

JENNIFER KATHERINE SALGUERO LONDOÑO

**ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO
NA INTERAÇÃO *Methylobacterium mesophilicum* SR 1.6/6 COM A
PLANTA HOSPEDEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

JENNIFER KATHERINE SALGUERO LONDOÑO

**ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO
NA INTERAÇÃO *Methylobacterium mesophilicum* SR 1.6/6 COM A
PLANTA HOSPEDEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Salguero Londoño, Jennifer Katherine.

Análises da expressão de genes do sistema de secreção na interação *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com a planta hospedeira / Jennifer Katherine Salguero Londoño. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Laboratório de ecologia microbiana e biologia molecular.

Versão do título para o inglês: Gene expression analysis of secretion system during interaction of *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 with the host plant.

1. Bactéria metilotrófica 2. Exsudatos 3. Expressão gênica 4. PCR em tempo real 5. Interação planta-microorganismo I. Araújo, Prof. Dr. Welington Luiz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0196/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jennifer Katherine Salguero Londoño.

Título da Dissertação: Análises da expressão de genes do sistema de secreção na interação *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com a planta hospedeira.

Orientador(a): Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 641/14 referente ao projeto intitulado: “*Anotação dos genes associados à fixação biológica de nitrogênio em *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/2*” sob a responsabilidade de **Jennifer Katherine Salguero Londono**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

DEDICO

A minha amada família...

Pela força, amor e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais Santiago e Teresa, pelo apoio, amor e ajuda em todos os momentos e principalmente por sempre acreditar em mim.

A meus irmãos Diego, Blanca, Sandra e meus sobrinhos Sebastian e Santiago, por estar do meu lado, por compartilhar risos e me animarem sempre a continuar e me manter firme ante toda adversidade.

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo pela orientação, paciência, conselhos, e pelas oportunidades oferecidas, tem toda minha admiração e respeito como pessoa e profissional.

A todos os integrantes do LABMEM, pelas conversas, sorrisos e amizade. Vocês me ajudaram bastante e compartilharam comigo momentos valiosos durante meu mestrado facilitando minha vida e alegrando meus dias.

Ao time Methylo girls: Manu, Daiane e Aline pela orientação, guia e especialmente amizade durante o desenvolvimento do meu projeto. Ao Ricardo Olchanheski, que acabou sendo parte da equipe, tudo meu carinho e respeito, são pessoas admiráveis.

Aos meus amigos; Laura Lima e família, María Alejandra Gonzáles, Dayanne Rodriguez, Sandra Sánchez, Marcela Hernandez, Almir Ferreira, Roger Castillo, Enyd Bentivoglio, Eliane Gonçalves pelos conselhos, apoio, ajuda e incentivo nos momentos que mais precisei.

À Universidade de São Paulo, a CAPES e FAPESP (Proc. 2012/24217-6) pelo financiamento e a secretariade Pós-Graduação, especialmente Gisele pela paciência e ajuda em todos os momentos.

A todas as pessoas que sempre confiaram em mim, e me deram seu apoio em todo momento.

Finalmente agradeço a vida e a Deus pela oportunidade que me deu de vir a outro país para aprender como pessoa e profissional, é um orgulho fazer meu mestrado no Brasil e achar a força para persistir e continuar no caminho. Muchas gracias a todos.

RESUMO

SALGUERO LONDOÑO, J. K. **Análises da expressão de genes do sistema de secreção na interação *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com a planta hospedeira.** 2015. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O gênero *Methylobacterium* é composto por bactérias de coloração rósea, metilotróficas (PPFMs) e que podem colonizar endofiticamente a planta. Algumas espécies deste gênero são capazes de promover o crescimento, aumentar a atividade fotossintética da planta hospedeira e reduzir o ataque de patógenos. A linhagem de *M. mesophilicum* SR1.6/6 é uma bactéria isolada de ramos de citros e devido a sua estratégia de interação com a planta hospedeira e com fitopatógenos, tem sido foco de vários trabalhos. Os mecanismos de interação da bactéria com a planta hospedeira ainda não foram elucidados, porém análises transcritômicas e proteômicas mostram que durante a interação com a planta hospedeira ocorre indução de genes relacionados ao estresse e metabolismo, mas a expressão de genes que codificam proteínas associadas o transporte de moléculas envolvidas com interações bióticas e abióticas no ambiente ainda são pouco conhecidos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos exsudatos da planta hospedeira sobre o crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 e avaliar a expressão de 25 genes envolvidos no transporte. Os compostos secretados pela planta hospedeira (milho e citros) foram avaliados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, enquanto a expressão de genes anotados como pertencentes aos sistemas de secreção tipo I, II, V e bomba de efluxo multidrogas (MDR) foram avaliados no primeiro estágio da colonização da planta hospedeira por *M. mesophilicum*, onde a bactéria deve reconhecer os exsudatos secretados pela planta e posteriormente durante a colonização da raiz da planta hospedeira, com formação de biofilme. Foi observado que as plantas avaliadas secretam moléculas semelhantes, mas em concentrações diferentes. Estes compostos foram principalmente açúcares, ácidos orgânicos, outras moléculas orgânicas, aminoácidos e lipídios, os quais induziram um maior crescimento da planta hospedeira. Foi observado também que a expressão dos genes avaliados é regulada pela presença da planta hospedeira e/ou de seus exsudatos. Foi observado que os genes relacionados ao sistema de secreção tipo II, o complexo SEC e as bombas de efluxo de multidrogas são induzidos durante a interação com as plantas hospedeiras, enquanto genes do sistema de secreção dependente de TAT foram reprimidos. Estes resultados sugerem que durante a interação *M. mesophilicum*-planta, os exsudatos da planta promovem o crescimento desta bactéria endofítica, a qual regula diferencialmente a expressão de genes responsáveis pelo transporte de moléculas.

Palavras-chave: Bactéria metilotrófica. Exsudatos. Expressão gênica. PCR em tempo real. Interação planta-micro-organismo.

ABSTRACT

SALGUERO LONDOÑO, J. K. **Gene expression analysis of secretion system during interaction of *Methylobacterium mesophilicum* SR 1.6/6 with the host plant.** 2015. 113 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Methylobacterium genus is composed by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria that are able to promote plant growth, increase photosynthetic activity of the host plant and reduce the incidence of pathogens. The *M. mesophilicum* strain SR1.6/6 is a bacterium isolated from citrus and due the interaction with the host plant has been the focus of several studies. The mechanisms of interaction of the bacterium with the host plant have not yet been elucidated, some transcriptomic and proteomic studies show the hyper-regulation of genes related to stress in the plant interaction. Therefore, this project evaluated the expression of some genes related to the codification of protein secretion system that could be involved in *M. mesophilicum*-corn (*Zea miz*) and citros (*Citrus sinensis*) interaction during the colonization of this bacterium through the recognition of root exudates compounds released by the host plant. In this work, we evaluated the bacterial cells adhered to the roots forming biofilm and bacterial cells in suspension (planktonic-celled cells interacting only with root exudates) compared to control (bacterial cells without plant). For expression analysis, genes that encode protein from secretion system (type I, II, V and VI), multidrug efflux pumps and ABC transporters related to proteins transporters were evaluated by qPCR. Then, the *M. mesophilicum* SR1.6/6 genome was reevaluated and genes related to transport systems (type I, II and V protein secretion system, multidrug efflux pumps and related ABC transportes, general secretory pathway SEC dependent and twin arginine translocase system (TAT)) which allow the export, extrusion and translocation of effector molecules during interaction with the host plant. The exsudates released by the host (mayze and citrus) roots, identified by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), are composed mainly by sugars, organic acids, organic compounds, aminoacids and lipids. Analysis of the gene expression showed that during interaction with corn and *citrus* type II secretion system, SEC complex and multidrug efflux pumps were up-regulated while TAT pathway was down-regulated, suggesting a differential activation of secretory machinery for translocation of protein during the interaction between *M. mesophilicum* SR1.6/6 and the host plant.

Keywords: Methylothetic bacteria. Root exsudates. Gene expression. qPCR. Plant-bacteria interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistemas de secreção em bactérias gram negativas.....	24
Figura 2 – Sistemas de secreção sec-independente.....	31
Figura 3 – Sistemas de secreção dependentes de SEC e TAT.....	35
Figura 4 – Organização gênica da bomba de efluxo de multidrogas dos genes TolC, AcrB, AcrA e acrR.....	36
Figura 5 – Estrutura da bomba de efluxo de multidrogas do sistema AcrAB-TolC de <i>E. coli</i>	37
Figura 6 – Delineamento experimental para o estudo da interação entre SR1.6/6 e a planta hospedeira.....	43
Figura 7 – Montagem das curvas de crescimento para as plantas hospedeiras.....	45
Figura 8 – Curvas de crescimento de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 em meio CHOI3 com metanol.....	46
Figura 9 – Porcentagem das classes de compostos obtidos por GC-MS em: 1) Citros (sem bactéria) e 2) Citros na presença de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	47
Figura 10 – Porcentagem das classes de compostos obtidos por GC-MS em: 1) Milho (sem bactéria) e 2) Milho na presença de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	49
Figura 11 – Organização gênica da proteína de membrana externa TolC associada ao sistema de secreção tipo I e bomba de efluxo de resistência a multidrogas.....	52
Figura 12 – Organização gênica do transportador ABC associado ao sistema de secreção tipo I com a bactéria <i>Bradhyrhizobium elkanii</i> WSM1741.....	55

Figura 13 – Organização gênica do transportador ABC associado ao sistema de secreção tipo I e a proteína da família HlyD comparando com a <i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831.....	57
Figura 14 – Organização gênica do sistema TAT em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	59
Figura 15 – Organização gênica do sistema AcrAB em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	61
Figura 16 – Organização gênica de AcrB em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	63
Figura 17 – Organização gênica de AcrA em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	64
Figura 18 – Organização gênica de AcrB em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	66
Figura 19 - Organização gênica do sistema de secreção tipo II em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	68
Figura 20 – Organização gênica do sistema SecF, SecD e YajC em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	70
Figura 21 – Organização gênica proteína BAM associada ao sistema de secreção tipo V em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	74
Figura 22 - Modelo de Sistema de secreção e bomba de efluxo de multidrogas (MDR) envolvidos na translocação de moléculas em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	75
Figura 23 – Gel de agarose de RNA para os diferentes tratamentos em amostras de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 na presença de A) milho (<i>Zea mays</i>) e B) citros (<i>Citrus sinensis</i>).....	76
Figura 24 – Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema de Secreção tipo II em milho.....	78
Figura 25 - Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema Sec em milho.....	78
Figura 26 - Expressão gênica dos genes envolvidos na via Twin Arginine (TAT) em milho.....	79

Figura 27 - Expressão gênica dos genes envolvidos na bomba de efluxo de multidroga e um transportador ABC em milho.....	80
Figura 28 - Análises da expressão gênica dos sistemas de secreção avaliados por PRC em tempo real para <i>Zea mays</i> na interação com <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	81
Figura 29 - Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema de secreção tipo II em citros.....	82
Figura 30 - Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema SEC em citros.....	83
Figura 31 - Expressão gênica dos genes envolvidos na Via Twin Arginine (TAT) em citros.....	83
Figura 32 - Expressão gênica dos genes envolvidos na Bomba de efluxo de resistência a multidrogas e um transportador do tipo ABC em citros.....	85
Figura 33 - Análises da expressão gênica dos sistemas de secreção avaliados por PRC em tempo real para <i>Citrus sinensis</i> em interação com <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	86
Figura 34 - Contexto gênico do sistema de secreção do tipo VI e proteína Hcp associada ao sistema de secreção do tipo VI em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 locus tag MmSR116_2954.....	87
Figura 35 - Expressão gênica do gene envolvido na codificação da proteína Hcp do Sistema de secreção Tipo VI em Milho e Citros.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos presentes nos exsudatos de citros (com e sem inoculação de SR1.6/6) e nos exsudatos de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	48
Tabela 2 – Compostos presentes nos exsudatos de milho (com e sem inoculação de SR1.6/6) e nos exsudatos de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	50
Tabela 3 – Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao Sistema de Secreção tipo I TolC e seus genes vizinhos.....	51
Tabela 4 - Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao Sistema de Secreção tipo I transportador do tipo ABC e HlyD e seus genes vizinho.....	53
Tabela 5 - Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao Sistema de Secreção tipo I transportador do tipo ABC e a proteína HlyD e seus genes vizinhos em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 comparados com <i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831.....	56
Tabela 6 – Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao Sistema transporte TAT e seus genes vizinhos.....	57
Tabela 7 – Comparação de genes codificadores de proteínas associadas a bomba de efluxo de multidrogas AcrAB, seu regulador AcrR e seus genes vizinhos de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 e <i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831.....	59
Tabela 8 - Comparação de genes codificadores de proteínas associadas a bomba de efluxo de multidrogas AcrB e seus genes próximos de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 e <i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831.....	61
Tabela 9 - Comparação de genes codificadores de proteínas associadas à bomba de efluxo de multidrogas AcrA e seus genes próximos de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 e <i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831.....	63
Tabela 10 – Comparação de genes codificadores de proteínas associadas à bomba de efluxo de multidrogas AcrB e seus genes próximos de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 e <i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831.....	65

Tabela 11 – Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao sistema de secreção do tipo II e seus genes próximos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831.....67

Tabela 12 - Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao sistema SecF, SecD e YajC e seus genes próximos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831.....69

Tabela 13 - Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao sistema SecA e seus genes próximos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831.....71

Tabela 14 – Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao sistema de secreção tipo Va, BamA (outer membrane protein assembly complex, YaeT protein) e seus genes próximos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831..... 73

Tabelas em apêndice

Tabela 1A – Sequências de primers empregadas para Análises da expressão gênica envolvida nos diferentes tipos de sistema de secreção para *Methylobacterium mesophilicum* SR 1.6/6.....110

Tabela 2A – Genes segundo o tipo de sistema de secreção que amplificaram ao serem avaliados por PCR em tempo real para plantas de milho (*Zea mays*), em interação com *M. mesophilicum* SR1.6/6 nos diferentes tratamentos.....112

Tabela 3A - Genes segundo o tipo de sistema de secreção que amplificaram ao serem avaliados por PCR em tempo real para plantas de citros (*Citrus sinensis*), em interação com *M. mesophilicum* SR1.6/6 nos diferentes tratamentos.....113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP binding cassette
AcrA	Acriflavine resistance multidrug efflux pump A
AcrB.	Acriflavine resistance multidrug efflux pump B
BAM	Beta barrel assembly machinery
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry
JGI	Joint Genome Institute's Genome
Kb	Kilobase
MDR.	Multiple drug resistance
MS	Murashige e Skoog meio de cultura
PCR	Reação em cadeia da polymerase
qPCR	Reação quantitativa em cadeia da polymerase
RND	Resistance nodulation cell division
SEC	Secretion system pathway
TAT	Twin arginine translocation pathway
T1SS	Sistema de secreção tipo I
T2SS	Sistema de secreção tipo II
T3SS	Sistema de secreção tipo III
T4SS	Sistema de secreção tipo IV
T5SS	Sistema de secreção tipo V
T6SS	Sistema de secreção tipo VI

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 <i>Methylobacterium</i> spp	18
2.2 <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6.....	19
2.3 Interações planta-microrganismo	22
2.4 Sistemas de secreção em bactérias Gram negativas	23
2.4.1 Via TAT (<i>twin arginine translocase</i>)	24
2.4.2 Sistema <i>sec</i> (<i>general secretion system</i>)	25
2.4.3 Sistemas de secreção independentes de SEC	26
<u>2.4.3.1 Sistema de secreção tipo I (T1SS)</u>	26
<u>2.4.3.2 Sistema de secreção Tipo III (T3SS)</u>	27
<u>2.4.3.3 Sistema de secreção Tipo IV (T4SS)</u>	29
<u>2.4.3.4 Sistema de secreção Tipo VI (T6SS)</u>	30
2.4.4 Sistemas de secreção dependentes de SEC	31
<u>2.4.4.1 Sistema de secreção Tipo II (T2SS)</u>	31
<u>2.4.4.2 Sistema de secreção Tipo V (T5SS)</u>	33
2.4.6 Bomba de Efluxo de Multidrogas (MDR) e família de transportadores ABC	35
3 OBJETIVOS	38
4 MATERIAIS E METODOS	39
4.1 Isolado de <i>Methylobacterium mesophilicum</i> e condições de cultivo.....	39
4.2 Material vegetal e cultivo em condições axênicas	39
4.3 Curvas de crescimento em meio CHOI3	40
4.4 Análises dos exsudatos da planta por GS-MS.....	40
4.4 Anotação manual dos genes associados ao sistema de secreção	41
4.6 Delineamento experimental para Análise da expressão genica.....	41

4.7 Análises da expressão de genes de <i>M. mesophilicum</i> na interação com a planta hospedeira	42
4.8 Quantificação da expressão de genes por qPCR	43
4.9 Análises estatísticas	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Curvas de crescimento em meio CHOI3	45
5.2 Análises dos exsudatos da planta por GS-MS	46
5.3 Anotação manual dos genes associados ao sistema de secreção e bomba de efluxo de multidrogas (MDR) em <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	51
5.4 Análises da expressão de genes de <i>M. mesophilicum</i> na interação com a planta hospedeira	76
5.4.1 Análises da expressão gênica do sistema e secreção em Milho (<i>Zea mays</i>)	77
5.4.2 Análises da expressão gênica em plantas de citros (<i>Citrus sinensis</i>)	81
5.4.3 Análises da expressão gênica de Hcp proteína do sistema de secreção tipo VI	86
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	97
APÊNDICE - Informações adicionais	110

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Methylobacterium* é composto por bactérias de coloração rósea, metilotróficas (PPFMs) capazes de se estabelecer em diferentes nichos na planta hospedeira. Em associação com a planta, algumas espécies deste gênero são capazes de promover o crescimento vegetal, aumentar a atividade fotossintética e reduzir o ataque de patógenos ao hospedeiro. *Methylobacterium* spp. podem estar envolvidas na formação de nódulos e fixação de nitrogênio em fabáceas (leguminosas), além de produzir os reguladores vegetais auxina e citocinina e induzir resistência sistêmica. Este gênero tem despertado grande interesse científico pelo fato de possuir potencial para síntese de produtos biotecnológicos de alto valor agregado como o polihidroxiacetato (PHA) e polihidroxiacrilato (PAA). *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi isolada de ramos de citros e devido à interação com diversas plantas hospedeiras e possivelmente *Xylella fastidiosa*, tem sido foco de vários estudos nas áreas de genômica, proteômica e transcritômica.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-*Methylobacterium* se torna uma estratégia cada vez mais relevante no panorama da agricultura atual, visto que a compreensão dos processos envolvidos na colonização da planta hospedeira pelo endófito permite estabelecer os mecanismos de respostas da planta, incluindo alterações fisiológicas associadas ao aumento da produtividade agrícola. Entre estes mecanismos, cabe ressaltar a secreção de proteínas ou moléculas requeridas para o reconhecimento, adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro por parte da bactéria endofítica. Sabe-se que o estabelecimento da interação entre a planta hospedeira e micro-organismos do solo inicia quando os exsudados da planta são reconhecidos por esta microbiota, a qual leva a ativação de genes que codificam proteínas importantes durante a interação, incluindo proteínas envolvidas com transporte e secreção de moléculas.

Neste contexto, o presente projeto visa avaliar a influência dos exsudatos de citros (*Citrus sinensis*) e milho (*Zea mays*) no crescimento e expressão de genes associados ao transporte de *M. mesophilicum* SR1.6/6. Para isso, os exsudatos da planta foram avaliados por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa, e o seu efeito sobre o crescimento de *M. mesophilicum* avaliado. Além disso, genes envolvidos com transporte foram reanotados no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 e a sua expressão avaliada por PCR quantitativo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Methylobacterium*

O gênero *Methylobacterium* é composto por 51 espécies (<http://www.bacterio.net/methylobacterium.html>) pertencentes à classe Alfa-proteobactéria, caracterizadas por serem Gram-negativas, bastonetes, aeróbias estritas, pigmentação rósea devido à síntese de carotenóides (VAN DIER, 2003) e metabolismo metilotrófico, ou seja são capazes de utilizar compostos de apenas um carbono, tais como metanol e metilamina, como fonte de energia (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998). Este metabolismo metilotrófico ocorre devido à habilidade de oxidar metanol por meio da enzima metanol dehydrogenase (MDH), formando formaldeído, o qual pode ser utilizado no metabolismo primário da célula. Esta habilidade confere à *Methylobacterium* spp. uma importante vantagem competitiva durante a colonização da planta hospedeira em condição de competição (SY et al., 2005).

