às raízes (Figuras 3.2D). Outro fator importante observado foi que este processamento de remoção não gerou nenhuma ruptura ou fissura celular nos tecidos radiculares e nas células bacterianas, auxiliando dessa forma na manutenção de seu perfil de expressão gênica.

A análise do material do tratamento controle (Figuras 3.2E) mostra que, mesmo realizando a desinfecção superficial e cultivando as plântulas sobre condições axênicas, micro-colônias bacterianas, possivelmente não cultiváveis, aparecem claramente aderidas aos tecidos radiculares das plântulas. Outros autores observaram o mesmo em plantas de *Catharanthus roseus* e *Nicotiana clevelandii*, onde bactérias foram encontradas em plantas cultivadas sob condições *in vitro* (ANDREOTE et al. 2006). Entretanto, tal fato não compromete o presente estudo, pois a filtragem do transcriptoma (como descrito no item 3.8.2), juntamente com a baixa abundância de tais organismos quando comparados à bactéria inoculada dão suporte as inferências realizadas.

Figura 3.2 - Monitoramento da aderência e crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 no tecido radicular das plântulas de soja. (A) material coletado 24h após a inoculação; (B) 48h após a inoculação e (C) 72h após a inoculação; (D) tratamento controle – não inoculado; e (E) raízes após o tratamento por sonicação para remoção das células bacterianas aderidas por meio da formação de biofilme

4.3 Processamento de ácidos nucleicos

4.3.1 Processamento do DNA genômico

O DNA genômico extraído de *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresentou valor de razão A_{260}/A_{280} de 1,88 e concentração de $38,51 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Um volume de $35\mu\text{L}$ desta amostra foi concentrado a $100 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, $1\mu\text{L}$ foi submetido à eletroforese em gel de agarose e $10 \mu\text{L}$ (aproximadamente $1 \mu\text{g}$) foi enviado para o sequenciamento do genoma deste organismo.

4.3.2 Processamento do RNA

A extração de RNA total das amostras de cada tratamento, conduzidas em duplicatas e submetidas à eletroforese desnaturante em gel de agarose, gerou perfis os quais mostram uma boa eficiência do processo de extração e obtenção de RNAs de alta qualidade (Figura 3.3a). A integridade do RNA total extraído pode ser inferida pela intensidade da banda 16S rRNA sendo de 1,5 a 2 vezes maior que da banda 23S rRNA. Tal parâmetro deve ser observado, pois rRNAs degradados na amostra podem gerar uma baixa eficiência de enriquecimento de mRNA devido à falhas no processo de hibridação sanduíche utilizado pelo kit MICROBExpress (item 3.5.4). O ideal, e recomendado neste trabalho, é que após cada etapa de processamento de RNA (i.e. extração, enriquecimento de mRNA e possivelmente amplificação de mRNA) as amostras sejam analisadas em aparelho *Agilent bioanalyser* (RNA nano6000 chip), com o objetivo de obter um análise real da concentração de cada tipo de molécula de RNA (i.e. tRNA, rRNA, sRNA, etc). Entretanto, devido a não disponibilidade de tal equipamento, uma amplificação de mRNA enriquecido foi conduzida e analisada em gel de agarose desnaturante. Com este tipo de análise, a qualidade do enriquecimento foi observada pela não visualização da amplificação de bandas preferenciais nas amostras (Figura 3.3b).

Figura 3.3 - Perfis eletroforéticos das amostras de RNA utilizadas no presente estudo. (a) amostras de RNA total extraídos em duplicata para cada um dos tratamentos; e (b) amostras amplificadas para cada um dos tratamentos, comparativamente a uma amostra controle não enriquecida

O processo de enriquecimento de mRNA partiu da concentração total de RNA extraído de cada amostra. A concentração final obtida após este processamento mostra que a eficiência de remoção (i.e. diminuição da concentração) variou entre 81 e 91% (Tabela 3.1). Esta redução já era esperada uma vez que a concentração de mRNA em amostras de RNA total extraídos de células bacterianas pode variar na ordem de 1 a 5% (SOREK; COSSART, 2010).

Após a remoção dos rRNAs, o processo de amplificação de mRNA foi realizado por 14h e a ordem de amplificação apresentou valores variando entre 304 vezes (tratamento planctônico) a 1.778 vezes (tratamento controle) (Tabela 3.2). Tal processamento foi bastante satisfatório uma vez que é comum, após o enriquecimento de mRNA, a concentração final obtida ser baixa, o que limita o processamento posterior deste material. Entretanto, vale ressaltar que para a aplicação da tecnologia de RNA-Seq foram processadas as amostras enriquecidas, mas não amplificadas, uma vez que não se tinha clara a idéia de correlação de amplificação entre o material enriquecido e o resultante da amplificação. Uma nova discussão sobre este tópico é explorada na descrição da utilização destes mRNAs amplificados para a síntese de cDNA e quantificação de um gene *housekeeping* por meio de qPCR (item 4.4).

Tabela 3.1 - Detalhamento das concentrações de RNA empregadas em cada processamento e eficiência do processo de enriquecimento de mRNA
*[] - concentração

Amostra	A₂₆₀/A₂₈₀	[] inicial (ng.µL⁻¹)	[] inicial utilizada no processo de enriquecimento (ng)	[] final após enriquecimento - MICROBExpress + MEGAClear (ng)	Porcentagem de remoção
Controle 1.1	2,15	196	9.857	1.811	82%
Controle 1.2	2,12	275	9.639	1.053	89%
Biofilme 1.1	2,12	282	8.468	1.644	81%
Biofilme 1.2	2,01	157	5.645	492	91%
Planctônico 1.1	2,14	358	10.078	1.784	82%
Planctônico 1.2	2,15	191	9.572	1.156	88%

Tabela 3.2 - Rendimento do processo de amplificação de mRNA, realizado por meio do kit MessageAmp™ II-Bacteria Kit, durante 14h

Amostra	[] inicial utilizada no processo de amplificação (ng)	[] final após amplificação (µg)	Rendimento (x)
Controle 1.1	117	208	1.778
Biofilme 1.1	106	108	1.018
Planctônico 1.1	115	35	304

4.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A análise de PCR quantitativo em tempo real permitiu inicialmente a quantificação de um gene de expressão constitutiva (*housekeeping*) (*recA*) nas amostras de RNA previamente amplificadas para cada um dos tratamentos. O valor de eficiência (E) para este gene foi de 1,88 e o valor de R^2 de 0,99. Os valores de Ct médios obtidos para os tratamentos controle, biofilme e planctônico foram de 24,50; 24,37 e 24,15, respectivamente. Estes resultados mostram que, embora a eficiência de amplificação do RNA tenha variado entre os tratamentos (item 4.3.2) a proporção dos genes durante a amplificação foi mantida. Em outras palavras, o processo de amplificação não favoreceu ou amplificou diferencialmente um ou outro mRNA da amostra original. Tal processamento foi eficiente, aumentando a concentração de mRNA inicial em centenas à milhares de vezes e mantendo as proporções de ocorrência de cada mRNA em cada amostra. Assim sendo, a utilização desta metodologia mostra-se como uma opção eficiente no processamento de amostras onde a concentração de células microbianas é limitante. Outra opção encontrada na literatura, é a realização da amplificação de cDNA utilizando, por exemplo, o *GenomiPHITM V2 method* (GE Healthcare). Entretanto, para tal metodologia, um volume inicial mínimo de mRNA é necessário para a conversão em cDNA e, adicionalmente, após o processo de amplificação, os cDNA gerados possuem extremidades ramificadas, as quais devem ser submetidas a tratamento com enzimas específicas (e.g. nuclease S1) (GILBERT et al., 2008; ZHANG et al., 2006).

Posteriormente, a quantificação de seis genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6, candidatos a serem expressos diferencialmente na interação bactéria-planta, apresentou um primeiro indício da expressão diferencial destes genes entre os tratamentos (Figura 3.4), com destaque para o gene *mxoF*, o qual mostrou uma repressão significativa em sua expressão no tratamento planctônico.

Figura 3.4 - Expressão relativa de seis genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6, candidatos a serem expressos diferencialmente na interação bactéria-planta

A especificidade das reações foi confirmada para cada conjunto de iniciadores por meio da visualização das curvas de desnaturação apresentando picos únicos. A eficiência da reação (E) para cada um dos genes analisados e os valores de R^2 encontram-se descritos na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Valores de eficiência (E) e R^2 médios para cada conjunto de iniciadores utilizados na quantificação relativa dos genes *mxoF*, *acdS*, *patatin*, *crtI*, *phoU* e *sss*

	Genes					
	<i>mxoF</i>	<i>acdS</i>	<i>patatin</i>	<i>crtI</i>	<i>phoU</i>	<i>sss</i>
E	1,81	1,80	1,88	1,86	1,87	1,89
R^2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99

Devido ao processamento de RNA realizado anteriormente a esta análise, a aplicação da técnica de qPCR não teve como objetivo inferir sobre a expressão diferencial de genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 entre os tratamentos empregados, mas sim permitir uma primeira visualização de que havia uma diferença significativa entre estes tratamentos, e assim se proceder com as análises de RNA-Seq, visando gerar um amplo perfil de dados qualitativos e quantitativos da expressão de genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 em cada tratamento.

4.5 Obtenção das sequências e montagem genômica

O pirosequenciamento do DNA genômico de *M. mesophilicum* SR1.6/6 gerou 635.659 *reads*, com um tamanho médio de fragmento de 398 bases e moda de 480 bases, resultando em um total de 253.143.785 bases lidas (253 Mb), e uma cobertura genômica estimada de 37 vezes. A porcentagem de *reads* filtrados por *Mixed* e *Dot filters* foram de 8.30% e 0.76%, respectivamente. O valor de % *Mixed filtered* refere-se ao número de *reads* retirados devido ao sequenciamento simultâneo de duas ou mais sequências distintas, oriundas de um mesmo *bead*, enquanto que o valor de % *Dot filtered* remove sequências que não apresentaram nenhuma incorporação após três ciclos de nucleotídeos, durante o processo de sequenciamento.

A montagem do genoma *de novo*, com a utilização de aproximadamente 99,35% dos *reads*, resultou na obtenção de 242 *contigs*, sendo que deste total 55 *contigs* foram removidos por serem *singletons* ou menores que 200 bases. Somente os 187 *contigs* restantes foram considerados nas análises posteriores, os quais apresentaram uma porcentagem de GC de 69,5%. A figura 3.5a mostra a distribuição destes *contigs* de acordo com seu tamanho em bases. Esta porcentagem de GC esta de acordo com os valores descritos para o gênero *Methylobacterium*, visto que os oito genomas já sequenciados apresentam valores de GC variando entre 68,0 e 71,5%.

A plataforma gsAssembler do programa Newbler, empregada para a montagem *de novo* deste genoma, foi capaz de montar um total de 6.561.094 bases, e estimou o tamanho do genoma em 6.8 Mpb. De acordo com os genomas de *Methylobacterium* já sequenciados, este gênero bacteriano apresenta sequências genômicas variando entre 5,47 Mpb (*Methylobacterium extorquens* PA1) e 7,78 Mpb (*Methylobacterium nodulans* ORS2060).