Este gênero pode ser encontrado em uma variedade de ambientes desde solo, água, ar, solo, sedimentos e ambientes urbanos (MADHAIYAN et al., 2012), podendo estar associadas a diversas espécies de plantas (OMER et al., 2004). *Methylobacterium* spp. podem formar biofilmes na superfície ou colonizar o interior de plantas (ANDREOTE et al., 2006; ROSSETO et al., 2011), onde pode interagir de forma mutualística com diferentes espécies vegetais (DOURADO et al., 2013a, 2015b), tais como soja (KUKLINSKY-SOBRAI, 2003), cana-de-açúcar (ROSSETO et al., 2011), algodão (MADHAIYAN et al., 2006a), amendoim (MADHAIYAN et al., 2006b), citros (ARAÚJO et al., 2001, 2002), pinus (PIRTTILÄ et al., 2000; POHJANEN et al., 2014), eucalipto (ANDREOTE et al., 2009; DOURADO et al., 2013; FERREIRA et al., 2008), crotalária (SY; GIRAUD; JOURAND, 2001), vinca, tabaco (ANDREOTE et al., 2006), morangos (ABANDA-NKPWATT et al., 2006), arroz (DOURADO et al., 2013; POONGUZHALI et al., 2008), tomate (POONGUZHALI et al., 2008) e videira (GAN et al., 2012).

Espécies deste gênero, como *Methylobacterium nodulans*, têm despertado bastante interesse na área agrícola e biotecnológica, devido à sua habilidade de fixar biologicamente nitrogênio e nodular a planta hospedeira (SY et al., 2003), promovendo o crescimento vegetal. Outras espécies de *Methylobacterium* são capazes de produzir reguladores vegetais como

citocinina e auxina e, interagir com patógenos da planta hospedeira (ARAÚJO et al., 2002; HOLLAND, 1997; LACAVA et al., 2004; MADHAIYAN et al., 2006a). *M. extorquens* tem sido usada para a expressão de genes associados ao controle de insetos da ordem Lepidoptera (JAYASHREE et al., 2011) ou como modelo para desenvolvimento de estratégias de controle biológico, promoção do crescimento vegetal (FERREIRA FILHO et al., 2012) ou indução de resistência sistêmica na planta hospedeira (LEE et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2006b). Estes estudos sugerem que embora linhagens selvagens de *Methylobacterium* spp. possam ser utilizadas para o aumento da produtividade vegetal, a aplicação de técnicas de biologia molecular com o intuito de gerar linhagens geneticamente modificadas, pode melhorar o efeito positivo desta bactéria no ambiente.

2.2 *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

Methylobacterium mesophilicum SR1.6/6 foi isolada endofiticamente de ramos de citros (ARAÚJO et al., 2002) e tem sido foco de estudos para o entendimento da sua interação com diferentes plantas hospedeiras, entre elas citros (ARAÚJO et al., 2002), vinca, tabaco (ANDREOTE et al., 2006), cana de açúcar (ROSSETO et al., 2011), arroz, eucalipto (DOURADO et al., 2013) e soja (ARAÚJO et al., 2015). Rosseto et al. (2011) e Andreote et al. (2006) observaram que *M. mesophilicum* SR 1.6/6 é capaz de formar biofilme sobre a planta hospedeira. Além disso, esta linhagem é capaz de sintetizar pelo menos 6 tipos N-acyl-homoserine lactones (AHLs) (POMINI et al. 2009), as quais podem modular a expressão de genes associados à interação desta bactéria com a planta hospedeira (Dourado et al., 2013). De fato, foi observado que o nível de expressão de genes de *M. mesophilicum* envolvidos com a resposta ao estresse (*acdS* e *crtI*) e genes envolvidos com a patogenicidade de bactérias (*phoU* e *patatin*) quando em interação com eucalipto e arroz não foi alterado, sugerindo que a colonização nestas plantas não induz estresse nesta bactérias, e que esta interação pode ser considerada simbiótica devido a ausência da indução de genes relacionados à patogênese.

Neves (2015) anotou o genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 encontrou genes importantes para a interação com a planta hospedeira. Foi observado que esta linhagem SR1.6/6 apresenta genes de síntese de auxina, mas esta via não é dependente do triptofano.

Adicionalmente, a colonização por endófitos pode ser conduzida por alguns sistemas de *quorum sense* (QS), através de sinais moleculares comumente encontradas em bactérias Gram negativas, tais como N-acil-homoserina lactonas (AHLs), as quais estão reguladas pelo sistema LuxI/LuxR (CAMILI; BASLER, 2006). As bactérias podem trabalhar conjuntamente como um organismo multicelular devido a que o sistema QS uma vez a população bacteriana cresce e as concentrações de AHLs aumentam, alcançam um nível que pode regular a transcrição de diferentes genes que podem estar relacionados ao sistema de secreção, formação de biofilme, troca de DNA, entre outros (ZHU; SUN, 2008). A linhagem de *M. mesophilicum* SR1.6/6 é capaz de produzir seis cadeias longas de homoserina lactonas como foi descrito por Pomini et al., 2009. Para este isolado a molécula (*S*)-*N*-dodecanoyl-é capaz de incrementar os níveis de expressão de genes relacionados com interações bactéria-planta, tais como metabolismo bacteriano (*mxoF*), adaptação ao estresse (*crtI* and *sss*), interações com compostos do metabolismo da planta (*acdS* e patogenicidade (*patatina*), demonstrando que a molécula de AHL junto com a densidade bacteriana ativam vários genes relacionados com a interação (DOURADO et al., 2013, 2015).

M. mesophilicum como foi discutido anteriormente é capaz de usar compostos de um carbono, principalmente metanol, formaldeído e formiato (MADHAIYAN et al., 2012), para suas atividades metabólicas além de utilizar compostos de vários carbonos. A habilidade empregar diversas fontes de carbono permite as espécies do gênero *Methylobacterium* colonizar diferentes ambientes incluindo as plantas as quais liberam metanol pelos estomas durante o seu crescimento (ABANDA-NKPWATT et al., 2006). O metabolismo metilotrófico inicia no periplasma onde a enzima metanol desidrogenase (MDH) oxida o metanol em formaldeído. A MDH é formada por um $\alpha_2\beta_2$ tetrâmero com dois sítios ativos, um grupo prostético e um átomo de cálcio (ZHANG; LIDSTROM, 2003). A subunidade maior é codificada pelos genes *mxoF* e *mxoI*, o gene *mxoG* codifica o citocromo C, o principal aceitador de elétrons para a MDH. A subunidade maior da enzima (MxoF) é essencial para a atividade da metanol desidrogenase contendo o grupo prostético PQQ (SKOVRAN et al., 2011), esta enzima é uma quinoproteína que usa a pirroloquinolina quinona (PQQ) como cofator de transferência de dois elétrons para o citocromo C. A oxidação do metanol gera formaldeído (o principal intermediário do metabolismo metilotrófico) o qual pode ser assimilado também no ciclo da serina e usado pela célula ou

oxidado em CO₂ , gerando energia; cada molécula de metanol gera 1 ATP (SKOVRAN et al., 2011).

Outros compostos que regulam o crescimento das raízes das plantas e seu desenvolvimento é o etileno o qual está relacionado com a síntese de auxina. Na biossíntese de etileno, o precursor é o ACC (*1-aminociclopropano-1-carboxilato*) é convertido de SAM (*S-adenosil metionina*) a etileno pela ação da ACC sintase (ACS) e a ACC oxidase (ACO) (GLICK; PENROSE; LI, 1998, GLICK, 2013). A atividade ACS em plantas pode ser aumentada pela produção de Ácido indol acético (IAA), mostrando estas encontram-se relacionadas e podem aumentar o desenvolvimento da bactéria e da planta durante as interações *Methylobacterium-planta* (DOURADO et al., 2015). Adicionalmente, os endófitos carregam vários genes relacionados á interações benéficas com as plantas hospedeiras incluindo o gene *acdS* (HARDOIM et al., 2008). O gene *acdS* codifica para uma enzima ACC deaminase que converte o ACC em amônia (NH₃) e α -cetobutirato. ACC oxidase converte ACC em etileno, o qual age como um modulador de crescimento e também como sinalizador de estresse para a planta. Portanto o micro-organismo endofítico que possui ACC-deaminase pode diminuir os níveis de etileno diminuindo a resposta a estresse e facilitando o estabelecimento da interação (GLICK et al., 1998, 2013; HARDOIM et al., 2008).

A análise do transcriptoma da interação *M. mesophilicum* com diferentes plantas hospedeiras mostrou que os exsudatos radiculares induzem a expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo, seguido da indução de genes de adesão e biofilme durante a colonização da planta hospedeira (ARAÚJO et al., 2015; DOURADO et al., 2012). Adicionalmente, foram desenvolvidos estudos da interação de *M. mesophilicum* SR1.6/6 com a bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* (ARAÚJO et al., 2002; DOURADO et al., 2015; LACAVA et al., 2004), agente causal da CVC (clorose variegada dos citros). Nestes estudos foi observado que a presença das bactérias endofítica *Curtobacterium flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* SR1.6/6 em tecidos internos de plantas assintomáticas de citros pode estimular a produção de compostos ou influenciar de alguma forma o aumento na resistência destas plantas à *X. fastidiosa* ou competir com este fitopatógeno no xilema da planta hospedeira.

Estudos *in vitro* demonstram que os exsudados de *M. mesophilicum* SR1.6/6 reduzem o crescimento de *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2004, 2006), da mesma forma, plantas co-inoculadas com *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *X. fastidiosa* apresentam menor densidade destas bactérias (LACAVA et al., 2006), sugerindo que ocorre competição entre estas bactérias no interior da planta. Tendo em vista que *M. mesophilicum* SR1.6/6 pode ser transmitida de planta para planta por meio da cigarrinha *Bucephalagonia xanthophis* (GAI et al., 2009), a qual também é capaz de transmitir *X. fastidiosa*, pode ser sugerido que a interação entre este fitopatógeno e *M. mesophilicum* SR1.6/6 poderia ocorrer em diferentes ambientes, podendo não somente afetar a transmissão de *X. fastidiosa*, mas também o desenvolvimento dos sintomas da CVC.

2.3 Interações planta-micro-organismos

Os micro-organismos associados as plantas podem colonizar tanto a superfície quanto os tecidos internos destas do hospedeiro (BERG, 2009), este tipo de interação pode resultar em vantagens ou desvantagens para a planta, visto que fungos e bactérias podem causar doenças ou promover o crescimento vegetal, resistência ao ataque de patógenos, disponibilizar nutrientes, aumentar a tolerância ao estresse entre outros efeitos (LUGTENBERG; CHIN-A-WOENG; BLOEMBERG, 2002; MORRISSEY et al., 2004). A primeira etapa para que ocorra essa interação planta-bactéria é o reconhecimento dos compostos exsudados pelas plantas (BAIS, 2005, 2006; DOURADO et al., 2015; LEFEVRE et al., 2013; LI et al., 2013; WALKER; BAIS; GROTEWOLD; VIVANCO, 2003), os quais estão compostos principalmente por açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, bem como flavonóides (LEFEVRE et al., 2013) sendo capazes de atrair micro-organismos específicos e benéficos (HARDOIM et al., 2008), os quais podem estabelecer a interação com a planta hospedeira.

Os mecanismos envolvidos nessa rede de eventos que ocorrem antes e durante a interação bactéria-planta ainda não são muito bem conhecidos, mas estudos de transcriptoma (FERNANDEZ et al., 2012; KARUNAKARAN et al., 2009) e proteoma (GOURION; ROSSIGNOL; VORHOLT, 2006) auxiliam na identificação de genes regulados durante as diferentes fases da interação. Dourado et al., 2015, fizeram o estudo da expressão gênica diferencial entre *X. fastidiosa* em co-cultivo com *M. mesophilicum* SR1.6/6 e outros endófitos de citros como controle, observaram que genes relacionados com o crescimento bacteriano,

especificamente com replicação de DNA e síntese proteica (genes da proteína ribossomal 50S e da enzima topoisomerase) apresentam sua transcrição reprimida quando *X. fastidiosa* é crescida na presença de do isolado **SR1.6/6**, indicando que a presença de *M. mesophilicum* pode estar envolvida na inibição do crescimento do patógeno *X. fastidiosa*, sendo isto previamente demonstrado por Lacava et al., 2004, demonstrando que a população de *X. fastidiosa* foi reduzida por *M. mesophilicum* durante a co-inoculação com planta hospedeira.

2.4 Sistemas de secreção em bactérias Gram negativas

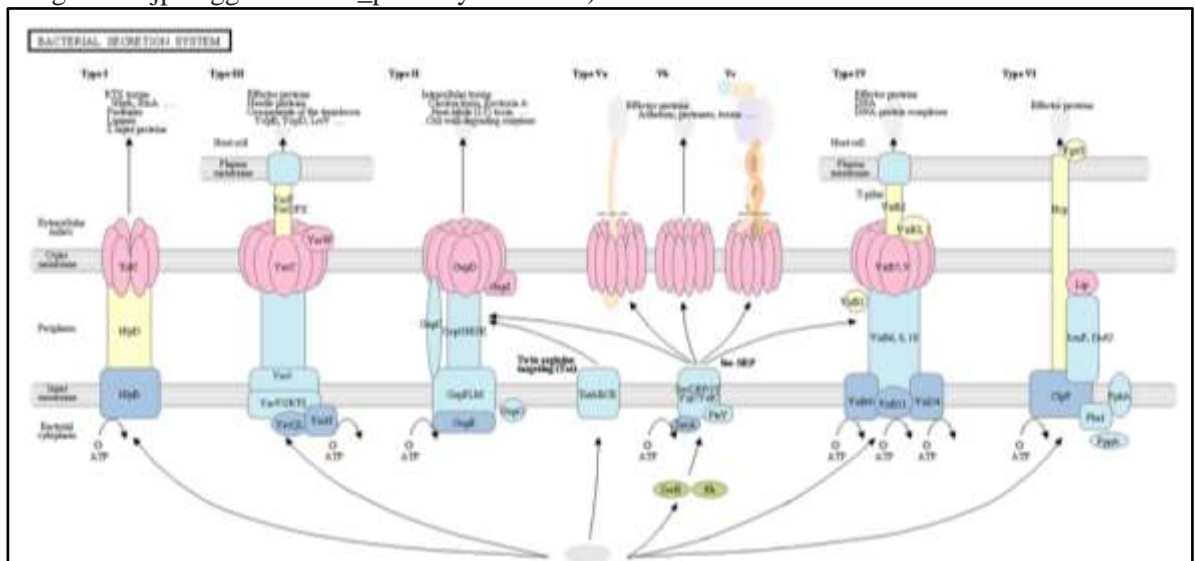
O sistema de secreção foi descrito primeiramente como um fator de patogênese em bactérias patogênicas, permitindo o estabelecimento da infecção na planta, animal ou outro micro-organismo (CHANG et al., 2014). A infecção se inicia com ativação dos sistemas de secreção, onde fatores macromoleculares de virulência, normalmente proteínas ou complexos de ácidos nucleicos com proteínas, são excretados para o citosol da célula hospedeira (no caso dos sistemas do tipo III e IV), onde irão interferir no processo celular do hospedeiro, desempenhando assim um papel fundamental durante a infecção e, também, no desenvolvimento da doença, suprimindo os mecanismos de defesa do hospedeiro (COLLMER, 1999; CORNELIS; VAN GIJSEGEM, 2000; GALÁN; THANASSIE; HULTGREN, 2000). Porém essas proteínas associadas ao sistema de secreção podem também estar envolvidas na modulação das interações de bactérias endofíticas ou simbioses com seu hospedeiro (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). Os sistemas de secreção podem ser classificados em seis tipos diferentes (I, II, III, IV, V e VI), dependendo da forma como é realizada a translocação dos fatores de virulência para a célula hospedeira (CHANG et al., 2014) (Figura 1).

Dentre os seis tipos de sistemas de secreção, três deles utilizam o caminho de secreção geral (GSP - General Secretory Pathway), onde o transporte das proteínas através da membrana interna é realizado pelo sistema sec-dependente, no qual as proteínas a serem secretadas possuem uma sequência sinal na extremidade amino-terminal que será clivada no periplasma (HENDERSON et al., 2004). Estes sistemas são chamados de sec-dependentes (tipo V, chaperone/proteína da membrana externa, tipo II e tipo IV) e são classificados de acordo com a forma em que as proteínas a serem secretadas atravessam a membrana externa (THANASSI; HULTGREN, 2000). Os outros sistemas de secreção são sec-independentes e são capazes de

exportar o substrato diretamente do citoplasma para fora da membrana externa da bactéria. Estes são compostos pelos sistemas do tipo I, III e IV (BUTTNER; BONAS, 2002; THANASSI; HULTGREN, 2000).

O sistema do tipo IV pode funcionar como sec-dependente e também como sec-independente (BURNS, 2003) e apresenta algumas similaridades com o sistema do tipo III, embora aparentemente os dois sistemas não sejam relacionados. Estes dois sistemas possuem algumas características em comum, por exemplo, ambos necessitam de contato físico com a célula hospedeira, requerem uma chaperona secretória que se ligue à proteína a ser secretada e espera-se que a exportação desta seja feita em somente uma etapa, via canal de secreção. Entretanto existe uma diferença fundamental entre eles: o sistema tipo IV pode exportar DNA fita simples e complexo DNA-proteína até a célula e não há nenhuma evidência de que o sistema do tipo III possa fazer o mesmo (CHRISTIE et al., 2005).

Figura 1. Sistemas de secreção. (Kegg pathway, bacterial secretion system, 2015- site: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko03070).



2.4 Via TAT (*twin arginine translocase*)

O complexo TAT é um sistema especializado na exportação de proteínas e complexos proteicos que devem ser dobrados ou montados no citoplasma (PALMER; BERKS, 2012). Em bactérias gram negativas este mecanismo é formado por três proteínas TatABC; TatB e TatC formam um complexo de proteína oligomérica na membrana citoplasmática enquanto TatA é

disperso na membrana citoplasmática. TatBC reconhece o motivo de arginina sinal presente nas proteínas que vão ser secretadas, permitindo a sua translocação do citosol para o espaço periplasmático. Para isso, ocorre o reconhecimento da proteína a ser transportada com o complexo TatBC, o qual recruta e polimeriza TatA em uma estrutura ativa para exportação de proteínas. A oligomerização de TatA distorce a membrana citoplasmática e a extrusão da proteína secretada interrompe temporariamente a membrana (RODRIGUEZ et al., 2013). O complexo Tat desmonta e sela a membrana durante a exportação com a finalidade de manter a integridade e permeabilidade da membrana. A energia para a montagem do Tat e sua função de exportador é obtida da transferência de próton (BECK et al., 2013).

2.4.2 Sistema *sec* (general secretion system)

O sistema Sec é a principal via para exportação de proteínas e está presente em todos os domínios da vida (CHANG et al., 2014). Este sistema está conformado pelas proteínas SecB encarregada da exportação de proteínas, SecA é a ATPase que controla o transporte das proteínas através da membrana; SecY, SecE, SecG, SecD, SecF e YajC são proteínas integrais da membrana; SecY, SecE e SecG formam um complexo heterotrimérico (SecYEG) e YidC o qual participa também na integração da proteína dentro da membrana (MORI; ITO, 2001). Em bactérias gram negativas SecYEG transloca polipeptídeos desdobrados que são posteriormente inseridos na membrana citoplasmática ou exportados dentro do espaço periplasmático. O sistema Sec consiste de SecYEG (um complexo de proteína de canal heterotrimérico), SecB e uma proteína dependente de ATP conhecida como SecA (LYCKLAMA; NIJEHOLT; DRIESSEN, 2012), dois fatores concorrem para reconhecer a sequência sinal N-terminal do polipeptídeo a ser secretado que está sendo liberado dos ribossomos durante o processo de tradução; um deles é o sinal de reconhecimento e identifica proteínas com sequências transmembrana hidrofóbicas e as conduz à via de co-tradução, sendo, posteriormente, levada ao complexo SecYEG onde a tradução acontece e o polipeptídeo é inserido na membrana citoplasmática (CHANG et al., 2014). Outro fator competitivo, chamado fator desencadeante, participa na via pós-tradução para enviar a proteína ao SecB (uma chaperona molecular que estabiliza polipeptídeos completamente traduzidos no estado desdobrado), o qual leva a proteína a SecA para exportação através da membrana citoplasmática pela hidrólise de ATP por SecA e a força próton motiva. Após chegar

ao espaço periplasmático a sequência sinal de secreção N-terminal é clivada pela peptidase ligada à membrana na face periplasmática da membrana (CHANG et al., 2014).

2.6.3 Sistemas de secreção independentes de SEC

2.6.3.1 Sistema de secreção tipo I (T1SS)

O sistema de secreção tipo I em bactérias Gram negativas (T1SS, type 1 secretion system) permite a secreção de proteínas de vários tamanhos e funções do citoplasma até o meio extracelular em uma única etapa sem a presença de intermediários periplasmáticos. Este sistema é utilizado por uma ampla gama de bactérias para a secreção de toxinas, proteases e lipases. Os substratos do T1SS variam em tipo e tamanho, desde pequenas proteínas de 20 kDa como a proteína HasA de *Serratia marcescens* cuja função é a varredura do ferro (LETOFFE; GHIGO; WANDERSMAN, 1994), a hemolisina HlyA de 110kDa, até proteínas de maior peso molecular como a LapA de 900 kDa, proteína de adesão de *Pseudomonas fluorescens* (HINSA, 2003).