Uma análise de somatório de tamanhos de *contigs*, partindo dos maiores para os menores, foi realizada com o objetivo de gerar uma visualização gráfica da cobertura genômica obtida no processo de pirosequenciamento (Figura 3.5b). É possível observar que o *draft* deste genoma representa algo próximo de 96% do genoma completo, restando aproximadamente 300 Kb a serem incorporadas para a obtenção desta sequência genômica completa.

Figura 3.5 - (a) Distribuição dos *contigs* obtidos no presente estudo de acordo com seu tamanho em bases; e (b) cobertura genômica obtida no sequenciamento de acordo com o tamanho médio estimado pelo programa Newbler

No presente estudo, o tamanho médio do genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi estimado por meio do algoritmo de montagem da plataforma gsAssembler. O mais indicado é realizar tal estimativa por meio da eletroforese em gel de campo pulsado, a qual fornece informações estimadas do tamanho médio do genoma, bem como do número e tamanho aproximado de possíveis plasmídeos. Tal metodologia não foi empregada no presente estudo, pois o objetivo final do trabalho não é o completo sequenciamento e anotação genômica e sim a utilização deste genoma como um filtro a ser empregado na análise de genes diferencialmente expressos quando da interação desta bactéria com plântulas de soja.

Adicionalmente ao processo de montagem *de novo*, os *reads* obtidos foram submetidos à montagem por meio de mapeamento em cada um dos oito distintos genomas de *Methylobacterium* spp. disponíveis no banco de dados do NCBI. Tal procedimento foi realizado com o intuito de obter uma visualização geral de cobertura deste *draft* genômico sobre genomas já completamente sequenciados e anotados de *Methylobacterium* spp. disponíveis na literatura (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Características da montagem do genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 sobre os demais genomas de (*Methylobacterium* spp.)

Organismo	Tamanho do genoma (Mpb)	Cobertura obtida (%)	Número de <i>contigs</i> obtidos
<i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4	5.78	27,76	335
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	5.50	28,20	356
<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4	5.94	27,40	351
<i>Methylobacterium extorquens</i> PA1	5.47	27,32	318
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS2060	7.78	22,73	202
<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	5.80	28,89	381
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM2831	6.08	66,99	1.848
<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46	7.66	23,99	251

Estes resultados mostram que a montagem realizada sobre o genoma de referência *M. radiotolerans* JCM2831 foi a que apresentou uma maior porcentagem de cobertura (66,99%). Esta observação sugere que, possivelmente, este seja o genoma mais próximo filogeneticamente ao sequenciado neste trabalho. Da mesma forma, se o número de *contigs* formados for comparado, a montagem sobre o genoma de *M. radiotolerans* JCM2831 também foi o que apresentou o maior valor (1.848 *contigs*), sugerindo que apesar de haver similaridades entre estas sequências genômicas, a organização estrutural de cada genoma pode ser muito distinta, ou seja, com translocações e posicionamento dos genes diferencialmente dispersos em cada um destes genomas. Entretanto, é necessário que o sequenciamento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 seja finalizado para que estudos mais específicos de comparação entre estes genomas sejam realizados.

4.6 Anotação genômica

A anotação dos 187 *contigs*, contendo 6.561.094 bases, foi realizada por meio da plataforma RAST (AZIZ et al., 2008), e gerou um total de 6.459 características anotadas, as quais incluem *PEGs* (*protein encoding gene*) – que é equivalente à *CDS* (*coding sequence*); e RNAs (tRNAs, rRNAs e outros pequenos RNAs). Após esta anotação rápida, estes genes foram alocados em subsistemas, fornecendo uma visão qualitativa destes genes anotados de acordo com sua função ou grupo pré-estabelecido (Figura 3.6).

Figura 3.6 - Distribuição dos genes anotados por meio da plataforma RAST de acordo com sua categoria em cada subsistema

O banco de dados da plataforma RAST possui atualmente dois outros genomas de *Methylobacterium* anotados e disponíveis para consulta. A tabela 3.5 visa fornecer uma visão comparativa entre estes genomas e *M. mesophilicum* SR1.6/6.

Tabela 3.5 - Comparação de parâmetros anotados entre *M. mesophilicum* SR1.6/6, *M. extorquens* PA1 e *M. sp.* 4-46. Dados obtidos na plataforma RAST (<http://www.rast.nmpdr.org>)
*CDS – coding sequence; **RNAs – incluem tRNAs, rRNAs e outros pequenos RNAs

Organismo	Número de CDS*	Número de RNAs**	Alocados em subsistemas (%)	Não alocados em subsistemas (%)
<i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	6.410	49	36	64
<i>M. extorquens</i> PA1	4.449	73	38	62
<i>M. sp.</i> 4-46	6.040	81	37	63

A plataforma RAST também disponibiliza, de acordo com a anotação realizada, a visualização de perfis e rotas metabólicas presentes no genoma. Devido a não obtenção da sequência genômica completa de *M. mesophilicum* SR1.6/6 neste trabalho, não foram realizadas inferências sobre o metabolismo desta bactéria. Entretanto, este é um vasto campo a ser explorado em análises futuras. Adicionalmente, é necessário ressaltar que todo o processo de anotação genômica deste trabalho foi realizado por meio de plataformas automatizadas. Assim sendo, é necessário que após a obtenção da sequência genômica completa deste organismo, este genoma seja submetido a uma nova anotação e curadoria manual, com o objetivo de obter maior precisão de anotação antes de seu depósito público nos bancos de dados. Tais procedimentos foram recentemente discutidos por Petty (2010), mostrando que os grandes avanços em plataformas de sequenciamento de DNA também trazem grandes problemas com relação à correta montagem e anotação genômica dos organismos.

4.7 Análise transcriptômica de *M. mesophilicum* SR1.6/6 em interação com a planta hospedeira

Devido à obtenção de quantidades diferentes de sequências geradas para cada tratamento (Tabela 3.6), todas as análises quantitativas basearam-se em dados normalizados, dividindo-se a ocorrência de cada grupo de genes pelo total de sequências obtidas em cada tratamento. Inicialmente, análises de mapeamento destes transcritos, realizadas separadamente para cada tratamento sobre os *contigs* genômicos previamente obtidos, resultaram em um total de 207.797 sequências mapeadas. Estas sequências foram selecionadas e submetidas a uma análise de *cluster*, gerando um total de 1.360 *contigs* de transcritos únicos. Após a extração de dados quantitativos e a identificação dos transcritos em cada tratamento foi observado que, mesmo após realização do enriquecimento de mRNA, uma grande quantidade de sequências de rRNA foram obtidas em todos os tratamentos (Tabela 3.6). Tal ocorrência influenciou na quantidade de sequências de mRNA analisadas, mas não comprometeu o presente estudo, visto que foi obtido um total de 3.354, 6.024 e 3.985 sequências de mRNA referente aos tratamentos controle, biofilme e planctônico, respectivamente. Vale ressaltar que mesmo o sequenciamento genômico não estando completo, uma porcentagem significativa dos *reads* foram mapeados. Entretanto, ainda há uma elevada quantidade de sequências, as quais devem ser analisadas posteriormente ao sequenciamento completo deste genoma (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Descrição quantitativa dos *reads* transcriptômicos obtidos em cada tratamento, porcentagem de *reads* mapeados e abundância de rRNAs obtidos nas amostras

Tratamentos	Número total de <i>reads</i> obtidos	% de <i>reads</i> mapeados	% de rRNA em <i>reads</i> mapeados	% rRNA na amostra original
Controle	76.631	64,68	93,23	60,31
Biofilme	112.642	74,69	92,84	69,35
Planctônico	119.944	61,76	94,62	58,45

O delineamento deste projeto e as metodologias aplicadas foram baseados em uma ampla revisão bibliográfica. No que diz respeito ao processo de enriquecimento de mRNA, optou-se por utilizar um modelo descrito para o estudo metagenômico/metatranscriptômico (GILBERT et al., 2008). Neste trabalho os autores descrevem que a eficiência de remoção de rRNA, tRNAs e outros pequenos RNAs microbianos em amostras marinhas foi superior a 95%. Por outro lado, alguns autores têm criticado a utilização de tais kits, os quais por se basearem na hibridação em

regiões específicas do rRNA, podem vir à apresentar variações significativas na eficiência de enriquecimento, de acordo com a espécie microbiana estudada (PORETSKY et al., 2005; MCGRATH et al., 2008).

Do total de *contigs* de transcritos obtidos, foi realizada uma filtragem, com o objetivo de reduzir este número (1.360) a algumas centenas de genes, com maiores diferenças na expressão entre os tratamentos empregados. Para isto, foram empregados os parâmetros de ocorrência de *reads* entre os tratamentos (>7) e seleção daqueles que apresentavam expressão diferencial entre os tratamentos. Assim sendo, foi obtido um total de 280 *contigs* de transcritos de *M. mesophilicum* SR1.6/6 diferencialmente expressos entre os tratamentos (Figura 3.7).

Figura 3.7 - *Heat map* dos 280 *contigs* de transcritos diferencialmente expressos entre os tratamentos controle, biofilme e planctônico. Os dados estão plotados com relação à média de expressão de cada gene, calculada individualmente. A visualização gráfica foi gerada por meio do programa GeneCluster 3.0. A coloração verde e vermelha indica, respectivamente, a diminuição e o aumento da expressão de cada *contig* de transcrito em cada tratamento

O agrupamento destes perfis demonstrou a formação de grupos de genes mais expressos em cada tratamento. De maneira geral, foi observado que a colonização da superfície das raízes das plântulas de soja (tratamento biofilme) promoveu uma alteração significativa da expressão de genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6. Uma análise mais detalhada mostrou que alguns grupos de genes únicos, como por exemplo, genes envolvidos no processamento de metanol/etanol, foram fortemente ativados neste tratamento (Figura 3.8a). Esta observação se justifica devido à aderência destas bactérias no entorno das raízes, as quais podem atuar como receptores primários de compostos uni-carbonados liberados durante, por exemplo, a síntese de parede celular (GALBALLY; KIRSTINE, 2002). Sy et al. (2005) demonstraram por meio da utilização de mutantes metilotróficos, que este metabolismo é um importante fator competitivo de *Methylobacterium* no processo de colonização rizosférica das plantas. Foi observado também que outros genes, como os envolvidos na biossíntese de porinas, as quais são proteínas relacionadas ao transporte de moléculas entre o meio externo e interno à célula, foram mais expressos neste tratamento, possivelmente atuando como um mediador de comunicação entre as células aderidas ao biofilme e auxiliando no processo de adesão entre as células (DANHORN; FUQUA, 2007). O aumento na expressão de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo na superfície da planta e genes relacionados com a produção de sideróforos também foi observado, bem como genes relacionados ao sistema de secreção do tipo I, síntese e reciclagem de peptidoglicanos, multiplicação celular e formação de biofilme maduro (Figura 3.8). Gourion et al. (2006) também observaram o aumento da expressão de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo por meio de análise proteômica de células de *M. extorquens* removidas durante o processo de colonização epifítica. Tal metabolismo é referenciado pelos autores por atuar ativamente no processo de adaptação das células à superfície foliar. Por fim, foi verificada a ativação de genes envolvidos na biossíntese de hopanóides (Figura 3.8e), que são uma classe de lipídeos triterpenóides pentacíclicos, comumente encontrado em membranas de bactérias descritas em associação com plantas (e.g. gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Frankia* e *Bradyrhizobium* (KANNENBERG; PERZL; HARTNER, 1995)). López-Lara et al. (2003), descreveram a presença de hopanóides como importantes estabilizadores de membrana, atuando na adaptação da bactéria a condições de microaerofilia e ao aumento de acidez do meio, fatores os quais são comumente descritos na rizosfera das plantas.