O sistema de secreção tipo I requer três proteínas de secreção: uma ATPase de transporte na membrana interna (denominada proteína ABC de ATP-binding cassette) o qual fornece energia para a secreção dessas proteínas; uma membrana de fusão de proteínas (MFP) que está ancorada na membrana interna e atravessa o espaço periplasmático e uma proteína de membrana externa (KANONENBERG; SCHWARZ; SCHMITT, 2013). Membros da família de transportadores ABC estão presentes em todos os domínios da vida e tem como função o transporte de uma grande variedade de moléculas. A família de transportadores ABC consiste em dois domínios transmembrana os quais contribuem para a especificidade e translocação do polipeptídeo, proteína ou efector que vai ser secretado. Na ausência de um desses compostos o transportador ABC encontra-se localizado na membrana citoplasmática associado à proteína de fusão de membrana que faz parte deste sistema (CHANG et al., 2014).

Cabe ressaltar que os componentes da membrana interna exibem um elevado grau de especificidade para seus substratos, porém as proteínas de membrana externa estão envolvidas em vários processos de exportação. Por exemplo, a proteína de membrana TolC de *E. coli* esta envolvida na secreção de HlyA (MACKMAN et al., 1985) e na secreção da colicina V de Mcc V (GILSON et al., 1987), e na extrusão de compostos citotóxicos (NAKASHIMA et al., 2011), que

confere resistência a drogas em bactérias (POS, 2009). Em todos esses casos TolC interage com diversos conjunto de proteínas da membrana interna (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

Em estudos recentes têm sido identificados vários exemplos do papel do T1SS nas interações planta-micro-organismos (DELEPELAIRE, 2004). No patógeno do arroz *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* a expressão do efetor AvrXa21 requer o complexo de secreção tipo I conformado por RaxA, RaxB and RaxC. Análises filogenéticas sugerem que RaxB funciona como um transportador ABC (SILVA et al., 2004), equivalente a proteína HlyB de *E. coli*. foi sugerido que moléculas AvrXa21 consistem em um pequeno polipeptídeo sulfatado que é secretado pelo T1SS e que pode ser detectado por plantas hospedeiras (SILVA et al.,2004). Outros patógenos de planta como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv tomato, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. citri and *Xylella fastidiosa* podem secretar factores de virulência tais como metaloproteases, adesinas e glucanases pelo sistema de secreção tipo I (DELEPELAIRE, 2004; REDDY et al.,2007).

Adicionalmente foi reportado que um mecanismo da simbiose rizóbio-leguminosa depende de proteínas secretadas de rizóbios com um motivo repetitivo para determinar a especificidade do hospedeiro (DELEPELAIRE, 2004; FAUVART; MICHIELS, 2008). Algumas dessas proteínas são exportadas pelo T1SS e está também envolvida na formação de biofilme (RUSSO et al., 2006). Sendo possível, pois o T1SS pode secretar exopolissacarídeos para a formação de biofilme. A proteína TolC de *Sinorhizobium meliloti* também pode afetar a simbioses ao diminuir a fixação biológica de nitrogênio em alfafa, *Medicago sativa* (COSME et al., 2008). Proteínas secretadas por o T1SS foram também encontradas nos simbioses *Mesorhizobium loti* e *Bradyrhizobium japonicum* (DELEPELAIRE, 2004), mas o papel deste sistema durante a interação não foi confirmado para estas bactérias.

2.6.3.2 Sistema de secreção Tipo III (T3SS)

O sistema de secreção tipo III (T3SS) está presente em bactérias Gram-negativas que interagem de forma mutualística ou patogênica com hospedeiros animais e vegetais (MOTA; CORNELIS, 2005; CORNELIS, 2006). A principal função do T3SS é injetar efetores tipo III diretamente na célula hospedeira. O sistema de secreção tipo III é constituído por

aproximadamente 20 proteínas, as quais estão localizadas na membrana interna, requerendo provavelmente uma ATPase associada á membrana para fornecer energia ao sistema (CHARKOWSKI; HUANG; COLLMER, 1997). A maquinaria do T3SS, denominado injectissomo, parece ter uma origem evolutiva comum com o flagelo bacteriano (CORNELIS, 2006), e essa estrutura está encarregada de liberar proteínas efetoras através da membrana da célula hospedeira, diretamente no citosol, modulando uma ampla gama de funções da célula infectada (MOTA; CORNELIS, 2005; GRANT et al., 2006).

A estrutura e função do injectissomo têm sido bastante estudadas e foi bem caracterizada nos patógenos *Salmonella typhimurium* e *Yersinia pestis* e no fitopatógeno *Pseudomonas syringae* (BLOCKER et al., 2008; CORNELIS, 2006). O injectissomo é formado por uma série de anéis basais que se iniciam na membrana interna e se estendem até a membrana externa formando uma estrutura similar a uma agulha no caso da *Yersinia*, filamento em *Salmonella* ou pilus em *P. syringae*. Cada estrutura pode inclinar-se junto com o poro de translocação o qual é inserido dentro da membrana plasmática da célula alvo (BLOCKER et al., 2008; CORNELIS, 2006;). Dois tipos de chaperonas auxiliam na montagem do injectissomo em quanto um terceiro tipo ajuda na translocação de proteínas efetoras. A ATPase na base do injectissomo é usada para a hidrólise de ATP favorecendo o transporte (CORNELIS, 2006).

As proteínas a serem secretadas via T3SS são direcionadas à maquinaria de secreção por um conjunto de sinais que garantem a sua especificidade (ARNOLD; JEHL; RATTEI, 2010). Um dos sinais secretórios compreende os primeiros 20-25 aminoácidos da proteína a ser secretada (MICHIELS; CORNELIS, 1991; SORY et al., 1995). Esta sequência é altamente variável e pode tolerar alterações significativas sem afetar a sua função (ANDERSON; SCHNEEWIND, 1999; RUSSMANN et al., 2002).

Em bactérias fitopatogênicas, o sistema de secreção do tipo III é codificado pelos genes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) os quais são requeridos para a patogênese em plantas suscetíveis e elicitar a resposta hipersensitiva em plantas resistentes (BÜTTNER; SHENG, 2009; LINDGREN et al., 1986). A resposta de hipersensibilidade é uma rápida morte celular no local onde acontece a infecção, restringindo a multiplicação do patógeno. Esta resposta é ativada pelas proteínas efetoras da bactéria, a qual é reconhecida pelo produto dos genes de resistência correspondente (DANGL; JONES, 2001). Genes *hrp* foram encontrados em quase todas as bactérias Gram-negativas patogênicas de plantas (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas*

spp., *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia* spp.), sugerindo assim a importância do T3SS na modulação das interações planta-bactéria (ALFANO; COLLMER, 2004; BÜTTNER; BONAS, 2006; HE et al., 2004).

2.6.3.3 Sistema de secreção Tipo IV (T4SS)

O sistema de secreção tipo IV (T4SS) está presente em bactérias Gram-positiva e Gram-negativa e arqueia (BHATTY; LAVERDE GOMEZ; CHRISTIE, 2013), entre estas bactérias os patógenos *Agrobacterium tumefaciens* C58 (VirB), *Helicobacter pylori* (CAG; ComB), *P. aeruginosa* (TraS/TraB), *Bordetella pertussis* (Ptl), *E. coli* (Tra), *Legionella pneumophila* (Dot) (CHRISTIE; CASCALES, 2005) e a bactéria fixadora e N₂ *Mesorhizobium lotii*. O T4SS é o único sistema que tem a habilidade de transportar ácidos nucleicos, além de proteínas, para o interior das células hospedeiras (CHRISTIE; CASCALES, 2005). Embora este sistema possa compartilhar funções similares, pode ocorrer variação no número e genes presentes nos cluster já descritos para essa função (SAIER, 2006). Cabe ressaltar que este sistema de secreção tem recebido bastante atenção pelo seu papel na patogênese de diversos micro-organismos, porém é importante salientar que nem todas as bactérias apresentam T4SS (TSENG; TYLER; SETUBAL 2009).

O T4SS possui três ATPases no citoplasma que proporciona a energia para a) montagem dos outros componentes do sistema, b) abertura do poro de translocação e c) secreção da proteína a ser traslocada (WALLDEN et al., 2012). Uma ATPase (proteína de ligação tipo IV) tem a função de recrutar a molécula a ser secretada, e coordenar com outra ATPase a transferência dessa proteína ao resto do sistema (ZECHNER et al., 2012). As ATPases interagem com a membrana citoplasmática que funciona como uma traslocase que está embebida dentro do núcleo do complexo que forma o canal que atravessa o envelope celular (FRONZES et al., 2009). As bactérias Gram-negativas apresentam diferentes tipos de apêndices na superfície celular associados ao sistema de secreção tipo IV (ZECHNER et al., 2012). Por exemplo, em *A. tumefaciens* o pilus é o apêndice mais comum e está relacionado com a membrana citoplasmática e se estende através do espaço periplasmático até a superfície celular com uma adesina na sua ponta. O mecanismo pelo qual o T4SS trasloca as moléculas e a função do pilus são ainda desconhecidos (CHRISTIE et al., 2014).

A diversidade estrutural do T4SS confere flexibilidade quanto ao tipo, estado e destino das moléculas secretadas, sendo possível translocar desde polipeptídeos, complexos de nucleoproteínas a até complexos proteicos macromoleculares completamente montados que são secretados dentro do meio extracelular ou translocados directamente dentro do hospedeiro celular (BHATTY; LAVERDE GOMEZ; CHRISTIE, 2013).

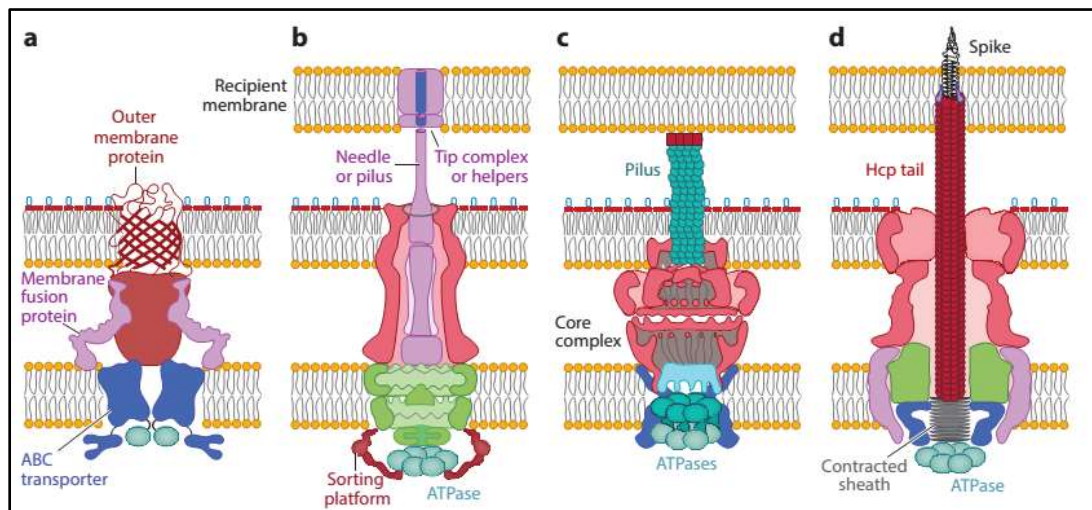
2.6.3.4 Sistema de secreção Tipo VI (T6SS)

O sistema de secreção tipo VI (T6SS) foi recentemente caracterizado e seu mecanismo de secreção ainda está sendo estudado (SILVERMAN et al., 2012). O núcleo do T6SS consiste em 13 proteínas que se regulam e são necessárias para seu funcionamento (SILVERMAN et al., 2012). Três proteínas, duas das quais apresentam homologia com componentes do T4SS, se autorregulam, formando o complexo que abrange o envelope celular e a membrana. Outras proteínas exibem homologia com componentes da cauda contrátil de bacteriófagos. O T6SS é formado pela proteína co-reguladora de Hemolisina (Hcp- *Hemolysin coregulated protein*) a qual forma um anel hexamérico que se assemelha a uma estrutura de cauda oca com o potencial de alterar a estrutura de proteínas dobradas e/ou não dobradas (LEIMAN et al., 2009). A proteína G com repetições de valina/glicina (VgrG) é similar às proteínas rígidas na forma de agulha de bacteriófagos, a qual serve para perfurar a membrana da célula alvo (BROWNING, 2012; LEIMAN et al., 2009; PUKATZKI et al., 2007). Outras duas proteínas formam uma estrutura dinâmica com forma de bainha que pode ser rapidamente montada e contraída, seguida da desmontagem da estrutura (BASLER et al., 2012). O comprimento da bainha pode abranger quase toda a largura de uma bactéria e tem o diâmetro suficiente para acomodar a cauda Hcp. Assim, o principal modelo sugere que a contração da bainha exterior ejeta a cauda interna Hcp para fora da célula. A proteína VgrG forma uma cobertura na parte terminal da proteína Hcp e após ejeção da agulha perfura a célula alvo. A liberação de VgrG na célula hospedeira poderia levar a uma abertura suficiente para secretar outras moléculas no interior da célula alvo (BROWNING et al., 2012). A contração da bainha e a separação do sistema, utilizam uma ATPase da super-família AAA+ como fonte de energia (BASLER; MEKALANOS, 2012).

Este sistema é requerido para a virulência de patógenos animais tais como *Vibrio cholerae*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, e *Burkholderia*

mallei e também para os fitopatógenos *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum* e *Xanthomonas oryzae* (BINGLE et al., 2008; WU et al., 2008). Adicionalmente T6SS é requerido para uma eficiente colonização da raiz por siombiontes fixadores de nitrogênio como: *Mesorhizobium loti* e *Rhizobium leguminosarum*, além de contribuir na formação de biofilme (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

Figura 2. Sistemas de secreção sec-independente .



Sistema de secreção: a. tipo I, formado por um transportador do tipo ABC, uma proteína de fusão de membrana e uma proteína de membrana externa b. Sistema de secreção tipo III, formado por uma ATPase, o injectissomo e o complexo de translocação na membrana externa. c. Sistema de secreção tipo IV, formado por uma ATPase, um complexo núcleo no periplasma e o pilus que se estende até o meio extracelular. d. Sistema de secreção tipo VI, formado por uma ATPase, proteína Hcp no periplasma e uma estrutura em forma de agulha para transportar as moléculas efetoras (CHANG et al., 2014).

2.6.4 Sistemas de secreção dependentes de SEC

2.6.4.1 Sistema de secreção Tipo II (T2SS)

Bactérias Gram-negativas podem utilizar o sistema de secreção tipo II (T2SS) para traslocar uma ampla variedade de proteínas a partir do periplasma através da membrana externa (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012). Este sistema é também conhecido como sistema dependente de Sec e muitas proteínas translocadas pelo T2SS devem chegar ao periplasma pela

via Sec (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009) ou também em alguns casos pela via Tat (VOULHOX et al., 2001).

Ainda que o sistema Sec-dependente seja universal (CAO; SAIER, 2003), o T2SS é encontrado principalmente em bactérias do filo Proteobacteria, sendo observado em espécies simbiotes (mutualistas, comensais e patógenos) e/ou espécies de vida livre. É um sistema especializado que promove funções específicas na interação das espécies com seus ambientes bióticos ou abióticos. Espécies bacterianas podem apresentar mais de um T2SS (CIANCIOTTO, 2005; FILLOUX, 2004) sendo necessário para a virulência de patógenos humanos (*Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila* e *E. coli*) e fitopatógenos (*Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) (CHANG et al., 2014; TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

A parede celular vegetal é uma barreira que consiste de uma matriz de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos que podem ser remodelados em resposta ao ataque dos fitopatógenos. O T2SS é empregado pelas bactérias para secretar grandes quantidades e vários tipos de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular da planta hospedeira, favorecendo o processo de patogênese (CHARKOWSKI et al., 2012; KAZEMI-POUR; CONDEMINE; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, 2004). As enzimas encarregadas de degradar pectina são os tipos de proteínas mais secretadas pelo T2SS variando em tipo e número (TOTH et al., 2003). A molécula a ser translocada deve estar na forma de proteína dobrada (FILLOUX, 2010).

Sabe-se que T2SS é formado por 12 a 15 diferentes tipos de proteínas e, embora o sistema totalmente montado não foi determinado, as estruturas para cada uma das suas quatro subestruturas foram visualizadas, mas tem sido sugerido que se encontram em vários compartimentos da célula bacteriana (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012). Uma ATPase, quando ativada se associa à membrana interna e fornece a energia para a translocação, através de uma plataforma localizada na membrana interna que está ligada às quatro subestruturas. T2SS possui uma estrutura periplasmática similar ao pilus denominada pseudopilinas devido à sua localização no interior do envelope, em vez da superfície da célula, esta subestrutura consiste em uma das principais quatro pilinas menores que são identificadas com base na sua abundância relativa. O complexo da membrana externa ou secretina forma o canal de secreção, na ausência da molécula que vai ser exportada, as pilinas menores são montadas como um complexo

pseudopilus localizado na membrana citoplasmática (CISNEROS et al., 2012). A ligação da proteína secretada ao T2SS estimula a atividade da ATPase e desencadeia a polimerização das pilinas principais no complexo do pseudopilus. O crescimento do pseudopilus sugere a proteína é empurrada através da secretina localizada na membrana externa (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012).

2.6.4.2 Sistema de secreção Tipo V (T5SS)

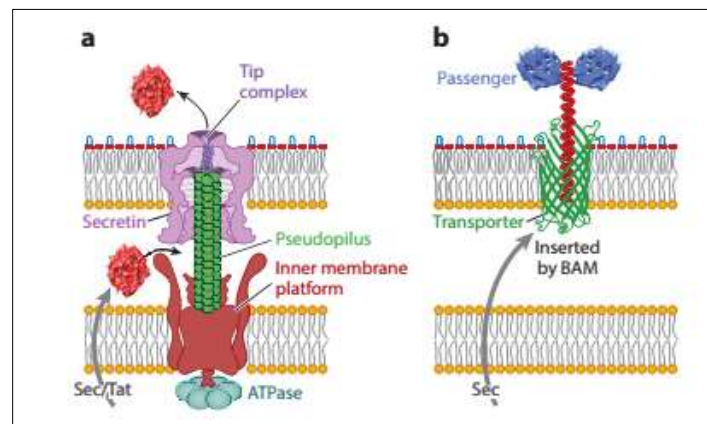
O sistema de secreção tipo V (T5SS) é um sistema relativamente simples em composição e geralmente específico para uma molécula em particular (LEO; GRIN; LINKE, 2012), sendo expressos como polipeptídeos simples e posteriormente envolvidos na secreção de uma única proteína cognata. O T5SS está subdividido em cinco tipos T5aSS–T5eSS com base nas diferenças estruturais e mecanismos de secreção. O T5aSS e T5bSS correspondem a autotransportadores monoméricos e sistemas de secreção em duas vias, T5aSSs são expressas como polipeptídeos individuais e estão dedicados a secreção de uma única proteína cognata. Os T5cSSs são autotransportadores triméricos e são basicamente adesinas que medeiam a adesão celular. O T5cSSs apresenta um mecanismo de secreção similar aos T5aSSs, porém consiste em três polipeptídeos que contribuem a formar um transportador simples que simultaneamente secreta três polipeptídeos. O T5dSSs está fusionado com o sistema de secreção em duas vias que codificam domínios homólogos pertencentes ao subtipo T5bSS, mas é expresso em um único polipeptídeo. Finalmente, o T5eSSs tem a ordem dos dois domínios invertidos próximo com o T5aSSs, mas o mecanismo de secreção também é diferente (CHANG, 2014). Este sistema, independentemente do subtipo secreta grandes proteínas que adotam uma estrutura β -helicoidal (LEYTON; ROSSITER; HENDERSON, 2012).