Apesar de autores como Mark et al. (2005) referenciarem que o crescimento de bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa* PA01, podem ter seu padrão de expressão significativamente alterado em meio de cultivo suplementado com exsudados radiculares, tais observações não haviam sido comprovadas *in vivo*. Este trabalho mostra que o perfil de expressão observado na interação física entre a bactéria e a planta (tratamento biofilme), apresenta diferenças muito maiores no padrão de expressão do que o encontrado entre os tratamentos controle e planctônico (àquele interagindo somente com exsudados radiculares). Foi verificado que apenas alguns genes tiveram seu perfil alterado igualmente nos tratamentos biofilme e planctônico. Entre estes poucos, destaca-se um gene da família de reguladores transcricionais AraC (Figura 3.8f), os quais são descritos na regulação de genes envolvidos com a patogenicidade e produção de toxinas.

(a) Metabolismo de etanol/metanol

(b) Transporte de macromoléculas e produção de sideróforos

(c) Síntese e reciclagem de peptidoglicanos - multiplicação celular

(d) Multiplicação celular e formação de biofilme maduro

(e) Biossíntese de hopanóides

(f) Regulação de genes envolvidos com patogênese e produção de toxinas

(g) Genes associados a estresse oxidativo na superfície da planta

Figura 3.8 - Detalhes do perfil de expressão de genes diferencialmente expressos entre os tratamentos, relacionados a diferentes metabolismos celulares, como processamento de metanol/etanol (a); transporte de macromoléculas e produção de sideróforos (b); metabolismo de peptidoglicanos (c); multiplicação celular e maturação de biofilme (d); biossíntese de hopanóides (e); genes envolvidos com patogênese e produção de toxinas (f); e genes associados a estresse oxidativo (g). A primeira coluna a esquerda representa o tratamento biofilme, seguida do tratamento controle e planctônico, respectivamente. A coloração verde e vermelha indica, respectivamente, a diminuição e o aumento da expressão

No tratamento planctônico, foi observada a ativação de genes envolvidos principalmente com a multiplicação celular, como os genes codificadores de proteínas associadas ao ribossomo e outras proteínas relacionadas à multiplicação e reparo de DNA e síntese de ATP. Isto pode indicar que, a célula ao receber no ambiente os exsudados radiculares, não reconhece diretamente isto como o efeito de uma planta. Porém, uma vez com o crescimento e multiplicação acelerado, esta pode ter uma vantagem aos demais organismos do solo, sendo mais eficiente no mecanismo de quimiotaxia, o que pode aumentar o poder competitivo deste organismo na colonização da rizosfera das plantas. Uma vez na rizosfera, a alteração da expressão gênica pode levar a formação de biofilme, o qual mantém a aderência da bactéria à planta, servindo como base para a colonização endofítica. Esta capacidade de produção de biofilme nas raízes das plantas atuando como um primeiro mecanismo na colonização da endofítica foi previamente demonstrado em plantas de *Catharanthus roseus* e *Nicotiana clevelandii* (ANDREOTE et al., 2006) e cana-de-açúcar ROSSETTO et al., *in press*).

Por fim, foi observado que os genes diferencialmente expressos no tratamento controle são, em sua grande maioria, genes de proteínas hipotéticas e/ou genes relacionados à manutenção do metabolismo celular das células. Entretanto, os resultados sugerem que durante a interação com a planta hospedeira, estes genes de metabolismo celular primário são reprimidos, permitindo a indução de genes secundários, os quais estão diretamente relacionados ao metabolismo de compostos exsudados pelas raízes e/ou que respondem a essa interação e, portanto, envolvidos no processo de interação bactéria-planta.

Pode-se concluir, portanto, que apesar do sistema bactéria-planta-rizosfera ser complexo e incluir uma ampla gama de variáveis genóticas e ambientais, o desenvolvimento e aplicação de tal modelo foi eficiente na elucidação *in vitro* de mecanismos de *M. mesophilicum* SR1.6/6 ativados no processo de interação. Este trabalho gerou um grande volume de dados, os quais podem servir como base para estudos futuros, visando empregar esta bactéria como modelo de estudos na caracterização espacial e temporalmente de seu padrão de expressão gênica, bem como contribuir para um melhor entendimento da dinâmica desta bactéria e de seu metabolismo metilotrófico, atuando ativamente no sucesso na colonização epifítica e endofítica de diversas espécies de plantas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível o desenvolvimento e aplicação de um modelo experimental empregado no estudo *in vitro* da interação entre *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 e plântulas de soja, o qual pode ser aplicado em outros estudo de associação entre microrganismos e plantas.

Além deste modelo, o sequenciamento genômico do isolado SR1.6/6 de *Methylobacterium mesophilicum* resultou na obtenção do *draft* deste genoma, representando aproximadamente 96% de sua sequência completa, com um conteúdo GC de 69,5%. A obtenção deste genoma poderá servir como base para estudos futuros visando principalmente caracterizar seu padrão de expressão temporal com diversas plantas, bem como servir como base para análises comparativas e estudos relacionados à evolução de genomas.

A tecnologia de RNA-Seq foi utilizada de forma inovadora para o estudo da interação bactéria-planta, elucidando a expressão diferencial de genes bacterianos quando em contato com a planta hospedeira. O amplo padrão de expressão gênica obtido foi apenas esboçado neste trabalho. Outros trabalhos podem ser desenvolvidos visando uma caracterização minuciosa destes transcritos, os quais devem ser realizados após a obtenção da sequência genômica completa e correta montagem e anotação genômica.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, R.T.; SALLES, J.F.; MARCON, J.; LABATE, C.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culture-Independent Assessment of Rhizobiales-Related Alphaproteobacteria and the Diversity of *Methylobacterium* in the Rhizosphere and Rhizoplane of Transgenic Eucalyptus. **Microbial Ecology**, Menlo Park, v. 57, p. 82–93, 2009.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; OVERBEEK, L.S.V.; ELSAS, J.D.V.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **National Research Council of Canada Research Press**, Ottawa, v. 52, p. 419–426, 2006.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 4906–4914, 2002.
- 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.
- AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G.J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A.L.; OVERBEEK, R.A.; MCNEIL, L.K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G.D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 1–15, 2008.
- BALTRUS, D.A.; AMIEVA, M.R.; COVACCI, A.; LOWE, T.M.; MERRELL, D.S.; OTTEMANN, K.M.; STEIN, M.; SALAMA, N.R.; GUILLEMIN, K. The Complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain G27. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, p. 447–448, 2009.
- BASILE, D.V.; BASILE, M.R.; LI, Q.Y.; CORPE, W.A. Vitamin B₁₂-stimulated growth and development of *Jungermannia leiantha*. Grolle and *Gymnocolea inflata* (Huds.) Dum. (Hepaticae). **The Bryologist**, College Station, v. 88, p. 77–81, 1985.
- BASSALIK, K. Ueber die Verarbeitung der Oxalsäure durch *Bacillus extorquens* n. sp. **Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik**, Leipzig, v. 53, p. 255–302, 1913.
- BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; SAYERS, E.W. Genbank. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, D26–D31, 2009.

BLOOM, J.S.; KHAN, Z.; KRUGLYAK, L.; SINGH, M.; CAUDY, A.A. Measuring differential gene expression by short read sequencing: quantitative comparison to 2-channel gene expression microarrays. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 221, 2009.

BOGAS, A. C. **Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros**. 2010. 46p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

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

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 3674–3676, 2005.

CORPE, W.A.; RHEEM, S. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 243–249, 1989.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 61, p. 401–422, 2007.

DELMOTTE, N.; KNIEF, C.; CHAFFRON, S.; INNEREBNER, G.; ROSCHITZKI, B.; SCHLAPBACH, R.; VON MERING, C.; VORHOLT, J.A. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 106, p. 16428–16433, 2009.

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

DOURADO, M.N. **Ecologia de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira**. 2010. 132p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

EARTH MICROBIOME PROJECT. Disponível em: <<http://www.earthmicrobiome.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

FLEISCHMANN, R.D.; ADAMS, M.D.; WHITE, O.; CLAYTON, R.A.; KIRKNESS, E.F.; KERLAVAGE, A.R.; BULT, C.J.; TOMB, J.F.; DOUGHERTY, B.A.; MERRICK, J.M.; MCKENNEY, K.; SUTTON, G.; FITZHUGH, W.; FIELDS, C.; GOCAYNE, J.D.; SCOTT, J.; SHIRLEY, R.; LIU, LI.; GLODEK, A.; KELLEY, J.M.; WEIDMAN, J.F.; PHILLIPS, C.A.; SPRIGGS, T.; HEDBLUM, E.; COTTON, M.D.; UTTERBACK, T.R.; HANNA, M.C.; NGUYEN, D.T.; SAUDEK, D.M.; BRANDON, R.C.; FINE, L.D.; FRITCHMAN, J.L.; FUHRMANN, J.L.; GEOGHAGEN, N.S.M.; GNEHM, C.L.; MCDONALD, L.A.; SMALL, K.V.; FRASER, C.M.; SMITH, H.O., VENTER, J.C. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenza* Rd. **Science**, New York, v. 269, p. 496–512, 1995.

FRASER, C.M.; GOCAYNE, J.D.; WHITE, O.; ADAMS, M.D.; CLAYTON, R.A.; FLEISCHMANN, R.D.; BULT, C.J.; KERLAVAGE, A.R.; SUTTON, G.; KELLEY, J.M.; FRITCHMAN, R.D.; WEIDMAN, J.F.; SMALL, K.V.; SANDUSKY, M.; FUHRMANN, J.; NGUYEN, D.; UTTERBACK, T.R.; SAUDEK, D.M.; PHILLIPS, C.A.; MERRICK, J.M.; TOMB, J.F.; DOUGHERTY, B.A.; BOTT, K.F.; HU, P.C.; LUCIER, T.S.; PETERSON, S.N.; SMITH, H.O.; HUTCHISON, C.A.; VENTER, J.C. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, New York, v. 270, p. 397–403, 1995.

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 Paratrangenic Control Strategy of Citrus Variegated Chlorosis. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 47, p. 448–454, 2009.

GALBALLY, I.E.; KIRSTINE, W. The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. **Journal of atmospheric chemistry**, Dordrecht, v. 43, p. 195–229, 2002.

GILBERT, J.A.; FIELD, D.; HUANG, Y.; EDWARDS, R.; LI, W.; GILNA, P.; JOINT, I. Detection of Large Numbers of Novel Sequences in the Metatranscriptomes of Complex Marine Microbial Communities. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, e3042, 2008.

GOLD: Genomes OnLine Database v. 3.0. Disponível em: <<http://www.genomesonline.org/>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

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

GREEN, P.N. The genus *Methylobacterium*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Eds.) **The Prokaryotes** 2nd ed., New York: Springer, 1992. p. 2342–2349.

GREEN, P.N.; BOUSFIELD, I.J. A taxonomic study of some Gram-negative facultatively methylotrophic bacteria. **Journal of general microbiology**, London, v. 128, p. 623–638, 1982.