O T5aSS apresenta uma sequência sinal N-terminal necessário para o reconhecimento e exportação pelo sistema SEC, um passageiro com domínio central que confere uma única função e um domínio transportador com um C-terminal na barreira- β (LEO; GRIN; LINKE, 2012). No geral, após a exportação pela via Sec-dependente, os T5aSSs interagem com chaperonas periplasmáticas que adotam o estado necessário para sua inserção do domínio transportador dentro da membrana externa e para a secreção do domínio passageiro (IEVA; BERSTEIN, 2009). O domínio transportador do T5aSS interage posteriormente com a maquinaria BAM (β -barrel

assembly machinery), um complexo de proteínas que inserem proteínas dentro das membranas externas em bactérias Gram negativas (KNOWLES et al., 2009). Sugere-se que o domínio transportador forma um poro na membrana externa e contém uma estrutura em grampo a partir da porção C-terminal do domínio passageiro (LEO; GRIN; LINKE, 2012). Devido à ausência de uma força próton motora ou uma ATPase, o dobramento sequencial do passageiro no meio extracelular provavelmente fornece a força necessária para enrolar uma cadeia no sentido C-terminal ao N-terminal. O complexo BAM permanece associado com o T5aSS para ajudar a traslocar o domínio passageiro através do poro (PAVLOVA et al., 2013). Após a secreção o poro é fechado por uma α -hélice que enlaça o passageiro secretado à barreira- β (VAN DEN BERG, 2010). A grande maioria dos T5aSSs pode ser liberada pelos passageiros dentro do meio devido à presença de proteases autocatalíticas (LEO; GRIN; LINKE, 2012).

A função dos domínios passageiros do T5SS é variável e envolve serina proteases, lipases, citotoxinas, invasinas e adesinas que coletivamente influenciam o fitness bacteriano, agregação, formação de biofilme e virulência (GRIJPSTRA et al., 2013). As proteínas secretadas pelo T5SS envolvem as adesinas AIDA-I e Ag43 de *E. coli*, Hia de *Haemophilus influenzae*, YadA de *Yersinia enterocolitica* e Prn of *Bordetella pertussis*; toxinas como VacA de *Helicobacter pylori*; proteases IgA de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, proteases of SepA de *Shigella flexneri* e PrtS de *Serratia marcescens* e proteínas de camada S tais como rOmpB de *Rickettsia* sp. e Hsr de *Helicobacter pylori* (HENDERSON et al., 2004; JACOB-DUBUISSON; FERNANDEZ; COUTTE, 2004). O T5SS também está implicado com o fenômeno denominado inibição do crescimento dependente de contato, onde após o contato físico, proteínas tóxicas são direcionadas para a bactéria alvo (RUHE; LOW; HAYES, 2013).

Figura 3. Sistemas de secreção dependentes de SEC e TAT.



a. Sistema de secreção tipo II dependente de SEC ou TAT e seus componentes: proteínas de membrana interna, pseudopilinas e proteína de membrana externa (secretina). b. Sistema de secreção tipo V, dependente de SEC e a proteína de membrana externa BAM (CHANG et al., 2014).

2.6.6 Bomba de Efluxo de Multidrogas (MDR) e família de transportadores ABC

As bombas de efluxo de multidrogas (MDR) são importantes elementos que contribuem na aquisição e resistência a compostos tóxicos nas diversas formas de vida, incluindo os seres humanos onde estes transportadores têm um papel na resistência a drogas anticâncer (WU; HSIEH; WU, 2011), e encontrados nas bactérias onde estão envolvidas na resistência a antibióticos (LI; NIKAIDO, 2004, 2009; POOLE, 2005, 2007; WEBBER; PIDDOCK, 2003;). As bombas de efluxo de resistência a multidrogas bacterianas podem ser agrupadas em cinco tipos de famílias estruturais: a superfamília Adenosina trifosfato (ATP)-binding cassette (ABC) (LUBELSKI; KONINGS; DRIESSEN, 2007), a família de extrusão de multidrogas e compostos tóxicos (MATE), a superfamília MFS (Major facilitator superfamily) a família SMR (small multidrug resistance) e a superfamília RND (resistance/nodulation/division) (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTINEZ, 2013). A atividade das bombas de efluxo depende de diferentes fontes de energia segundo os requerimentos de cada sistema: transportadores do tipo ABC utilizam a hidrólise de ATP; MFS, RND, e SMR utilizam a força próton motiva e os transportadores MATE utilizam o sistema antiportes Na^+/H^+ (PIDDOCK, 2006).

A família RND envolve vários membros que são muito importantes na resistência aos antibióticos em bactérias Gram-negativas enquanto a família MATE é associada principalmente

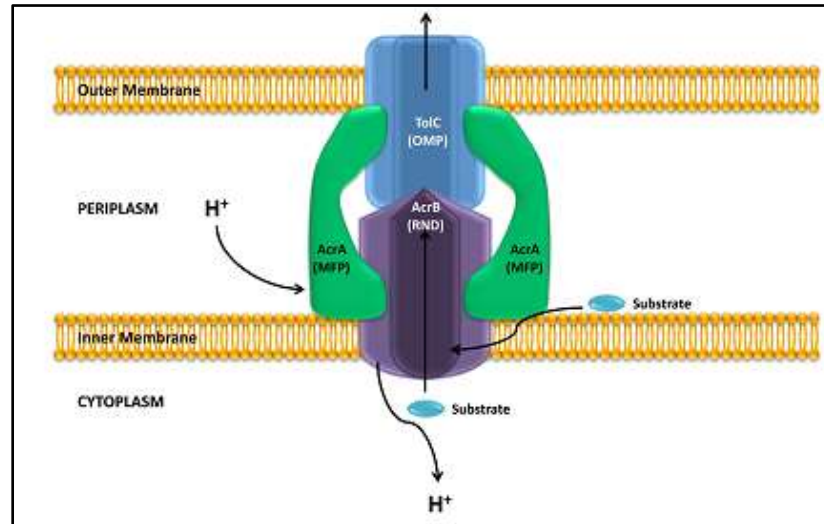
com resistência em bactérias Gram-positivas (PIDDOCK, 2006; VILA; MARTINEZ, 2008). A proteína AcrB pertencente á família RND forma um homotrimerico que se associa com um complexo de três componentes junto com a proteína de membrana externa TolC e uma proteína de fusão de membrana (AcrA) (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTINEZ, 2013). Usualmente os genes que codificam para estas proteínas são encontrados em um único operon (figura 4), porém o gene que codifica para a proteína de membrana externa pode ser encontrado em qualquer região do cromossomo como acontece com TolC em *E. coli* (KORONAKIS et al., 2000, 2004); ou fazendo parte de um operon que codifica para uma bomba de efluxo diferente (figura 5).

A bombas de efluxo RND além de outorgarem virulência bacteriana (PIDDOCK, 2006b) estão envolvidas em interações planta-microrganismo (MAGGIORANI VALECILLOS; RODRIGUEZ PALENZUELA; LOPEZ SOLANILLA, 2006), transporte de moléculas de *quórum sensing* (EVANS et al., 1998; KOHLER et al., 2001) e processos de detoxificação de intermediários metabólicos e compostos tóxicos tais como metais pesados, solventes ou antimicrobianos produzidos por outros microrganismos (AENDEKERK et al., 2002, 2005; BURSE et al., 2004; NIES, 2003; RAMOS et al., 2002; SEKIYA et al., 2003).

Figura 4. Organização gênica da bomba de efluxo de multidrogas dos genes TolC, AcrB, AcrA e acrR (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTINEZ, 2013).



Figura 5. Estrutura da bomba de efluxo de multidrogas do sistema AcrAB-TolC de *E. coli*.



O sistema está conformado pela proteína de membrana interna AcrB, a proteína de membrana externa TolC e a proteína de fusão de membrana AcrA. A força próton motiva fornece a energia ao sistema (BLAIR; PIDDOCK, 2006).

A família de transportadores ABC constitui uma das principais classes de proteínas envolvidas na maquinaria de translocação extracelular e estão presentes nos domínios da vida (LLAMA-PALACIOS; LOPEZ-SOLANILLA; RODRIGUEZ-PALENZUELA, 2002). Estas proteínas são definidas por duas características importantes: o domínio de ligação de nucleótidos, o qual energiza o processo de transporte através do seu acoplamento com a hidrólise de ATP ou GTP e o domínio que atravessa a membrana o qual está envolvido em processos de transferência a través das membranas biológicas (HIGGINS, 1992). Varias subclasses de transportadores ABC tem sido definidos e existe uma correlação entre similaridade de sequências e tipo de moléculas transportadas, em alguns casos, transportadores ABC bacterianos estão envolvidos em resistência a antibióticos pelo bombeo da molécula antibiótica ao espaço extracelular (SCHONER et al., 1992). Por tanto genes que codificam transportadores ABC são bons candidatos de participarem em mecanismos de virulência ou sobrevivência em outros hospedeiros.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o efeito dos exsudados de milho e citros sobre o crescimento e *M. mesophilicum* SR.16/6 bem como sobre a expressão de genes envolvidos com sistema de transporte. Assim, para alcançar os objetivos gerais, o presente projeto apresentou os seguintes objetivos específicos:

- Identificar e reanotar genes envolvidos no transporte de moléculas (sistemas de secreção dos tipos I, II, III, IV, V, VI e bombas de efluxo multidrogas) que poderiam estar associados à interação entre a bactéria endofítica *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com a planta hospedeira;
- Avaliar o efeito dos exsudatos produzidos pelas plantas de milho e citros no crescimento da *M. mesophilicum* SR 1.6/6;
- Identificar compostos exsudatos pela planta hospedeira durante a interação com *M. mesophilicum* SR 1.6/6;
- Avaliar a expressão de genes associados à transporte de moléculas de *M. mesophilicum* SR1.6/6 durante a interação com plântulas de citros (hospedeiro original) e milho (hospedeiro alternativo) por qPCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolado de *Methylobacterium mesophilicum* e condições de cultivo.

Foi utilizada a linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum*, previamente isolada de *Citrus sinensis* (ARAÚJO et al., 2002). Esta bactéria foi cultivada em meio SPW modificado (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) a 28 °C por 72 horas, 180 rpm.

4.2 Material vegetal e cultivo em condições axênicas

Para o estudo da interação com a planta hospedeira, plântulas de milho (*Zea mays*) e citros (*Citrus sinensis*) foram obtidas de sementes gentilmente cedidas pelo Departamento de produção vegetal e Genética da ESALQ/ USP (Piracicaba, SP). A desinfecção superficial das sementes foi realizada por imersão em álcool 70% por 1 minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito 2% por 2 minutos, lavagem com álcool 70% por 1 minuto e finalmente duas lavagens com água destilada autoclavada. Após desinfecção estas sementes foram colocadas em papel filtro autoclavado para a remoção da umidade. As sementes de milho foram germinadas em 10 mL de meio ágar-água (7 g.L⁻¹) por 5 dias a 28 °C, com fotoperíodo de 12 h, enquanto as sementes de citros foram germinadas em frascos contendo 10 mL de meio de cultura ágar-MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) por 30 dias, a temperatura ambiente no escuro por 30 dias. Após germinação, as plântulas foram mantidas em fotoperíodo de 12 h de luz por 30 dias.

4.3 Curvas de crescimento em meio CHOI3

Para avaliar o efeito dos exsudados de milho e citros sobre o crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6, a bactéria foi crescida em meio SPW modificado por 72 horas a 29°C, centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado de células lavado com meio CHOI3 + metanol (1%) (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998), centrifugado novamente, e as células novamente ressuspensas em meio CHOI3. Para obter os exsudados, plântulas de milho e citros (item 4.2) foram colocadas em tubos separados com as raízes imersas em 30 mL de meio CHOI3+metanol por 72 horas a 28 °C, com fotoperíodo de 12 h luz. Após este período, *M. mesophilicum* SR1.6/6 obtida de acordo com a descrição acima, foi adicionada, para uma D.O. inicial de 0,05, ao meio CHOI3+metanol contendo os exsudados das plântulas de milho ou citros.

Para essa análise foram considerados 3 tratamentos, sendo i) Controle: SR1.6/6 inoculada em meio CHOI3+metanol sem exsudados das plântulas; ii) SR1.6/6 inoculada em meio CHOI3+metanol contendo somente os exsudados das plântulas (as plântulas foram removidas após as 72 horas) e iii) SR1.6/6 inoculada em meio CHOI3+metanol contendo os exsudados e a plântula. Após inoculação da bactéria endofítica, as plântulas foram mantidas a 28 °C, sob agitação (150 rpm) por 12 dias. Para construção das curvas, 1 mL das culturas foi coletado a cada 24 horas e a D.O. a 600 nm avaliada em espectrofotômetro. Todos os experimentos foram realizados com 4 replicatas em pelo menos 2 experimentos independentes.

4.4 Análise dos exsudatos da planta por GS-MS

A identificação dos compostos exsudados pelas plântulas de interesse, foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-MS Agilent 5975C). Para isso, as plântulas (milho e citros) foram mantidas em água, na presença ou ausência da *M. mesophilicum* SR1.6/6 (obtida como descrito no item 4.3), por 6 dias. Após este período, os exsudatos foram liofilizados e derivatizados com metoximação e trimetilsililação (BROECKLING et al., 2005). As condições de corrida foram realizadas de acordo com Badri et al. (2008), para isso, 1 µL de cada amostra foi injetado em um cromatógrafo a gas (Agilent 6890) acoplado a um espectrômetro de massas (5975) e uma taxa de divisão de 1:1. A temperatura inicial do forno de 80 °C foi mantida por 2 minutos e foi aumentada em uma taxa de 5 °C/min a uma temperatura final de 315

°C mantida assim por 12 min. A separação foi obtida utilizando uma coluna de 60 m DB-5MS (J & W Scientific; 0.25 x 0.25-mm) em um fluxo de 1.0 mL/min. A detecção e deconvolução dos picos foi realizada com AMDIS, cada tratamento, e as listas dos picos foram compiladas em MET-IDEA (BROECKLING et al., 2006). MET-IDEA foi usado para extrair os valores quantitativos das áreas do pico para amostras polares e não polares. Picos redundantes foram removidos do pacote de dados, e os valores de área do pico foram escalados entre zero e 1.0. Esta análise foi realizada pela Dra. Juliana M. Sciani (Instituto Butantan).

4.5 Anotação manual dos genes associados ao transporte de moléculas

Foi realizada a anotação manual dos genes, no genoma da *M. mesophilicum* SR1.6/6, que codificam proteínas envolvidas com transporte. Para isso, foram utilizadas comparações com genes já descritos e consolidados em outras espécies de *Methylobacterium*, utilizando as ferramentas BLASTp, BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e para a análise e comparação de possíveis clusters gênicos foi empregada base de dados do **Joint Genome Institute's** Genome Portal (JGI) (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>). Para o JGI foi sempre utilizada *M. radiotolerans* JCM 2831 como linhagem padrão devido a sua proximidade filogenética com **SR1.6/6**. Adicionalmente foi desenvolvido um modelo esquemático dos sistemas de secreção encontrados na *M. mesophilicum* SR1.6/6 por meio do programa ChemBioDraw Ultra 14.

4.6 Delineamento experimental para análise de expressão genica

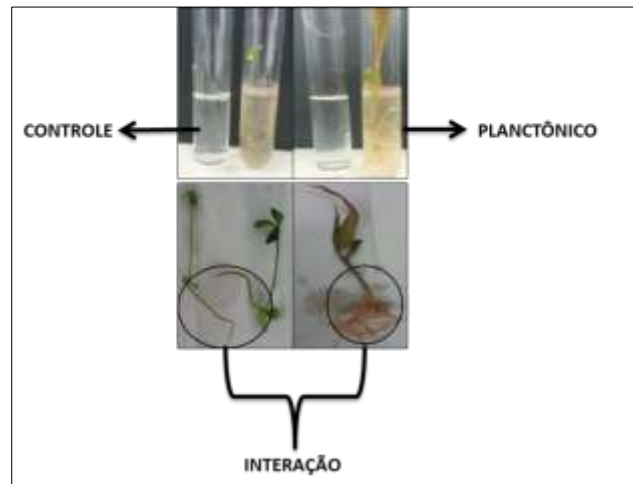
Plântulas foram obtidas (item 4.2) e transferidas para frascos contendo 20 mL de meio CHOI3 (item 4.3) e mantidas por 72 h a 28 °C com fotoperíodo de 12h de luz. A bactéria endofítica foi inoculada nas mesmas condições utilizadas no item 4.3, mas em volume de 20 mL de meio CHOI3+metanol. Foram utilizados 3 tratamentos, sendo *i*) controle: células planctônicas de SR1.6/6 em meio CHOI3+metanol sem os exudados das plântulas; *ii*) planctônico: células planctônicas de SR1.6/6 na presença de exudados da planta; *iii*) interação: células de SR1.6/6 em interação (epifíticas e endofíticas) com raízes das plântulas de interesse. Após inoculação da bactéria, as plântulas foram mantidas a 28 °C por 120 horas sob agitação (150 rpm), quando

então o RNA total foi extraído. Todos os experimentos foram realizados com 4 replicatas em pelo menos 2 experimentos independentes.

4.7 Análise da expressão de genes de *M. mesophilicum* na interação com a planta hospedeira

Para extração do RNA total de *M. mesophilicum* SR1.6/6 (controle, planctônico e interação – Figura 6), as células planctônicas foram centrifugadas por 15 minutos a 4.000 G a 4°C. Este precipitado de células e as raízes das plântulas hospedeiras colonizadas por SR1.6/6 foram maceradas em N₂ líquido e o RNA total foi extraído com o kit *PureLinkRNA* (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade das amostras obtidas foi avaliada em gel de agarose 1% e a concentração determinada por espectrofotometria com absorvância a 260 nm e 280 nm, com o auxílio do NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000).

Figura 6. Delineamento experimental para o estudo da interação entre SR1.6/6 e a planta hospedeira.



O RNA total obtido foi tratado com DNase I (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante e em seguida 2 μg deste RNA foi convertido em cDNA com o kit SuperScript III (Invitrogen) utilizando o random hexamer primer, de acordo com as recomendações do fabricante. Este cDNA foi utilizado nas análises de qPCR para os genes de interesse.

Inicialmente foi avaliada a expressão de 25 genes previamente identificados como codificadores de proteínas relacionadas ao transporte (NEVES, 2015). Para tanto, primers foram desenhados com auxílio do programa Primer3 (v.3.0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu>) e avaliados quanto à similaridade com sequências de outras espécies (Tabela 1A em apêndice) por meio da ferramenta BLAST no sítio do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Posteriormente estes primers foram validados por meio de PCR convencional, seguido de sequenciamento para confirmação das sequências alvo. Somente aqueles confirmados foram usados nas análises de qPCR.

4.8 Quantificação da expressão de genes por qPCR

A reação de amplificação por qPCR foi conduzida em termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, NY, EUA) programado para uma desnaturação inicial por 3 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 30 s a 60 °C. Na reação de qPCR a especificidade dos primers foi avaliada por meio de uma curva de *melt* com o gradiente de 72 a 96 °C variando 0,5 °C a cada 15 s. A reação de amplificação foi realizada separadamente para cada um dos genes em

um volume final de 20 μl , contendo 2 μl de cDNA (25 ng/ μl), 1 μl de 10 μM de cada *primer* e 12 μl da solução do kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Master Mix (Applied Biosystems, NY, EUA). A quantificação da expressão relativa foi baseada na expressão de um gene alvo em relação a um gene de referência (gene com expressão constitutiva, neste caso o gene *zwf*, que codifica a enzima glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase). De acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Razão} = \frac{2^{\Delta\text{CPalvo (controle - amostra)}}}{2^{\Delta\text{CPref. (controle - amostra)}}$$

4.9 Análises estatísticas

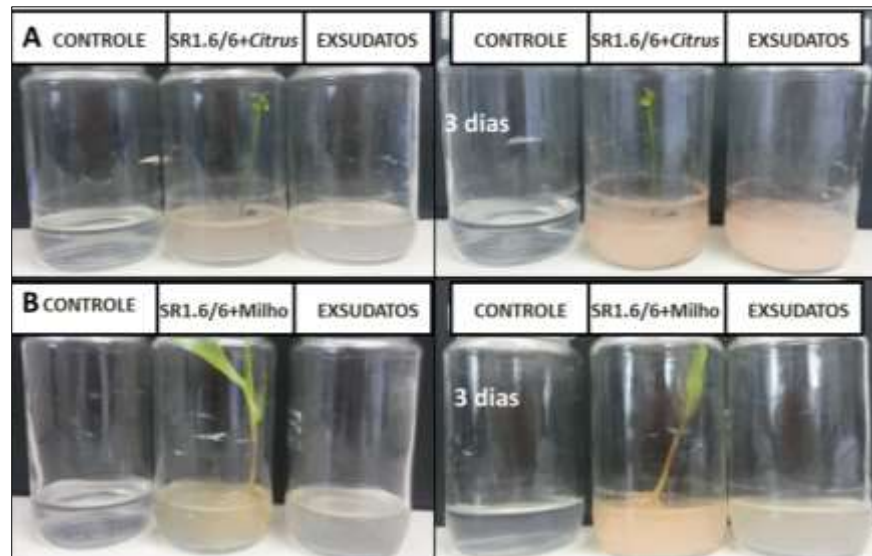
As análises estatísticas das curvas de crescimento foram feitas usando o pacote de dados "Laercio" (Silva, 2008) no programa R.3.1.1, usando o teste de Tukey ($p < 0,05$), para comparação das médias observadas. Foram também realizadas análises estatísticas da expressão de todos os genes avaliados por qPCR utilizando o teste t de Student ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Curvas de crescimento em meio CHOI3

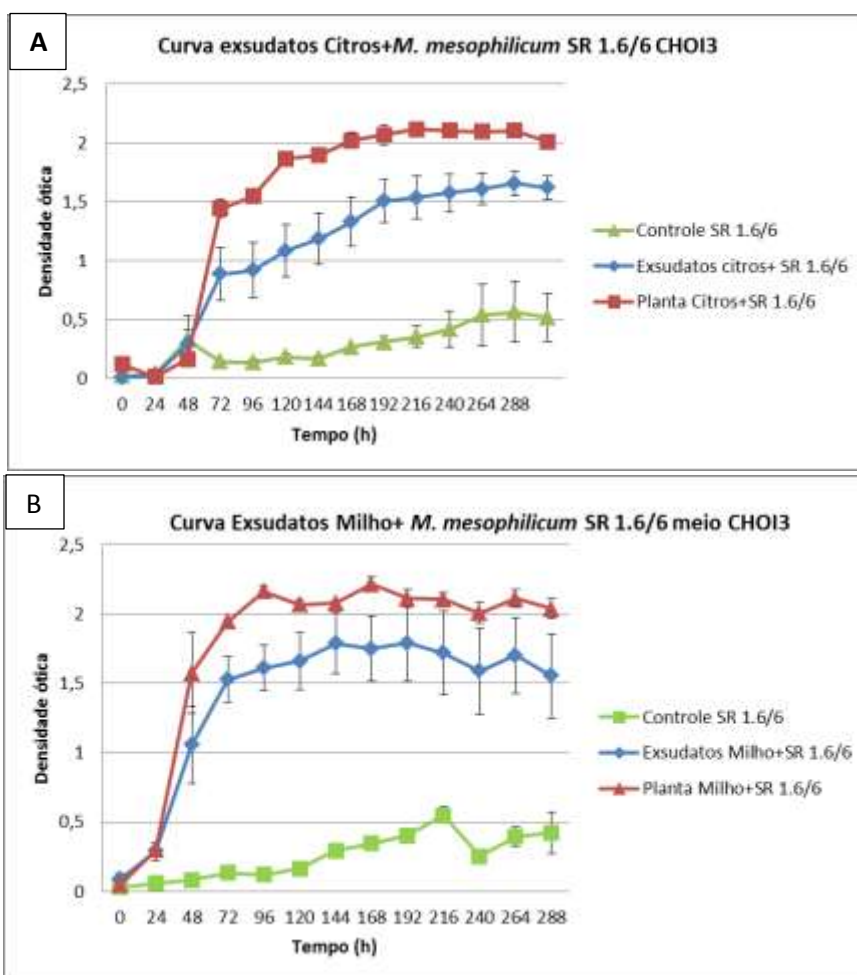
O efeito dos exsudatos de raízes de plântulas de milho e citros sobre o crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi avaliado em meio de cultura CHOI3, no qual foi observado um crescimento intenso desta bactéria endofítica (figura 7). Foi observado que na presença dos exsudatos das plântulas de citros e milho (na presença ou ausência da planta) *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresentou um maior crescimento. Na presença dos exsudatos, a fase log iniciou entre 48 e 72 horas para citros e entre 24 e 48 para milho, enquanto na ausência dos exsudatos esta fase parece iniciar apenas após 144 horas (Figura 8). Entretanto, a cultura bacteriana onde as plântulas foram mantidas durante todo experimento apresentou maior crescimento quando comparado àquelas onde as plântulas foram removidas, mantendo apenas os exsudatos tanto para citros como para milho.

Figura 7. Montagem das curvas de crescimento para as plantas hospedeiras



Frascos utilizados para a realização das curvas de crescimento das plantas. Pode se observar a montagem inicial do experimento e após três dias para A) Citros (*Citrus sinensis*) e B) Milho (*Zea mays*); tratamento **controle** (*M. mesophilicum* SR1.6/6), tratamento **SR1.6/6 + Planta**, e tratamento **SR1.6/6+Exsudatos**, onde foi possível visualizar a coloração rosa da suspensão em meio CHOI3 com metanol, evidenciando um grande número de células de *M. mesophilicum* SR1.6/6, especialmente interagindo com os exsudatos (na presença e ausência da planta).

Figura 8. Curva de crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 em meio CHOI3 com metanol



Curva de crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 em meio CHOI3 com metanol como fonte de carbono para: A) planta de citros e seus exsudatos, B) planta de milho e seus exsudatos, sempre comparadas com o tratamento controle *M. mesophilicum* SR1.6/6 crescendo em meio CHOI3 sem planta.

5.2. Análise dos exsudatos da planta por GS-MS

Os compostos exsudados pelas plântulas de citros e milho na presença ou ausência de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foram identificados (Tabelas 1 e 2). Para citros foi observado que os principais compostos foram açúcares (d-galactose, d-glicose, d-mannose, d-turanose, inositol, myo-inositol, hexopiranos), lipídios (ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, ácido tetradecanoico, ácido araquidônico), aminoácidos (L-asparagina, L-ácido aspártico, L-isoleucina, L-lisina, L-fenilalanina, L-prolina, L-treonina, L-tirosina, serina), compostos nitrogenados (ureia, glicina) e compostos orgânicos (glucitol, glicerol, benzo-nafto[1,2-d]tiofeno) (Figura 9). Na presença da bactéria foi observado apenas açúcares (galactose, glicose, mannose, turanose,

inositol, myo-inositol, hexopiranoose, frutose, maltose e arabinose) e compostos orgânicos (N-Acetil glicosamina metoxima, butano e glicerol) nos exsudados de citros. Alguns açúcares como Galactose, Glicose, Manose e Turanose foram detectados também nos exsudatos da bactéria *M. mesophilicum* SR1.6/6 (Tabela 1). Alguns compostos como frutose, maltose e arabinose (açúcares) e N-Acetyl glucosamine methoxime e butano (compostos orgânicos) foram observados apenas nos exsudados da interação. Já os lipídios e aminoácidos foram observados apenas quando citros foi mantido sem a bactéria (Tabela 1).

Figura 9. Porcentagem das classes de compostos obtidos por GC-MS em: 1) Citros (sem bactéria) e 2) Citros na presença de *M. mesophilicum* SR1.6/6.

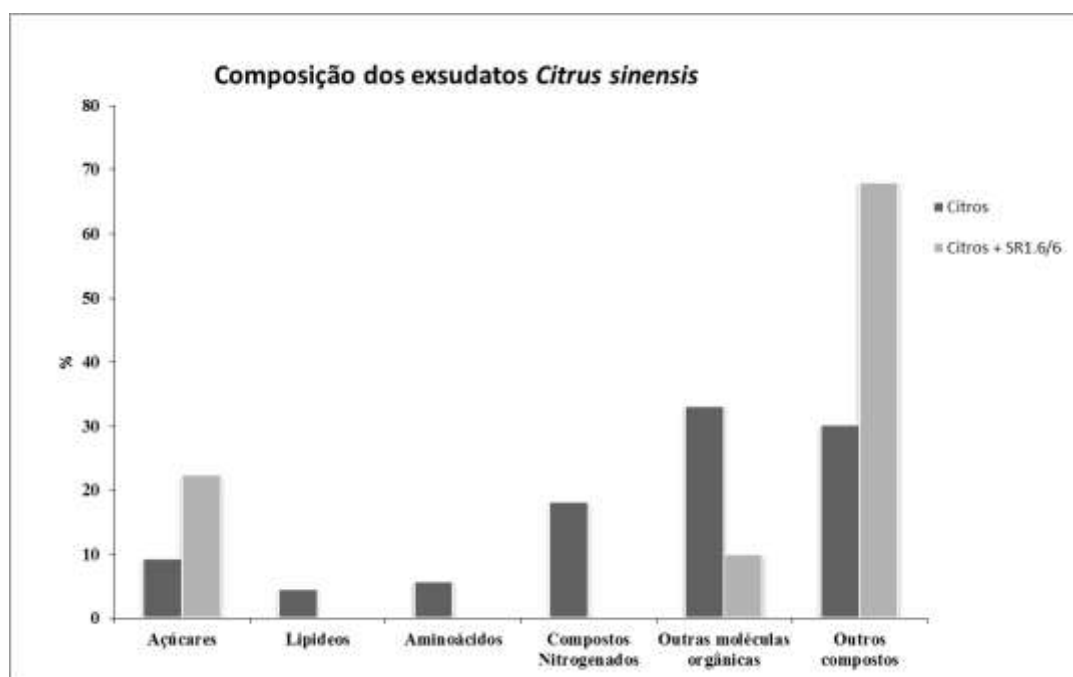


Tabela 1. Compostos presentes nos exsudatos de citros (com e sem inoculação de SR1.6/6) e nos exsudatos de *M. mesophilicum* SR1.6/6.

Classe de compostos	Compostos detectados	% da área		
		Citros	Citros + SR1.6/6	SR1.6/6*
Açúcar	d-Galactose	1,21	2,45	+
Açúcar	d-Glicose	2,89	3,49	+
Açúcar	d-Mannose	0,78	<i>n.d.</i>	+
Açúcar	D-Turanose	1,37	4,61	+
Açúcar	Inositol	0,16	0,58	<i>n.d.</i>
Açúcar	Myo-Inositol	2,4	0,78	<i>n.d.</i>
Açúcar	Hexopirranose	0,27	2,94	<i>n.d.</i>
Açúcar	D-Frutose	<i>n.d.</i>	1,7	<i>n.d.</i>
Açúcar	Maltose	<i>n.d.</i>	4,32	<i>n.d.</i>
Açúcar	Arabinose	<i>n.d.</i>	1,34	<i>n.d.</i>
Lipídio	Ácido hexadecanoico	2,48	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Lipídio	Ácido octadecanoico	1,7	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Lipídio	Ácido tetradecanoico	0,21	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Lipídio	Ácido araquidônico	0,05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Asparagina	0,12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Ácido aspártico	3,58	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Isoleucina	0,13	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Lisina	0,24	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Fenilalanina	0,34	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Prolina	0,21	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-treonina	0,34	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Tirosina	0,15	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	Serina	0,46	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	ácido butanoico	0,3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Outras moléculas orgânicas	Glucitol	0,29	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Outras moléculas orgânicas	Glicerol	31,7	6,33	+
Outras moléculas orgânicas	Licopodan-5-ona	<i>n.d.</i>	0,08	<i>n.d.</i>
Outras moléculas orgânicas	N-Acetyl glucosamine methoxime	<i>n.d.</i>	0,15	<i>n.d.</i>
Outras moléculas orgânicas	Butano	<i>n.d.</i>	3,22	<i>n.d.</i>
Outras moléculas orgânicas	Benzo-nafto[1,2-d]tiofeno	0,29	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Composto nitrogenado	Ureia	17,79	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Composto nitrogenado	Glicina	0,51	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Outros compostos	-	30,03	68,01	-

+ detectado; *nd.*: não detectado

Para plântulas de milho (*Zea mays*), os açúcares foram os compostos em maior quantidade, porém compostos orgânicos e compostos nitrogenados foram também detectados em menor quantidade. Aminoácidos e lipídios foram observados em quantidades muito reduzidas (Figura 10). Para milho na presença da bactéria, foi observado principalmente açúcares, alguns ácidos e compostos orgânicos e um lipídio (ácido n-Pentadecanoico), enquanto na cultura de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foram detectados açúcares tais como Galactose, Manose, Ribose, Turanose, Glicopiranosose e Glicose; e os Compostos orgânicos Furanona e Trimetilsilil éter de glicerol (Tabela 2)

Figura 10. Porcentagem das classes de compostos obtidos por GC-MS em: 1) Milho (sem bactéria) e 2) Milho na presença de *M. mesophilicum* SR1.6/6.



Tabela 2. Compostos presentes nos exsudatos de milho (com e sem inoculação de SR1.6/6) e nos exsudatos de *M. mesophilicum* SR1.6/6.

Classe de compostos	Compostos detectados	% da área		
		Milho	Milho + SR1.6/6	SR1.6/6
Açúcar	d-Galactopiranoside,	0,07	0,09	<i>n.d.</i>
Açúcar	d-Galactose	1,51	2,89	+
Açúcar	D-Manitol	0,12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Açúcar	d-Manosse	0,83	<i>n.d.</i>	+
Açúcar	d-Ribose	0,13	0,26	<i>n.d.</i>
Açúcar	d-Turanose	0,68	<i>n.d.</i>	+
Açúcar	Dulcitol	0,94	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Açúcar	Frutose	15,31	5,55	<i>n.d.</i>
Açúcar	Glicopiranosose	3,56	5,36	+
Açúcar	D-Glicose	3,68	4,2	+
Açúcar	l(-)-Arabitol	0,4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Açúcar	d(-)-Arabitol	0,43	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Açúcar	Inositol	1,84	0,66	<i>n.d.</i>
Açúcar	Melibiose	2,33	0,82	<i>n.d.</i>
Açúcar	Pentitol	1,26	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Açúcar	β-DL-Arabinopiranosose	0,2	5,76	<i>n.d.</i>
Açúcar	β-DL-Lixopiranosose	0,42	0,42	<i>n.d.</i>
Açúcar	β-D-Xilopiranosose	1,26	4,5	<i>n.d.</i>
Lipídio	Ácido n-Pentadecanoico	<i>n.d.</i>	0,14	<i>n.d.</i>
Lipídio	Ácido Hexadecanoico	0,14	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Acido Aspartico	0,05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Prolina	0,14	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Aminoácido	L-Valina	0,06	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido alpha-D-Glicopirauronico	0,12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido beta-D-Glucopiranosiduronico	1,42	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido a-D-Glicopiranosiduronico	1,54	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido Butanedioico	0,4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido Butanoico	0,42	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido Cinnamico	0,28	0,78	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido D-Glicuronico	0,65	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido D-Gliconico	0,18	1,5	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido Etanodioico	0,32	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido Galactarico	0,57	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido Propanoico	0,02	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ácido orgânico	Ácido 2-Furanacetico	<i>n.d.</i>	0,07	<i>n.d.</i>
Outras moléculas orgânicas	Butano	2,48	1,5	<i>n.d.</i>
Outras moléculas orgânicas	2(3H)-Furanona	0,01	<i>n.d.</i>	+

Outras moléculas orgânicas	Trimetilsilil éter de glicerol	2,73	0,78	+
	N-Acetyl glucosamine methoxime	0,15	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Outras moléculas orgânicas				
Composto nitrogenado	Ureia	0,11	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Composto nitrogenado	1,4-Butanodiamina	0,54	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Outros compostos	-	52,63	64,68	-

+ detectado; *nd.*: não detectado

5.3 Anotação manual dos genes associados ao sistema de secreção e bomba de efluxo de multidrogas (MDR) em *M. mesophilicum* SR1.6/6

Genes que codificam proteínas associadas ao transporte de moléculas foram anotados manualmente no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 (Tabelas 3 até a 14). Foram observados 25 genes possivelmente pertencentes a diferentes sistemas de secreção, posteriormente esta anotação foi confirmada manualmente.

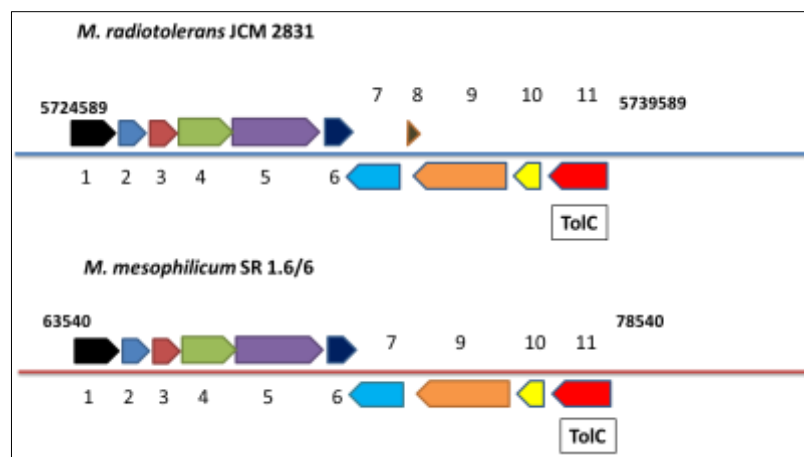
O gene que codifica uma proteína de membrana externa TolC foi identificada na locustag MmSR116_0126. Esta proteína pertence ao T1SS e na bomba de efluxo de multidrogas, e é um transportador importante que pode ser recrutado para qualquer um desses sistemas de transporte; esta proteína também foi observada no genoma de *M. radiotolerans* JCM 2831 (Tabela 3), estando presente em uma região conservada entre estas espécies bacterianas (figura 11).

Tabela 3. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao Sistema de Secreção tipo I TolC e seus genes vizinhos.

Código	SR 1.6/6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Numero COG e nome da proteína
1	MmSR116_0117	Mrad2831_5422	Açúcar epimerase hopanoide associada	COG0451 Nucleosídeos difosfato-açúcar epimerase
2	MmSR116_0118	Mrad2831_5423	Esqualeno sintetase HpnC	COG1562 Fitoeno/esqualeno sintetase
3	MmSR116_0119	Mrad2831_5424	Esqualeno sintetase	COG1562 Fitoeno/esqualeno sintetase
4	MmSR116_0120	Mrad2831_5425	Dessaturase esqualeno-associado FAD-dependente	COG3349 Proteína conversava não-caracterizada, contém domínios de ligação NAD e grupo Fe-S
5	MmSR116_0121	Mrad2831_5426	Esqualeno-hopeno ciclase	COG1657; Esqualeno ciclase
6	MmSR116_0122	Mrad2831_5427	Proteína hipotética	Superfamília fosforilase
7	MmSR116_0123	Mrad2831_5428	protease Do	COG0265 Serine protease periplasmática, sub-família

8	X	Mrad2831_5429	Proteína hipotética	S1-C, contém domínio PDZ C-terminal X
9	MmSR116_0124	Mrad2831_5430	Vals	COG0525 Valil-tRNA sintetase
10	MmSR116_0125	Mrad2831_5431	Proteína hipotética	(COG3827) Proteína polo- organizadora PopZ
11	MmSR116_0126	Mrad2831_5432	Proteína de membrana externa secretora do tipo I da família TolC	(COG1538) Proteína de membrane externa TolC

Figura 11. Organização gênica da proteína de membrana externa TolC associada ao sistema de secreção tipo I e bomba de efluxo de resistência a multidrogas.



* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 3.

Foram encontradas dois genes relacionados com sistema de transporte do tipo protease/lipase que codificam um transportador ABC de região transmembrana (MmSR116_2912) e uma proteína HlyD (MmSR116_2913) (Tabela 4), os quais possivelmente estão associados a uma proteína de transporte do tipo ABC - HlyB (MmSR116_2175) e uma proteína HlyD (MmSR116_2174) componentes do sistema de secreção tipo I. Curiosamente, estes genes também foram observados em *Bradyrhizobium elkanii* WSM1741 (Figura 12), mas não observados em *M. radiotolerans* JCM2831, a qual é a espécie mais próxima filogeneticamente à *M. mesophilicum* SR1.6/6. Embora *M. radiotolerans* apresente T1SS, a região e a organização diferem deste observado para *M. mesophilicum*, sugerindo que dea ter ocorrido um rearranjo nesta região. Entretanto, em uma região próxima a esta, foi observado um cluster gênico (Mm116_SR2901 a MmSR116_2904) com similaridade a um sistema de

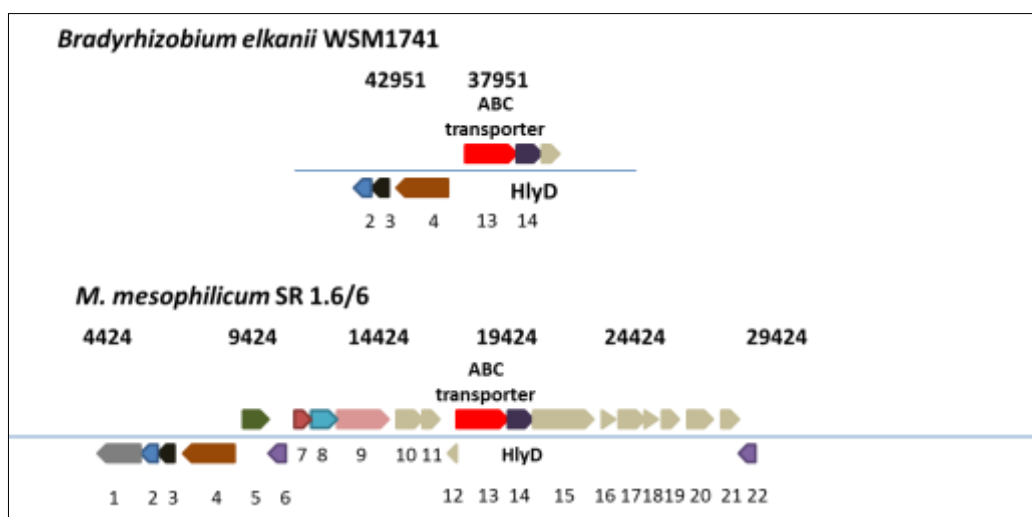
transporte de níquel junto com seu regulador LysR, que também é conservado no genoma de *M. radiotolerans* JCM2831 (Mrad2831_4380 a Mrad2831_4383).