GREEN, P.N.; BOUSFIELD, I.J. Emendation of *Methylobacterium* patt, Cole and Hanson 1976, *Methylobacterium rhodinum* (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971), comb. nov. corrig., and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. **International journal of systematic bacteriology**, London, v. 33, p. 875–877, 1983.

GRISTWOOD, T.; FINERAN, P.C.; EVERSON, L.; WILLIAMSON, N.R.; SALMOND, G.P. The PhoBR two-component system regulates antibiotic biosynthesis in *Serratia* in response to phosphate. **BioMed Central Microbiology**, London, v. 9, p. 1–14, 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**, Cambridge, v. 16, p. 463–471, 2008.

HINTON, J.C.; HAUTEFORT, I.; ERIKSSON, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M. Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, p. 277–282, 2004.

HOLLAND, M.A. *Methylobacterium* and plants. **Recent Research Developments in Plant Physiology**, Rockville, 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.; ELLIOTT, V.J. (Eds.). **Phyllosphere Microbiology**. APS Press: St Paul, Minnesota, 2002. p. 125–135.

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

HOLLAND, M.A.; POLACCO, J.C. Urease-null and hydrogenasenull phenotypes of a phylloplane bacterium reveal altered nickel metabolism in two soybean mutants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 98, p. 942–948, 1992.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, New York, v. 9, p. 868–877, 1999.

HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, London, v. 3, Reviews0003.1–0003.8, 2002.

HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N.C. A changing of the guard. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 11, p. 551–553, 2009.

HYMAN, E. D. A new method of sequencing DNA. **Analytical biochemistry**, New York, v. 174, p. 423–436, 1988.

IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W.W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 2667–2677, 2004.

ISHOEY, T.; WOYKE, T.; STEPANAUSKAS, R.; NOVOTNY, M.; LASKEN, R.S. Genomic sequencing of single microbial cells from environmental samples. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, p. 198–204, 2008.

JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BENA, G.; SY, A.; WILLENS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2269–2273, 2004.

KANNENBERG, E.L.; PERZL, M.; HARTNER, T. The occurrence of hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 127, p. 255–262, 1995.

KATAEVA, I.A.; YANG, S.J.; DAM, P.; POOLE II, F.L.; YIN, Y.; ZHOU, F.; CHOU, W.; XU, Y.; GOODWIN, L.; SIMS, D.R.; DETTER, J.C.; HAUSER, L.J.; WESTPHELING, J.; ADAMS, M.W.W. Genome Sequence of the Anaerobic, Thermophilic, and Cellulolytic Bacterium “*Anaerocellum thermophilum*” DSM 6725. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, p. 3760–3761, 2009.

KNIEF, C.; FRANCES, L.; CANTET, F.; VORHOLT, J.A. Cultivation-independent characterization of *Methylobacterium* populations in the plant phyllosphere by automated ribosomal intergenic spacer analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 2218–2228, 2008.

KNIEF, C.; RAMETTE, A.; FRANCES, L.; ALONSO-BLANCO, C.; VORHOLT, J.A. Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 719–728, 2010.

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

KUKLINSKY-SOBRA, J. **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.

KYRPIDES N.C. Fifteen years of microbial genomics: meeting the challenges and fulfilling the dream. **Nature Biotechnology**, London, v. 27, p. 627–632, 2009.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI-JR, 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, C.W.K.; CHOI, S.J.; CHUNG, K.Y.; SA, T.M. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylotrophic isolates. **Biology Fertility of Soils**, Berlim, v. 42, p. 402–408, 2006.

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

LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE - GENUS *Methylobacterium*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/methylobacterium.html>>. Acesso em: 11 nov. 2010.

LÓPEZ-LARA, I.M.; SOHLENKAMP, C.; GEIGER, O. Membrane lipids in plant-associated bacteria: their biosyntheses and possible functions. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, v. 16, p. 567–579, 2003.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR, BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A.W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜßMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K.H. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. 1363–1371, 2004.

MACLEAN, D.; JONES, J.D.G.; STUDHOLME, D.J. Application of ‘next-generation’ sequencing technologies to microbial genetics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 287–296, 2009.

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

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; RYU, J.H.; SA, T.M. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. **Planta**, Berlim, v. 224, p. 268–278, 2006a.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SA, T.M. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*). **Planta**, Berlim, v. 226, p. 867–876, 2007.

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**, Nankang, v. 45, p. 315–324, 2004.

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

MADHAIYAN, M.; REDDY, B.V.S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; TONGMIN, S. 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, 2006c.

MADHAIYAN, M.; SUNDARAM, S.P.; KANNAIYAN, S. Influence of pink pigmented facultative methylotrophic bacteria on the seedling vigour of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Microbial World**, Osmanabad, v. 4, p. 117–121, 2002.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W.E.; ATTIYA, S.; BADER, J.S.; BEMBEN, L.A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M.S.; CHEN, Y.J.; CHEN, Z.; DEWELL, S.B.; DU, L.; FIERRO, J.M.; GOMES, X.V.; GODWIN, B.C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C.H.; IRZYK, G.P.; JANDO, S.C.; ALLENQUER, M.L.; JARVIE, T.P.; JIRAGE, K.B.; KIM, J.B.; KNIGHT, J.R.; LANZA, J.R.; LEAMON, J.H.; LEFKOWITZ, S.M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K.L.; LU, H.; MAKHIJANI, V.B.; MCDADE, K.E.; MCKENNA, M.P.; MYERS, E.W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J.R.; PLANT, R.; PUC, B.P.; RONAN, M.T.; ROTH, G.T.; SARKIS, G.J.; SIMONS, J.F.; SIMPSON, J.W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K.R.; TOMASZ, A.; VOGT, K.A.; VOLKMER, G.A.; WANG, S.H.; WANG, Y.; WEINER, M.P.; YU, P.; BEGLEY, R.F.; ROTHBERG, J.M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, London, v. 437, p. 376–380, 2005.

MARK, G.L.; DOW, J.M.; KIELY, P.D.; HIGGINS, H.; HAYNES, J.; BAYSSE, C.; ABBAS, A.; FOLEY, T.; FRANKS, A.; MORRISSEY, J.; O'GARA, F. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe–plant interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 102, p. 17454–17459, 2005.

MCGRATH, K.C.; THOMAS-HALL, S.R.; CHENG, C.T.; LEO, L.; ALEXA, A.; SCHMIDT, S.; SCHENK, P.M. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 172–176, 2008.

MORAN M. A. Metatranscriptomics: Eavesdropping on Complex Microbial Communities. **Microbe**, Washington, v. 4, p. 329–335, 2009.

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

NEMECEK-MARSHALL, M.; MACDONALD, R.C.; FRANZEN, J.J.; WOJCEICHOWSKI, C.L.; FALL, R. Methanol emission from leaves: enzymatic detection of gas-phase methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 108, p. 1359–1368, 1995.

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

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

PATT, T.E.; COLE, G.E; BLAND, J.; HANSON, R.S. Isolation and characterization of bacteria that grow on methane and organic compounds as sole sources of carbon and energy. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 120, p. 955–964, 1974.

PEARSON, B.M.; GASKIN, D.J.H.; SEGERS, R.P.A.M.; WELLS, J.M.; NUIJTEN, P.J.M.; VAN VLIET, A.H.M. The Complete Genome Sequence of *Campylobacter jejuni* Strain 81116 (NCTC11828). **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 8402–8403, 2007.

PETTY, N.K. Genome annotation: man versus machine. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 762, 2010.

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.

PORETSKY, R.S.; BANO, N.; BUCHAN, A.; LECLEIR, G.; KLEIKEMPER, J.; PICKERING, M.; PATE, W.M.; MORAN, M.A.; HOLLIBAUGH, T.J. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4121–4126, 2005.

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.

RAST. Disponível em: <<http://www.rast.nmpdr.org/>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

ROSSETTO, P.B. **Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas**. 2008. 148p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ROSSETTO, P.B.; DOURADO, M.N.; QUECINE, M.C.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Specific plant induced biofilm formation in *Methylobacterium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, *in press*.

SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, C.A.; HUTCHISON, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, London, v. 265, p.687-695, 1977b.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 74, p. 5463–5467, 1977a.

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

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

SESHASAYEE, A.S.; BERTONE, P.; FRASER, G.M.; LUSCOMBE, N.M. Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 9, p. 511–519, 2006.

SOREK, R.; COSSART, P. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, p. 9–16, 2010.

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

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

TERRAGENOME: International Soil Metagenome Sequencing Consortium. Disponível em: <<http://www.terragenome.org/>>. Acesso em: 18 nov. 2010.

THE ARB PROJECT. Disponível em: <<http://www.arb-home.de/>>. Acesso em: 22 nov. 2010.

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.; IVANOVA, E.G.; DORONINA, N.V. Aerobic methylophilic bacteria as phytosymbionts. **Mikrobiologiya**, Moskva, v. 70, p. 725–736, 2001 (in Russian).

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. The Human Microbiome Project. **Nature**, London, v. 449, p. 804–810, 2007.

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

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

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

VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; MYERS, E.W.; LI, P.W.; MURAL, R.J.; SUTTON, G.G.; SMITH, H.O.; YANDELL, M.; EVANS, C.A.; HOLT, R.A.; GOCAYNE, J.D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R.M.; HUSON, D.H.; WORTMAN, J.R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C.D.; ZHENG, X.H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P.D.; ZHANG, J.; GABOR MIKLOS, G.L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A.G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V.A.; ZINDER, N.; LEVINE, A.J.; ROBERTS, R.J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A.E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T.J.; HIGGINS, M.E.; JI, R.R.; KE, Z.; KETCHUM, K.A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G.V.; MILSHINA, N.; MOORE, H.M.; NAIK, A.K.; NARAYAN, V.A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D.B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M.L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKUCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y.H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N.N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J.F.; GUIGÓ, R.; CAMPBELL, M.J.; SJOLANDER, K.V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y.H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the human genome. **Science**, New York, v. 291, p. 1304-1352, 2001.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, p. 57–63, 2009.

WU, D.; HUGENHOLTZ, P.; MAVROMATIS, K.; PUKALL, R.; DALIN, E.; IVANOVA, N.N.; KUNIN, V.; GOODWIN, L.; WU, M.; TINDALL, B.J.; HOOPER, S.D.; PATI, A.; LYKIDIS, A.; SPRING, S.; ANDERSON, I.J.; D'HAESELEER, P.; ZEMLA, A.; SINGER, M.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; COPELAND, A.; HAN, C.; CHEN, F.; CHENG, J.F.; LUCAS, S.; KERFELD, C.; LANG, E.; GRONOW, S.; CHAIN, P.; BRUCE, D.; RUBIN, E.M.; KYRPIDES, N.C.; KLENK, H.P.; EISEN, J.A. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. **Nature**, London, v. 462, p. 1056–1060, 2009.

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

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

ZHANG, Z.Y.; LIU, C.; ZHU, Y.Z.; ZHONG, Y.; ZHU, Y.Q.; ZHENG, H.J.; ZHAO, G.P.; WANG, S.Y.; GUO, X.K. Complete Genome Sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, p. 5020–5021, 2009.

ZHANG, K.; MARTINY, A.C.; REPPAS, N.B.; BARRY, K.W.; MALEK, J.; CHISHOLM, S.W.; CHURCH, G.M. Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. **Nature Biotechnology**, London, v. 24, p. 680–686, 2006.