Tabela 4. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao Sistema de Secreção tipo I transportador do tipo ABC e HlyD e seus genes vizinhos.

Código	SR 1.6/6	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> WSM1741	<i>M. radiotolerans</i> JCM2831	Anotação SR 1.6/6	Numero COG e nome da proteína
1	MmSR116_2900	X	Mrad2831_4379	Proteína da família peptidase M20/M25/M40	COG0624; Acetilometina deacetilase/succinil diaminopimelato desuccinilase ou deciclase relacionada
2	MmSR116_2901	YUODRAFT_02905	Mrad2831_4380	Proteína de membrana interna do sistema de transporte dependente de proteína de ligação	COG1173 dipeptídeo tipo ABC/oligopeptídeo/sistema de transporte de níquel, componente de permease
3	MmSR116_2902	YUODRAFT_02904	Mrad2831_4381	Proteína de membrana interna do sistema de transporte dependente de proteína de ligação	COG0601 dipeptídeo tipo ABC/oligopeptídeo/sistema de transporte de níquel, componente de permease
4	MmSR116_2903	YUODRAFT_02908	Mrad2831_4382	53 Proteínas extracelulares de ligação de soluto	COG0747 Sistema de transporte ABC, componente periplasmático
5	MmSR116_2904	YUODRAFT_02898	Mrad2831_4383	Regulador transcricional da família LysR	COG0583 Regulador transcricional de ligação de DNA, família LysR
6	MmSR116_2905	X	Mrad2831_4384	Pirofosfatase diacilglicerol CDP	COG2134 Pirofosfatase diacilglicerol CDP
7	MmSR116_2906	X	Mrad2831_4261	YagT	COG2080 Desidrogenase de monóxido de carbono do tipo aeróbia, subunidade menor, família CoxS/CutS
8	MmSR116_2907	X	Mrad2831_4262	YagS	COG1319 CO ou xantina desidrogenase, subunidade de ligação de FAD

9	MmSR116_2908	X	Mrad2831_4263	YagR	COG1529 CO ou xantina desidrogenase, subunidade de ligação de Molibdênio
X		X	Mrad2831_4264		Proteína hipotética (76aa)
X		X	Mrad2831_4265	TonB	Receptor TonB dependente (COG1629)
10	MmSR116_2909	X	X	Domínio de ligação de FAD da fotoliase do DNA	IPR005101 Fotoliase de DNA, Ligação de FAD/criptocromo, C-terminal (SUPERFAMÍLIA SSF48173)
11	MmSR116_2910	X	Mrad2831_4266	Proteína de ligação SOUL heme	IPR011256; Fator de regulação, domínio de ligação efetor (SUPERFAMÍLIA SSF55136)
12	MmSR116_2911	X	X	Proteína hipotética	X
13	MmSR116_2912	YUODRAFT_02901	X	Transportador de região transmembran a ABC	COG4618 Protease tipo ABC/sistema de transporte de lipase, ATPase e componentes de permease
14	MmSR116_2913	YUODRAFT_02900	X	Proteína de secreção da família HlyD	COG1566 Bomba de efluxo de resistência a drogas múltiplas
15	MmSR116_2914	X	X	Proteína hipotética	X
16	MmSR116_2915	X	X	Proteína hipotética	X
17	MmSR116_2916	X	X	Quinase de histidina-, Girase de DNA B-, ATPase-like HSP90-like	X
18	MmSR116_2917	X	X	Proteína hipotética	Proteína de função desconhecida (DUF4325)
19	MmSR116_2918	X	X	Proteína de domínio PIN	X
20	MmSR116_2919	X	X	Proteína hipotética	X
21	MmSR116_2920	X	X	Proteína hipotética	X
22	MmSR116_2921	X	Mrad2831_5996	Difosfatase dicilglicerol CDP	COG2134 diacilglicerol CDP-pirofosfatase

Figura 12. Organização gênica do transportador ABC associado ao sistema de secreção tipo I com a bactéria *Bradyrhizobium elkanii* WSM1741.



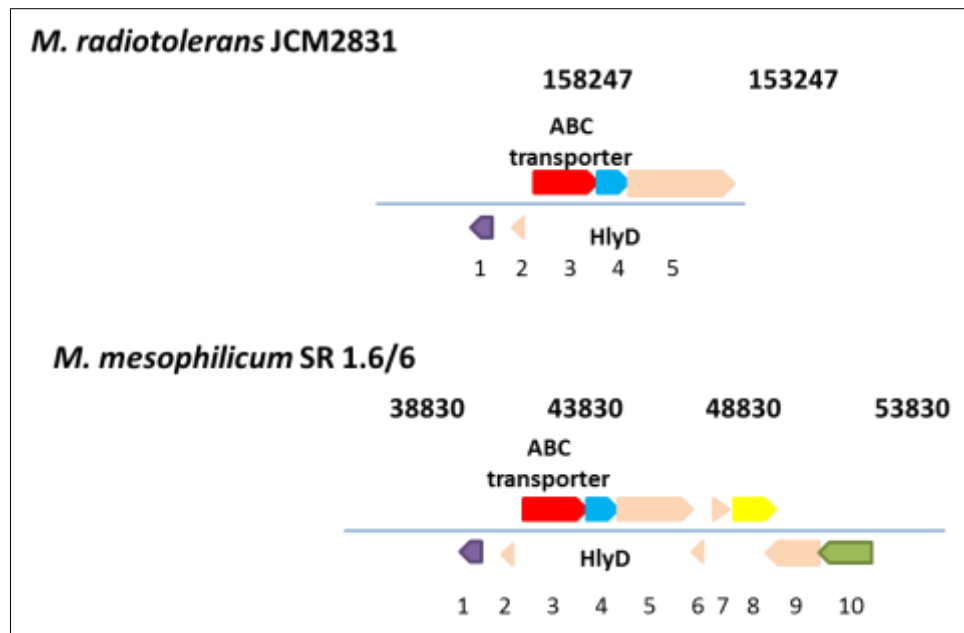
* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 4.

As locus tag MmSR116_5436 e MmSR116_5437 apresentam sequência de DNA com identidade a duas proteínas de membrana associadas ao T1SS do tipo protease/lipase e uma ATPase, respectivamente, tanto no genoma da SR1.6/6, de forma similar ao que também foi observado no genoms de *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831 (Mrad2831_5907 e Mrad2831_5906) (figura 13). Não foram encontrados outros genes relacionados a transporte nesta região do genoma (tabela 5).

Tabela 5. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao Sistema de Secreção tipo I transportador do tipo ABC e a proteína HlyD e seus genes vizinhos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 comparados com *M. radiotolerans* JCM 2831

Código	SR 1.6/6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Numero COG e nome da proteína
1	MmSR116_5434	Mrad2831_5909	Proteína hipotética	COG1595 RNA polimerase especializada subunidade sigma. Família sigma24
2	MmSR116_5435	Mrad2831_5908	Regulador transcricional, família XRE	IPR001387 Dominio tipo Cro/C1- (SMART SM00530) IPR010982 Supressor Lambda, Dominio de ligação de DNA (SUPERFAMILY SSF47413)
3	MmSR116_5436	Mrad2831_5907	Sistema de secreção tipo I. ATPase	COG4618 Sistema de transporte ABC tipo protease/lipase , componentes da ATPase e permease
4	MmSR116_5437	Mrad2831_5906	Sistema de secreção tipo I. ATPase	KO: K02022 ABC.MR.TX Proteína da família de secreção HlyD
5	MmSR116_5438	Mrad2831_5905	Proteína hipotética	X
6	MmSR116_5439	X	Proteína hipotética	IPR013325Factor sigma RNA, região 2 (SUPERFAMILY SSF88946)
7	MmSR116_5440	X	Proteína hipotética	X
8	MmSR116_5441	X	Proteína hipotética	COG4974 - Sítio específico recombinase XerD
9	MmSR116_5442	X	Dominio PHP	pfam02811
10	MmSR116_5443	X	Proteína hipotética	COG4544 – Proteína conservada não caracterizada

Figura 13. Organização gênica do transportador ABC associado ao sistema de secreção tipo I e a proteína da família HlyD comparando com *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831.



* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 5.

O sistema de secreção Twin arginine (TAT) foi identificado no genoma da *M. mesophilicum* SR1.6/6 (MmSR116_0754 TatC; MmSR116_0755 TatB e MmSR116_0756 TatA) (Tabela 6). Este sistema é necessário para a translocação de proteínas através do periplasma até um dos sistemas de secreção. Ortólogos desses genes, os quais encontram-se agrupados em um cluster gênico (figura 14), também foram observados no genoma de *M. radiotolerans* JCM 2831 (Mrad2831_2762 TatC; Mrad2831_2763 TatB e Mrad2831_2764 TatA).

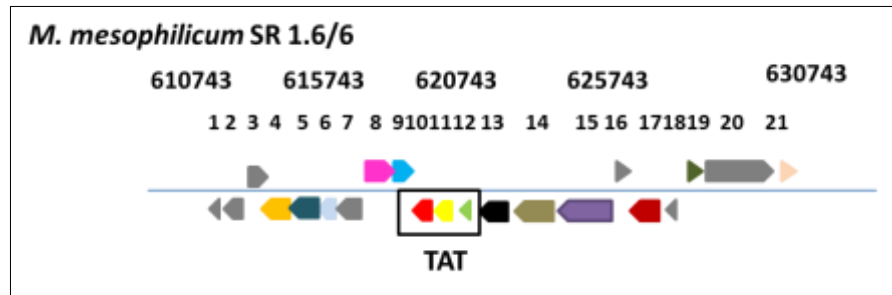
Tabela 6. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao Sistema transporte TAT e seus genes vizinhos.

Código	SR 1.6/6	Methylobacterium radiotolerans JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Numero COG e nome da proteína
1	MmSR116_0745	Mrad2831_2751	Proteína hipotética	X
2	MmSR116_0746	Mrad2831_2752	Familia proteica ErfK/YbiS/YcfS/YnhG	X
3	MmSR116_0747	Mrad2831_2753	Superfamilia de proteífan hista deacetilase	COG0123 Acetoina deacetilase AcuC ou deacetilase relacionada

4	MmSR116_0748	Mrad2831_2755	3,4-dihydroxi-2-butanona 4-fosfato sintase	COG0108 3,4-dihidroxi-2-butanone 4-fosfato sintase
5	MmSR116_0749	Mrad2831_2757	Corismato sintase	COG0082 Corismato sintase
6	MmSR116_0750	Mrad2831_2758	Proteína hipotética	X
7	MmSR116_0751	Mrad2831_2759	Acido anhidro-N-acetilmuramico quinase	COG2377 1,6-Anhidro-N-acetilmuramato quinase
8	MmSR116_0752	Mrad2831_2760	tirosil-tRNA sintetase	COG0162 Tirosil-tRNA sintetase
9	MmSR116_0753	Mrad2831_2761	Regulador transcricional de dois componentes, familia hélice-alça-hélice	COG0745 DNA-binding response regulator, OmpR family, contains REC and winged-helix (wHTH) domain
10	MmSR116_0754	Mrad2831_2762	Proteína traslocase Sec-independente subunidade TatC	COG0805 Vía de secreção Sec-independente componente TatC
11	MmSR116_0755	Mrad2831_2763	Proteína de traslocação Twin-arginine subunidade TatB	COG1826 Sec-independente Proteína traslocase protein translocase TatB
12	MmSR116_0756	Mrad2831_2764	Proteína traslocase Sec-independente subunidade TatA	TIGR01411; Twin arginine proteína traslocase, Familia TatA/E
13	MmSR116_0757	Mrad2831_2765	beta-N-acetilhexosaminidase	COG1472 Beta-glicosidase periplasmática e glicosidasas relacionadas
14	MmSR116_0758	Mrad2831_2766	Domínio de esporulação contendo proteína	COG3147 Proteína de divisão celular DedD (proteína periplasmática envolvida em divisão)
15	MmSR116_0759	Mrad2831_2767	arginil-tRNA sintetase	COG0018 Arginil-tRNA sintetase
16	MmSR116_0760	Mrad2831_2768	Proteína hipotética	X
17	MmSR116_0761	Mrad2831_2769	Desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase	COG0232 dGTP Trifosfohidrolase
18	MmSR116_0762	X	Proteína hipotética	X
19	MmSR116_0763	Mrad2831_2770	Cluster Ferro-enxofre montagem de proteína acessória	COG0316 Cluster Fe-S proteína de ligação de ferro IscA

20	MmSR116_0764	Mrad2831_2771	Proteína hipotética	X
21	MmSR116_0765	Mrad2831_2772	Proteína integral de membrana	COG5472 Proteína integral de membrana

Figura 14. Organização gênica do sistema TAT em *M. mesophilicum* SR1.6/6



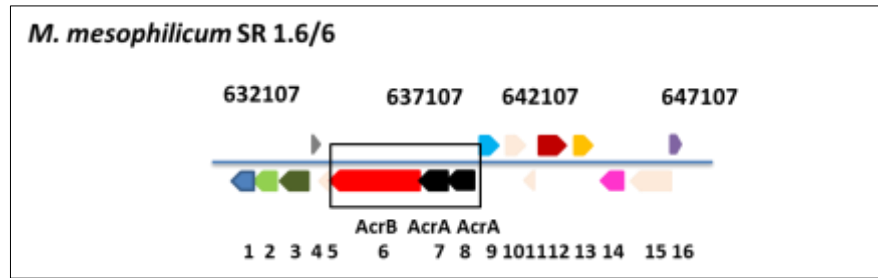
* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 6.

Foram observados ortólogos que codifica uma bomba de efluxo multidrogas no genoma da *M. mesophilicum* SR1.6/6 (MmSR116_0771 a MmSR116_0774), o qual é codificado pelos genes AcrAB (Acriflavina) e o regulador AcrR. Este sistema também foi observado no genoma de *M. radiotolerans* JCM 2831 (Mrad2831_2780 a Mrad2831_2783), e em ambos organizados em um cluster (Figura 15). Além disso, foi observado um sistema de transporte associado a uma ATPase de sulfonatos, nitratos e bicarbonatos nas regiões próximas á bomba de efluxo (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas a bomba de efluxo de multidrogas AcrAB, seu regulador AcrR e seus genes vizinhos de *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *M. radiotolerans* JCM 2831.

Código	SR 1.6/6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Nome da proteína e numero COG
1	MmSR116_0766	Mrad2831_2775	Transportador do tipo ABC	COG1116 Transportador do tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, componente ATPase
3	MmSR116_0767	Mrad2831_2776	Sistema de transporte dependente de ligação a proteína. Proteína de membrana interna	COG0600 Transportador do tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato transport system, componente permease
3	MmSR116_0768	Mrad2831_2777	Transportador do	COG0715 Transportador do

			tipo ABC periplasmático Proteína de ligação do soluto	tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato transport system, componente permease
4	MmSR116_0769	Mrad2831_2778	coativador transcricional / pterina desidratase	COG2154 Pterina-4a- carbinolamina desidratase
5	MmSR116_0770	Mrad2831_2779	Proteína hipotética	X
6	MmSR116_0771	Mrad2831_2780	Proteína de resistência a Acriflavina	COG0841; Bomba de efluxo de multidrogas subunidade AcrB
7	MmSR116_0772	Mrad2831_2781	Transportador MFP, família RND bomba de efluxo	COG0845; Bomba de efluxo de multidrogas subunidade AcrA (proteína de fusão de membrana)
8	MmSR116_0773	Mrad2831_2782	MFP, família RND bomba de efluxo	COG0845 Bomba de efluxo de multidrogas subunidade AcrA (proteína de fusão de membrana)
9	MmSR116_0774	Mrad2831_2783	Regulador transcricional família TetR	COG1309 regulador transcricional de ligação de DNA, Família AcrR
10	MmSR116_0775	Mrad2831_2787	Proteína hipotética	X
11	MmSR116_0776	Mrad2831_2788	Proteína hipotética	X
12	MmSR116_0777	Mrad2831_2789	Formil-CoA Transferase	COG1804 Crotonobetainil- CoA:carnitina CoA-transferase CaiB e transferases relacionadas a acil-CoA
13	MmSR116_0778	Mrad2831_2790	methionil-tRNA formiltransferase	COG0223 Methionil-tRNA formiltransferase
14	MmSR116_0779	Mrad2831_2791	L-fucose fosfato aldolase	COG0235 Ribulose-5-fosfato 4-epimerase/Fucose-1-fosfato aldolase
15	MmSR116_0780	Mrad2831_2792	Família de transportadores major facilitator	KOG2504 Transportador monocarboxilato
16	MmSR116_0781	Mrad2831_2793	GntR family transcriptional regulator	COG1802 regulador transcricional de ligação de DNA, Família GntR

Figura 15. Organização gênica do sistema AcrAB em *M. mesophilicum* SR1.6/6

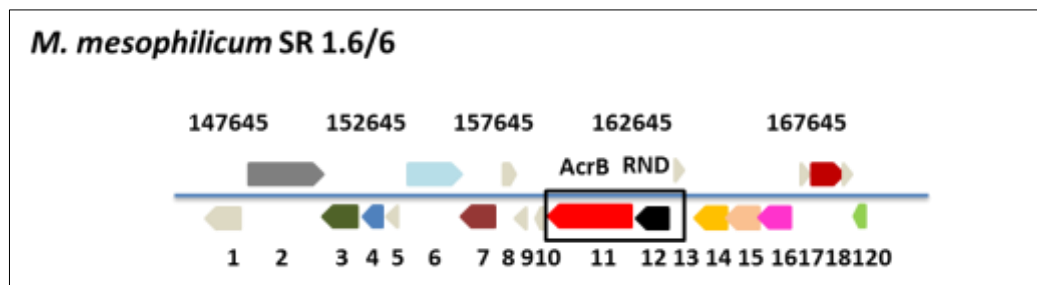
* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 7.

Vários genes que codificam para a proteína de fusão de membrana AcrB relacionada as bombas de efluxo de multidrogas e seus transportadores foram observados em *M. mesophilicum* SR1.6/6 (MmSR116_1964 anotado como AcrB e MmSR116_1965 anotado como transportador de efluxo da família RND (Resistance-Nodulation-cell Division). Organização semelhante foi observada no genoma de *M. radiotolerans* JCM 2831 (Mrad2831_5104 para AcrB e Mrad2831_5103 para transportador de efluxo) (Tabela 8). Cabe ressaltar que nos locus tag MmSR116_1957 e Mrad2831_5096, tanto para *M. mesophilicum* SR1.6/6 quanto para *M. radiotolerans* JCM 2831, respectivamente, foi observada uma permease (COG0679) que pode estar envolvida em transporte através de um gradiente de concentração (figura 16).

Tabela 8. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas a bomba de efluxo de multidrogas AcrB e seus genes próximos de *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *M. radiotolerans* JCM 2831.

Código	SR 1.6/6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Nome da proteína e numero COG
1	MmSR116_1954	X	Dominio de ligação de trasposase, dedos de Zinco - Trasposase IS66/ IS66	X
2	MmSR116_1955	Mrad2831_5094	Proteína de reparo de ruptura de fita dupla AddB	COG3893 Inactivated superfamily I helicase
3	MmSR116_1956	Mrad2831_5095	Proteína desidrogenase Acyl-CoA	COG1960 Acyl-CoA dehydrogenase related to the alkylation response protein AidB
4	MmSR116_1957	Mrad2831_5096	Transportador de efluxo auxina	COG0679 Permease
5	MmSR116_1958	Mrad2831_5098	Proteína hipotética	X
6	MmSR116_1959	X	Transdutor sensorial de quimiotaxia aceitor	COG0840 Proteína de quimiotaxia aceitor de

			de metila	metila
7	MmSR116_1960	Mrad2831_5099	Cistationina gamma sintase	COG0626 Cistationina beta-liase/cistationina gamma-sintase
8	MmSR116_1961	Mrad2831_5100	TspO e proteínas relacionadas a MBR	COG3476 Proteína sensorial rica em triptofano
9	MmSR116_1962	Mrad2831_5101	Proteína hipotética	X
10	MmSR116_1963	Mrad2831_5102	Proteína hipotética	X
11	MmSR116_1964	Mrad2831_5103	Proteína de resistência a acriflavina	COG0841 Bomba de efluxo de multidrogas subunidade AcrB
12	MmSR116_1965	Mrad2831_5104	Familia RND bomba de efluxo, Subunidade MFP	X
13	MmSR116_1966	Mrad2831_5105	Proteína hipotética	X
14	MmSR116_1967	Mrad2831_5106	Glicosil transferase	COG4671 Glicosil transferase
15	MmSR116_1968	Mrad2831_5107	Familia de proteínas glicosil transferase	COG1216 Familia GT2 glicosiltransferase,
16	MmSR116_1969	Mrad2831_5108	Grupo 1, glicosil transferase	COG0438 Glicosiltransferase envolvida na biosíntese da parede celular
17	MmSR116_1970	X	Proteína hipotética	X
18	MmSR116_1971	Mrad2831_5109	Subunidades de membrana protease homólogos de estomatina/prohibitina	COG0330 Regulador de atividade Protease HflC, superfamília estomatina/prohibitina
19	MmSR116_1972	Mrad2831_5110	Proteína de membrana implicada na regulação da actividade membrana protease	COG1585 Proteína de membrana implicada na regulação da actividade membrana protease
20	MmSR116_1973	X	Subunidade de protease dependente de ATP, proteases Clp	COG0740 Protease Clp dependente de ATP, subunidade protease

Figura 16. Organização gênica de AcrB em *M. mesophilicum* SR1.6/6.

* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 8.

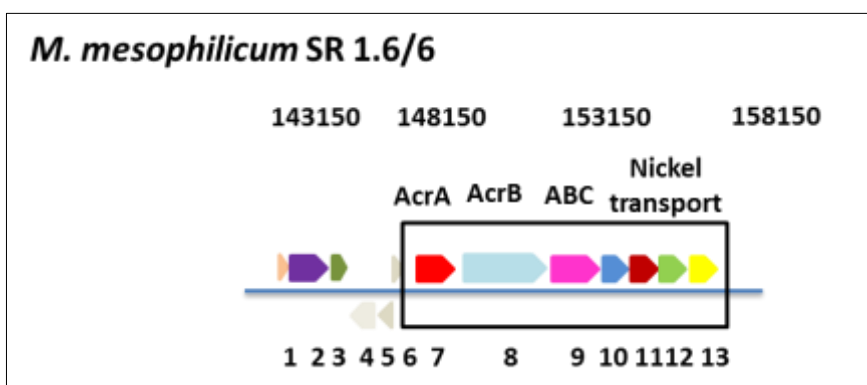
Foram observadas proteínas relacionadas também com bombas de efluxo multidrogas associadas com transporte de níquel no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 (Mmsr116_3047 AcrA, Mmsr116_3048 AcrB e Mmsr116_3049 transportador do tipo ABC) e um sistema de transporte de metais está presente próximo a esta bomba de efluxo (tabela 9). Estes genes encontram-se agrupados em um mesmo cluster junto com transportadores do tipo ABC (figura 17).

Tabela 9. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas à bomba de efluxo de multidrogas AcrA e seus genes próximos de *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *M. radiotolerans* JCM 2831.

Código	SR 1.6/6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Nome da proteína e numero COG
1	Mmsr116_3041	Mrad2831_4464	Proteína com função desconhecida YGGT	X
2	Mmsr116_3042	Mrad2831_4465	L-eritro-3-metilmalil-CoA desidratase	COG2030 Acil desidratase
3	Mmsr116_3043	X	Dominio contendo proteína Acetiltransferase (GNAT)	COG1247 L-amino acid N-aciltransferase YncA
4	Mmsr116_3044	X	Proteína de membrana externa	X
5	Mmsr116_3045	X	Família de proteínas ErfK/YbiS/YcfS/YnhG	X
6	Mmsr116_3046	Mrad2831_4471	Proteína hipotética	X
7	Mmsr116_3047	Mrad2831_4472	Família RND, bomba de efluxo de multidrogas, subunidade MFP	COG0845 Bomba de efluxo de multidrogas subunidade AcrA (Proteína de fusão de membrana)
8	Mmsr116_3048	Mrad2831_4473	Família de proteínas de efluxo (HAE1)	COG0841 Bomba de efluxo de multidrogas subunidade AcrB
9	Mmsr116_3049	Mrad2831_4474	Proteína de ligação a soluto extracelular	COG0747 Transportador do tipo ABC, componente periplasmático
10	Mmsr116_3050	Mrad2831_4475	Proteína de ligação dependente de sistema	COG0601 Transportador do tipo ABC, sistema de transporte

11	Mmsr116_3051	Mrad2831_4476	de transporte de membrana interna Proteína de ligação dependente de sistema de transporte de membrana interna	dedipeptideo/oligopeptideo/niquel componentes de permease COG1173 Transportador do tipo ABC, sistema de transporte
12	Mmsr116_3052	Mrad2831_4477	Trasnportador do tipo ABC oligopeptideo/dipeptideo ATPase	dedipeptideo/oligopeptideo/niquel componentes de permease COG0444 sistema de transporte ABC
13	Mmsr116_3053	Mrad2831_4478	Trasnportador do tipo ABC oligopeptideo/dipeptideo ATPase	dipeptideo/oligopeptideo/niquel, componente ATPse COG4608 Sistema de transporte ABC de oligopeptideos, componentes de ATPase

Figura 17. Organização gênica de AcrA em *M. mesophilicum* SR1.6/6.



* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 9.

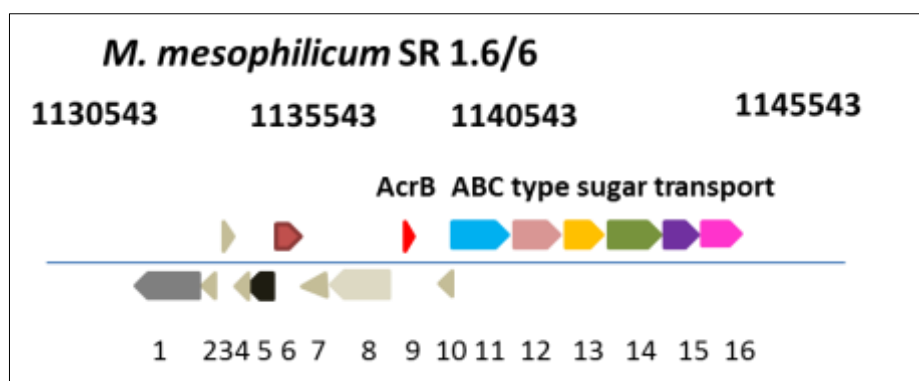
Outro gene relacionado com bomba de efluxo e transporte de glicerol foi observado no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 (MmSR116_1241) (figura 18). Este gene codifica uma proteína transmembrana AcrB de uma bomba de efluxo multidrogas, com similaridade a um gene de *M. radiotolerans* JCM2831 (Mrad2831_3044) e outro de *P. aeruginosa* ATCC 14886 (PABE171_3002), também envolvidos com bombas de efluxo da família RND (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas à bomba de efluxo de multidrogas AcrB e seus genes próximos de *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *M. radiotolerans* JCM 2831.

Código	SR 1.6/6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14886	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Nome da proteína e numero COG
1	Mmsr116_1233	X	X	Proteína hipotética	COG2358; Sistema de transporte não caracterizado tipoTRAP, component periplasmático
2	Mmsr116_1234	X	X	Proteína hipotética	X
3	Mmsr116_1235	X	X	Proteína hipotética	X
4	Mmsr116_1236	X	X	Proteína hipotética	X
5	Mmsr116_1237	X	X	Proteína hipotética	COG3247; Proteína de membrana não caracterizado HdeD, familia DUF308
6	Mmsr116_1238	X		Proteína intrínseca	COG0580 Facilitador de toma de glicerol e aquaporinas (Major Intrinsic Protein Family)
7	Mmsr116_1239	X	X	Proteína hipotética	X
8	Mmsr116_1240	X	X	Domínio de proteínas Hint	X
9	Mmsr116_1241	PABE171_3002	Mrad2831_3044	Familia de efluxo (HAE1)	SSF82866 Bomba de efluxo de multidrogas AcrB domínio transmembrana
10	Mmsr116_1242	X	X	Domínio de proteínas Hint	X
11	Mmsr116_1243	X		Proteína de ligação de soluto bacteriano extracelular	COG1653; Transportador do tipo ABC, sistema de transporte periplasmático glycerol-3-fosfato
12	Mmsr116_1244	X	X	Proteína de ligação dependente de um sisistema de transporte de membrana interna	COG1175 Transportador do tipo ACB de açúcar, componente permease
13	Mmsr116_1245	X	X	Proteína de ligação dependente de um sisistema de transporte de	COG0395 Transportador do tipo ABC, sistema de transporte periplasmático

14	Mmsr116_1246	X	X	membrana interna Transportador do tipo ABC	glycerol-3-fosfato COG3839 Transportador do tipo ACB de açúcar, componente permease
15	Mmsr116_1247	X	X	Proteína bacteriana do tipo Oxidoreductase	COG0673; Desidrogenase
16	Mmsr116_1248	X	X	Proteína regulatoria bacteriana, familiaGntR	COG1802; Proteína regulatoria bacteriana, familiaGntR.

Figura 18. Organização gênica de AcrB em *M. mesophilicum* SR1.6/6.



* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 10.

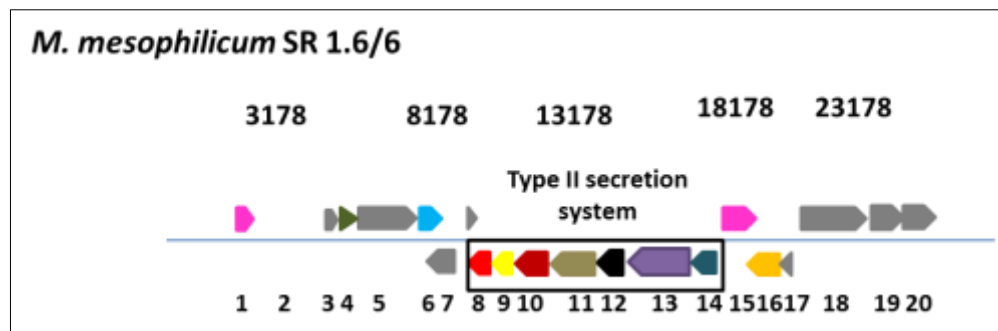
Genes que codificam proteínas do T2SS foram observados no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 (MmSR116_5672 a MmSR116_5679), de forma similar ao observado no genoma de *M. radiotolerans* JCM 2831 (Mrad2831_3796 a Mrad2831_3789) (Tabela 11). Estes genes estão organizados em um cluster relacionado à montagem das proteínas do sistema: com uma ATPase que fornece energia ao T2SS, um complexo de membrana externa, um complexo de membrana interna e o pseudopilus (figura 19). Algumas destas proteínas estão relacionadas com a montagem do pilus como um complexo que conecta a membrana interna com a membrana externa do sistema de secreção, onde a secretina (MmSR116_5677) funciona como um poro de translocação na membrana externa. Os genes que codificam as proteínas relacionadas com a formação do pilus (MmSR116_5672, MmSR116_5673, MmSR116_5675, MmSR116_5676, MmSR116_5678 e MmSR116_5679) e a ATPase encontrada no locus tag MmSR116_5674) também foram observados.

Tabela 11. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao sistema de secreção do tipo II e seus genes próximos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *M. radiotolerans* JCM 2831.

Código	SR 1.6/6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Nome da proteína e numero COG
1	MmSR116_5664	Mrad2831_3805	Proteína ligase lipoato B	COG0321 Proteína ligase lipoato B
2	MmSR116_5665	Mrad2831_3804	Porina seletiva de carboidrato OprB	COG3637 proteína Opacity e antígenos de superfície relacionados
3	MmSR116_5666	Mrad2831_3803	Proteína não caracterizada provavelmente envolvida em transporte e afinidade ao Fe ²⁺	COG3470 Proteína não caracterizada provavelmente envolvida em transporte e afinidade ao Fe ²⁺
4	MmSR116_5667	Mrad2831_3802	Dominio tipo Cupredoxina	IPR008972 Cupredoxina (SUPERFAMILY SSF49503)
5	MmSR116_5668	Mrad2831_3801	Comínio de ligação 4Fe-4S	COG0348 Poliferredoxina
6	MmSR116_5669	Mrad2831_3800	Ferri permease FTR1	COG0672 Permease de alta afinidade Fe ²⁺ /Pb ²⁺
7	MmSR116_5670	Mrad2831_3798	Dominio contendo proteína rhodanese	COG2897 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase SseA, contend dois domínios rhodanese
8	MmSR116_5671	Mrad2831_3797	GcrA	Regulador do ciclo celular
9	MmSR116_5672	Mrad2831_3796	Sistema de secreção Tipo II	COG2064 Montagem de pilus proteína TadC
10	MmSR116_5673	Mrad2831_3795	Protéina hipotética (Montagem de pilus Flp e proteína TadB)	COG4965 Montagem de pilus Flp proteína TadB
11	MmSR116_5674	Mrad2831_3794	Sistema de secreção tipo II Proteína E	COG4962 Proteína e montagem de pilus, ATPase da família CpaF
12	MmSR116_5675	Mrad2831_3793	Regulador da resposta de proteína receptora	COG4963 Proteína de montagem de pilus Flp, ATPase CpaE
13	MmSR116_5676	Mrad2831_3792	Proteína de biogenesis de pilus tipo IV CpaD/CtpE	COG5461 Proteína de biogenesis de pilus Tipo IV CpaD/CtpE
14	MmSR116_5677	Mrad2831_3791	Sistema de secreção do tipo II	COG4964 Proteína de montagem de pilus Flp, secretina CpaC
15	MmSR116_5678	Mrad2831_3790	Montagem de pilus proteína Flp, proteína CpaB	COG3745 Montagem de pilus proteína Flp, proteína CpaB
16	MmSR116_5679	Mrad2831_3789	Transportador do tipo ABC de	COG0683 Transportador do tipo ABC de

			substrato de ligação de aminoácidos e aminas família HAAT (TC3.A.1.4.-)	ammonoácidos de cadeia ramificada, component periplasmático
17	MmSR116_5680	Mrad2831_3788	Ferro-contendo álcool desidrogenase	COG145 Álcool desidrogenase, classe IV
18	MmSR116_5681	Mrad2831_3787	Regulador transcricional LysR	COG0583 Regulador transcricional de ligação de DNA, famíliaLysR
19	MmSR116_5682	Mrad2831_3786	Methylmalonato-semialdeído desidrogenase	COG1012 Acyl-CoA redutase ou outro aldeído desidrogenase NAD-dependente
20	MmSR116_5683	Mrad2831_3785	Domínio de proteína contend acil-CoA desidrogenase	COG1960 Acil-CoA desidrogenase relacionada com a proteína de resposta á alquilação AidB
21	MmSR116_5684	Mrad2831_3784	Eoil-CoA hidratase/isomerase	COG1024 Enoil-CoA hidratase/carnitina racemase

Figura 19. Organização gênica do sistema de secreção tipo II em *M. mesophilicum* SR1.6/6.



* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 11.

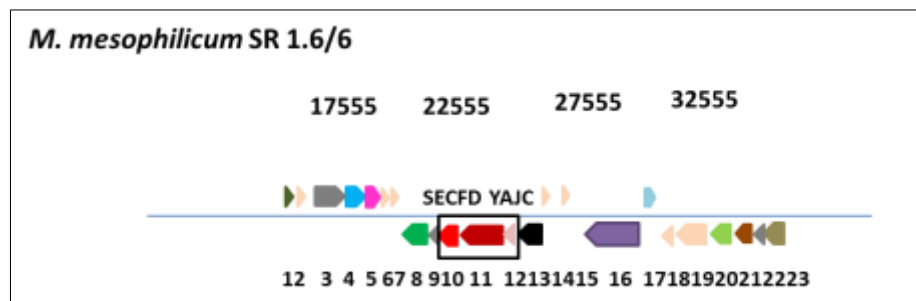
O complexo SEC relacionado com translocação de proteínas transportadas até um dos sistemas de secreção do tipo II ou V foi encontrado no genoma da *M. mesophilicum* SR1.6/6, este sistema é composto por aproximadamente oito proteínas. SecF (MmSR116_5749) e SecD (MSR116_5750) são requeridas para um transporte eficiente de proteínas, juntamente com a proteína YajC (MmSR116_5751) (tabela 12) que recruta a proteína YidC (MmSR116_2877) para promover a inserção do peptídeo sinal dentro da membrana. Estes genes também foram encontrados no genoma da *M. radiotolerans* JCM 2831 (Mrad2831_2275; Mrad2831_2276; Mrad2831_2277), com um cluster único (figura 20).

Tabela 12. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao sistema SecF, SecD e YajC e seus genes próximos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *M. radiotolerans* JCM 2831.

Código	SR 1.6/6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Nome da proteína e número COG
1	MmSR116_5740	Mrad2831_2284	Proteína da família OsmC	COG1765 Proteína relacionada com OsmC
2	MmSR116_5741	Mrad2831_2283	Proteína hipotética	X
3	MmSR116_5742	Mrad2831_2282	Seril-tRNA sintetase	COG0172 Seril-tRNA sintetase
4	MmSR116_5743	Mrad2831_2281	Proteína de sobrevivência a fase estacionária SurE	COG0496; Ampla especificidade polifosfatase e 5'/3'-nucleotidase SurE
5	MmSR116_5744	Mrad2831_2280	Proteína-L-isoaspartate (D-aspartate) O-Metiltransferase	COG2518 Proteína L-isoaspartate O-metiltransferase
6	MmSR116_5745		Proteína hipotética	X
7	MmSR116_5746		Proteína hipotética	X
8	MmSR116_5747	Mrad2831_2279	Esqualeno fitoeno sintase	COG1562 Esqualeno fitoeno sintase
9	MmSR116_5748	Mrad2831_2278	Proteína hipotética	COG3737 Proteína conservada não caracterizada, contendo o domínio Mth938
10	MmSR116_5749	Mrad2831_2277	Proteína de exportação SecF	COG0341 Preproteína translocase subunidade SecF
11	MmSR116_5750	Mrad2831_2276	Proteína de exportação SecD	COG0342 Preproteína translocase subunidade SecD
12	MmSR116_5751	Mrad2831_2275	Preproteína translocase subunidade YajC	COG1862 Preproteína translocase subunidade YajC
13	MmSR116_5752	Mrad2831_2274	Proteína hidrolase alpha/beta	COG0596 Pimeloil-ACP metil éster carboxilesterase
14	MmSR116_5753	Mrad2831_2273	Proteína hipotética	IPR027405 YidB-like (SUPERFAMILY SSF140804)
15	MmSR116_5754	Mrad2831_2271	Proteína hipotética	IPR027405 YidB (SUPERFAMILY SSF140804)
16	MmSR116_5755	Mrad2831_2270	Proteínas de membrana relacionadas à metaloendopeptidases	COG0739 Mureína DD-endopeptidase MepM e ativador mureína hidrolase NlpD, contendo o domínio LysM
17	MmSR116_5756	Mrad2831_2269	N-acetiltransferase	COG1670 Proteína

			GCN5	N-acetiltransferase, RimJ/RimL family
18	MmSR116_5757	Mrad2831_2268	Proteína hipotética	X
19	MmSR116_5758	Mrad2831_2267	Proteína hipotética	X
20	MmSR116_5759	Mrad2831_2266	Proteína hipotética	COG2961 23S rRNA A2030 N6-metilase RlmJ
21	MmSR116_5760	Mrad2831_2265	Ribonuclease T2	COG3719 Ribonuclease I
22	MmSR116_5761	Mrad2831_2264	Proteína hipotética	X
23	MmSR116_5762	Mrad2831_2263	Familia de proteínas extensinas	PS51257 Membrana lipoteica procariota sítio de ligação de lipídios

Figura 20. Organização gênica do sistema SecF, SecD e YajC em *M. mesophilicum* SR1.6/6.



* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 12.

Como foi mencionado anteriormente foram encontradas todas as proteínas relacionadas com o sistema geral de secreção SEC para translocação de efetores e moléculas. SecE é a proteína encarregada da movimentação de polipeptídeos e forma a parte do canal de saída na membrana interna. Genes que codificam este transportador foi observado no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 (MmSR116_5144) e *M. radiotolerans* JCM 2831 (Mrad2831_3846). Da mesma forma foi observada no genoma de *M. mesophilicum* um gene que codifica a proteína SecG (MmSR116_0449) componente do complexo SecYEG, a qual faz parte do canal de exportação das proteínas que serão translocados por um dos sistemas de secreção. O gene que codifica SecY foi também observado no genoma de *M. mesophilicum* (MmSR116_4396). Esta proteína participa do complexo heterotrimérico SecYEG descrito anteriormente, faz parte do canal de movimentação da proteína a ser exportada. A proteína de exportação SecB (MmSR116_5322) foi observada no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6. Esta proteína que funciona como chaperona e transporta as proteínas ao serem translocadas até SecA. Também foi

observada uma permease relacionada com efluxo de arabinose (MmSR116_5323) e um sistema de transporte de lipídios (MmSR116_5321), que poderiam estar relacionados com esta chaperona SecB.

Finalmente dentro de grupo de proteínas relacionadas ao Sistema geral de secreção dependente de Sec foi encontrada a ATPase SecA (MmSR116_4131), sendo de grande importância para o sistema já que interage dinamicamente com o complexo da membrana interna SecYEG, dirigindo a movimentação transmembrana das proteínas que são sintetizadas para serem transferidas até o sistema de secreção específico (tabela 13).

Tabela 13. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao sistema SecA e seus genes próximos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *M. radiotolerans* JCM 2831.

Código	SR 1.6/6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Nome da proteína e numero COG
1	MmSR116_4120	Mrad2831_0748	HpcH/HpaI aldolase	COG3836 2-ceto-3-desoxi-L-ramnonato aldolase RhmA
2	MmSR116_4121	Mrad2831_0747	Proteína TolQ	COG0811 Proteína de transporte de biopolímero ExbB/TolQ
	MmSR116_4122	Mrad2831_0746	Proteína TolR	COG0848 Proteína de transporte de biopolímero ExbD
3	MmSR116_4123	Mrad2831_0745	Proteína de divisão celular associada a TolA	KO:K03646 tolA Proteína de membrana importadora de colicina
4	MmSR116_4124	Mrad2831_0744	beta-propeller repeat-containing to-pal system protein TolB	COG0823 Componente periplasmático de transporte de biopolímero TolB
5	MmSR116_4125	Mrad2831_0743	Transportador da família major facilitator	IPR016196 Domínio da superfamília Major, transportador geral de substrato (SUPERFAMILY SSF103473)
6	MmSR116_4126	Mrad2831_0742	PAS/PAC Sinal de transdução sensorial histidina quinase	Sinal P 3.0 HMM (Probabilidade de peptídeo sinal=0.998) com probabilidade do sítio de clivagem 0.995 ao residuo 27

7	MmSR116_4127	Mrad2831_0741	Adenosilhomocisteinase	COG0499 S-adenosilhomocisteína hidrolase
8	MmSR116_4128		Proteína hipotética	X
9	MmSR116_4129	Mrad2831_0739	KUP Sistema de absorção de potássio	COG3158 Transportador de K ⁺
10	MmSR116_4130	Mrad2831_0738	Detiobiotina sintase	COG0132 Detiobiotina sintetase
11	MmSR116_4131	Mrad2831_0737	Preproteína traslocase SecA	COG0653 Preproteína translocase SecA (ATPase, RNA helicase)
12	MmSR116_4132	Mrad2831_0736	PpiC-tipo peptidil-prolil cis-trans isomerase	KOG3258 Parvulina tipo peptidil-prolil cis-trans isomerase
13	MmSR116_4133	Mrad2831_0735	Proteína hipotética	X
14	MmSR116_4134	Mrad2831_0734	Ferroquelatase	COG0276 Ferroquelatase
15	MmSR116_4135	Mrad2831_0733	Proteína da superfamília uracil-DNA glicosilase	COG0692 Uracil DNA glicosilase
16	MmSR116_4136	Mrad2831_0748		

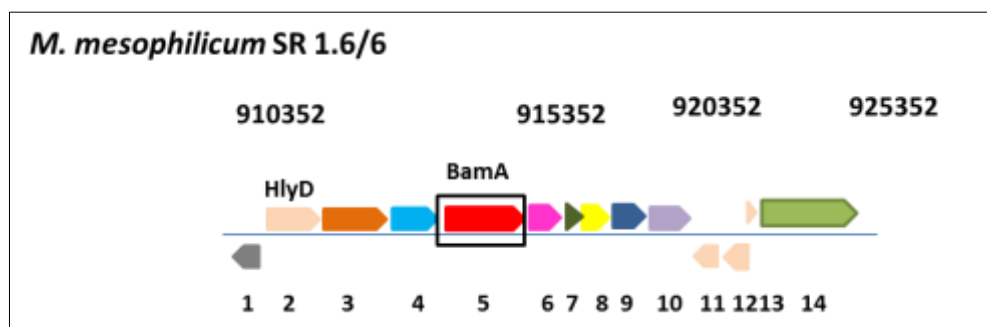
Outro importante sistema de secreção encontrado no genoma da *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi o sistema de secreção tipo V, neste caso foi encontrado o sistema Va, cujo representante é o complexo BAM (β -barrel assembly machinery) que é a encarregada da secreção de proteínas com ajuda do sistema SEC. Este complexo apresenta uma proteína de membrana externa (MmSR116_1034), a qual apresenta ortólogo no genoma de *M. radiotolerans* JCM 2831 (Tabela 14). Adicionalmente, próximo a BamA foi observada uma bomba de efluxo (MmSR116_1030; MmSR116_1031 e MmSR116_1032) associada à resistência a drogas (figura 21).

Tabela 14. Comparação de genes codificadores de proteínas associadas ao sistema de secreção tipo Va, BamA (outer membrane protein assembly complex, YaeT protein) e seus genes próximos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 e *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831.

Código	SR 1.6/6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	Anotação SR 1.6/6	Nome da proteína e numero COG
1	MmSR116_1030	Mrad2831_3443	Regulador transcricional da família TetR	COG1309 Regulador transcricional família AcrR family
2	MmSR116_1031	Mrad2831_3442	Proteína de secreção HlyD	COG1566 Bomba de efluxo de resistência de multidrogas
3	MmSR116_1032	Mrad2831_3441	EmrB/QacA Transportador da família de resistência a drogas	TC:2.A.1 Superfamília Major Facilitator (MFS)
4	MmSR116_1033	Mrad2831_3440	Metaloprotease de membrana associada a zinco	COG0750 Protease associada a membrana RseP, regulador da atividade RpoE
5	MmSR116_1034	Mrad2831_3439	Montagem do complex de proteína de membrana externa, YaeT	COG4775 Proteína de membrana externa BamA
6	MmSR116_1035	Mrad2831_3438	UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] glicosamine N-aciltransferase	COG1044 UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] glicosamine N-aciltransferase
7	MmSR116_1036	Mrad2831_3437	(3R)-hidroximiristoil-ACP desidratase	COG0764 3-hidroximiristoil/3-hidroxidecanoil-(Proteína portadora de acil) desidratase
8	MmSR116_1037	Mrad2831_3436	UDP-N-acetilglicosamina aciltransferase	COG1043 - Acil-[proteína portadora de acil]-UDP-N-acetilglicosamina O-aciltransferase
9	MmSR116_1038	Mrad2831_3435	Proteína hipotética	COG3494 Proteína conservada não caracterizada, família DUF1009
10	MmSR116_1039	Mrad2831_3434	Lipídio A-disacaridio sintase	COG0763 Lipídio A-disacaridio sintase
11	MmSR116_1040	Mrad2831_3433	Inibidor de peptidase	X
12	MmSR116_1041	Mrad2831_3432	Proteína da família I36	IPR00662 Prolyl 4-hidroxilase, subunidade alpha (SMART SM00702)
13	MmSR116_1042	Mrad2831_3431	Proteína hipotética	X

14	MmSR116_1043	Mrad2831_3430	Transportador do tipo ABC	COG4178 Sistema detransporte do tipo, componentes permease e ATPase
----	--------------	---------------	---------------------------	---------------------------------------------------------------------

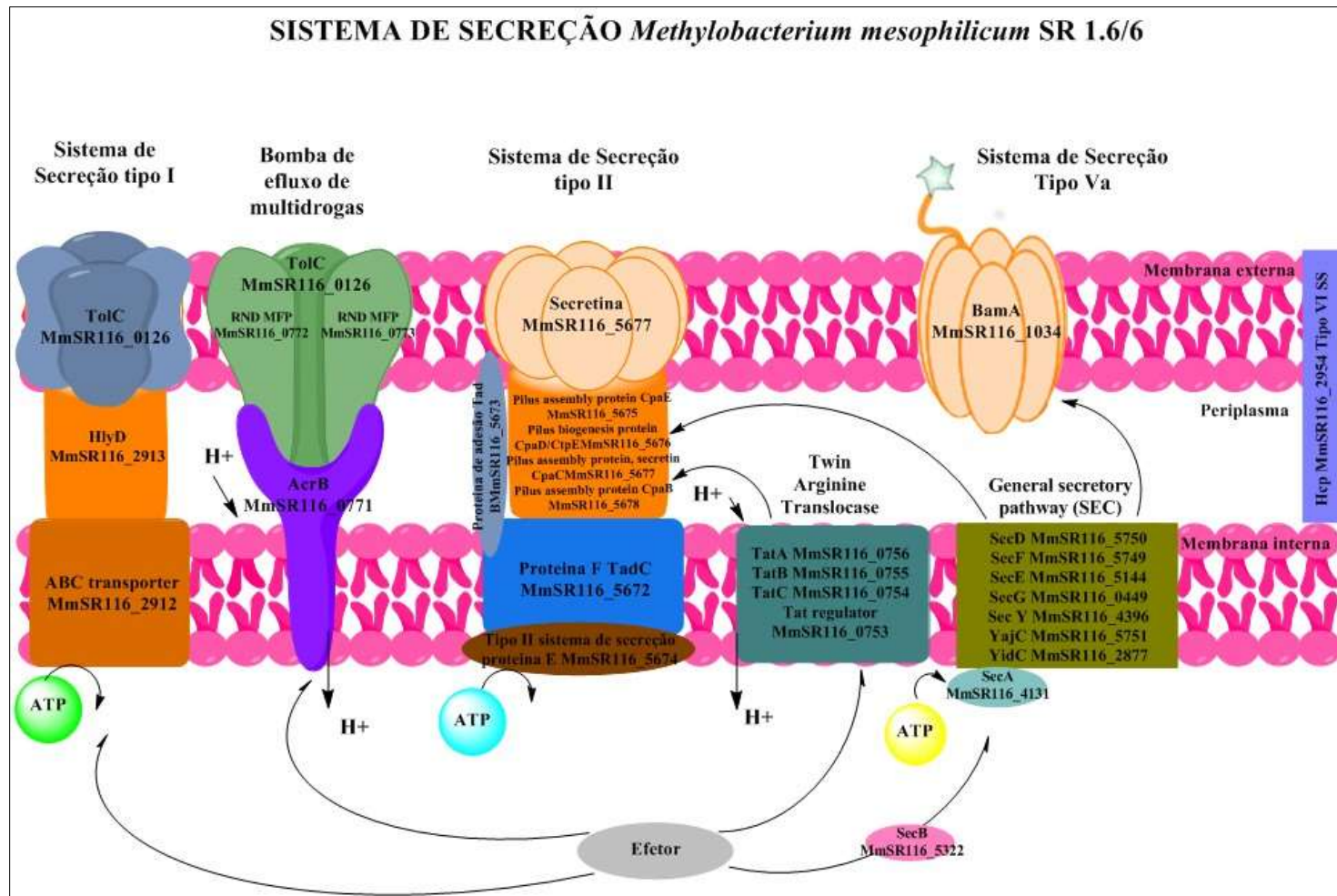
Figura 21. Organização génica proteína BAM associada ao sistema de secreção tipo V em *M. mesophilicum* SR1.6/6



* A numeração no contexto gênico corresponde ao código na tabela 14.

Assim, com os resultados obtidos nas análises do genoma e busca por genes envolvidos na codificação de proteínas associadas à sistemas de transporte de moléculas em *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi desenvolvido um modelo esquemático dos possíveis sistemas de transporte nesta bactéria endofítica (Figura 22). Foram observados 3 sistemas de secreção, 2 sistemas auxiliares de transporte e bombas de efluxo em *M. mesophilicum* SR1.6/6. Os sistemas de secreção foram T1SS, T2SS e T5aSS, os sistemas auxiliares foram Sec dependentes e Tat e as bombas de efluxo de resistência a multidrogas (MDR) da superfamília *Resistance Nodulation Cell Division* (RND) importantes na detoxificação de compostos celulares (figura 22).

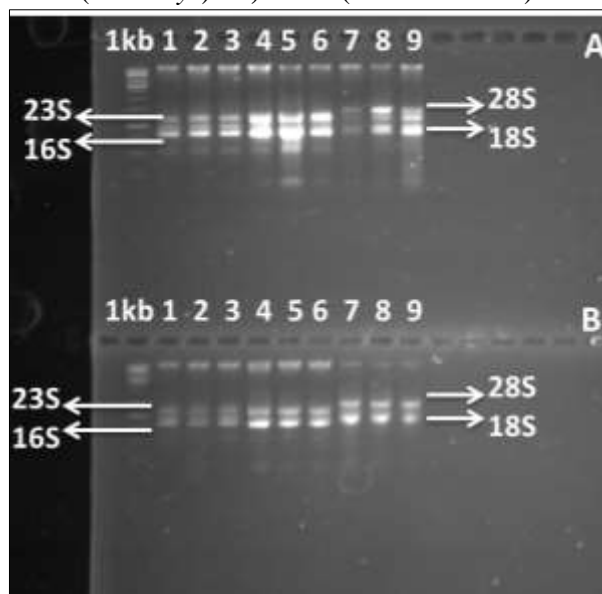
Figura 22. Modelo de Sistema de secreção e bomba de efluxo de multidrogas (MDR) envolvidos na translocação de moléculas em *M. mesophilicum* SR1.6/6



5.4 Análise da expressão de genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 durante a interação com a planta hospedeira

O RNA total foi extraído, gerando RNA de boa qualidade, como evidenciado pelas bandas de rRNAs sem degradação (Figura 23). Assim, foram testados por PCR convencional 25 pares de primers desenhados a partir das sequências de genes de sistemas de secreção (tipo I, II, III, IV, V e VI), bombas de efluxo de resistência a multidrogas, Sistema SEC e TAT de translocação de moléculas (tabela 1A em apêndice), os quais haviam sido inicialmente anotados no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6. Após confirmação, a expressão dos genes envolvidos na codificação de proteínas associadas ao sistema de secreção listados nas tabelas 2A e 2B em apêndice foram avaliados por qPCR durante a interação com plântulas de milho (*Zea mays*) e citros (*Citrus sinensis*).

Figura 23. Gel de agarose de RNA para os diferentes tratamentos em amostras de *M. mesophilicum* SR1.6/6 na presença de **A)** milho (*Zea mays*) e **B)** citros (*Citrus sinensis*).



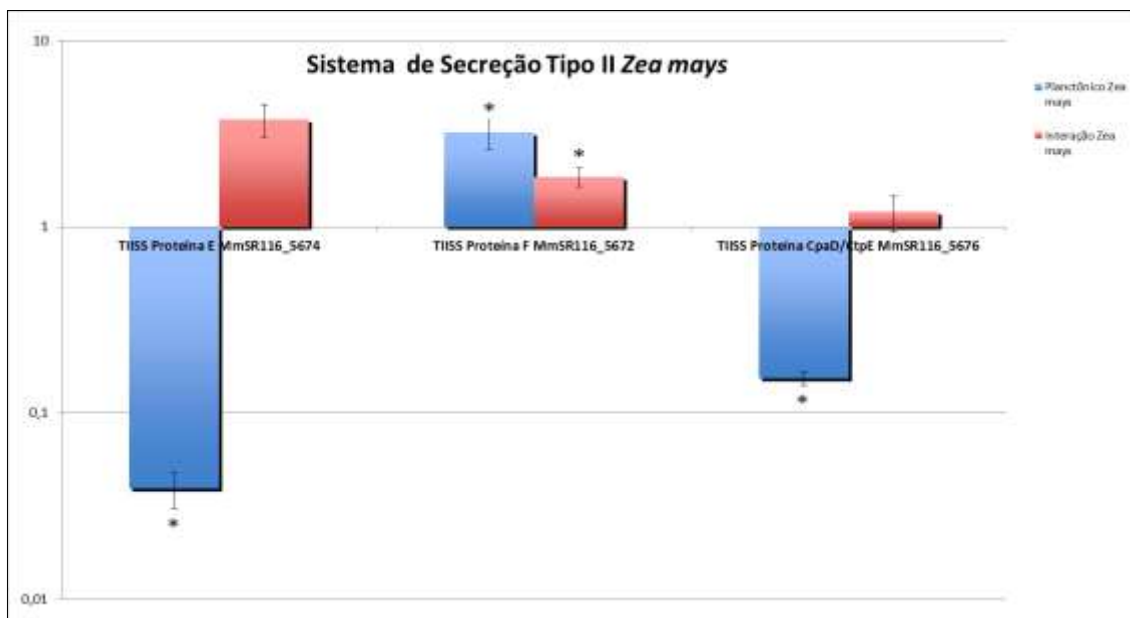
Marcador de Peso Molecular **1kb**. Poços: 1, 2 e 3) Tratamento Controle: *M. mesophilicum* SR1.6/6+CHOI3, 4, 5 e 6) Tratamento Planctônico: exsudatos radiculares + *M. mesophilicum* SR1.6/6+CHOI3 e 7, 8, 9) Tratamento Interação: raízes Milho+ *M. mesophilicum* SR1.6/6 colonizando externa e internamente a raiz+CHOI3.

5.4.1 Análises da expressão de genes envolvidos com transporte em *M. mesophilicum* SR1.6/6 durante interação com plântulas de milho (*Zea mays*)

A expressão de três genes (MmSR116_5672, MmSR116_5674, MmSR116_5676) relacionados ao T2SS foi avaliada por qPCR (figura 24). Foi observado que o gene que codifica a proteína F – TadC (MmSR116_5672) foi induzido tanto no tratamento planctônico como durante a interação (superfície e interior das raízes da planta hospedeira), enquanto os genes da Proteína E, uma ATPase (MmSR116_5674) e da proteína de formação de pilus - CpaD (MmSR116_5676) foram reprimido no tratamento planctônico, mas o seu nível de expressão não foi alterado no tratamento interação (Figura 24) quando comparado com o controle (ausência da planta hospedeira).

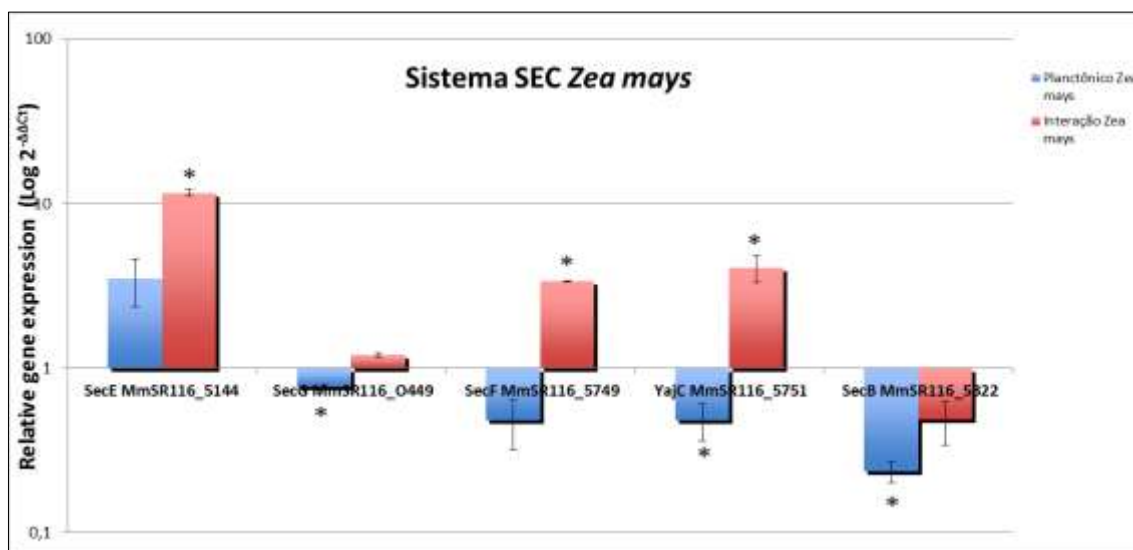
A via geral de secreção (SEC) importante para translocação de proteínas do citosol para o espaço periplasmático foi avaliado durante a interação de *M. mesophilicum* SR1.6/6 e plântulas de milho (Figura 25). Foi observado que os genes que codificam as proteínas SecE (MmSR116_5144), SecF (MmSr116_5749) e YajC (MmSR116_5751), os quais estão localizados na membrana interna foram induzidos durante a interação, enquanto os genes que codificam SecG (MmSr116_0449) e YajC (MmSR116_5751) duas proteínas de membrana e SecB (MmSR116_4131), uma chaperrona citosólica, foram reprimidos no tratamento planctônico (Figura 25). Outro sistema de translocação de proteínas do citosol para o espaço periplasmático, denominado de TAT (*Twin Arginine Translocase*) foi também avaliado (figura 26). O gene que codifica a proteína de membrana interna TatC (MmSR116_0754) foi induzido durante a interação com plântulas de milho, mas reprimido no tratamento planctônico, enquanto o gene TatB ((MmSR116_0755) foi reprimido nas duas condições avaliadas (Figura 26), sugerindo que a planta modula negativamente a expressão deste sistema de transporte.

Figura 24 - Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema de Secreção tipo II em milho



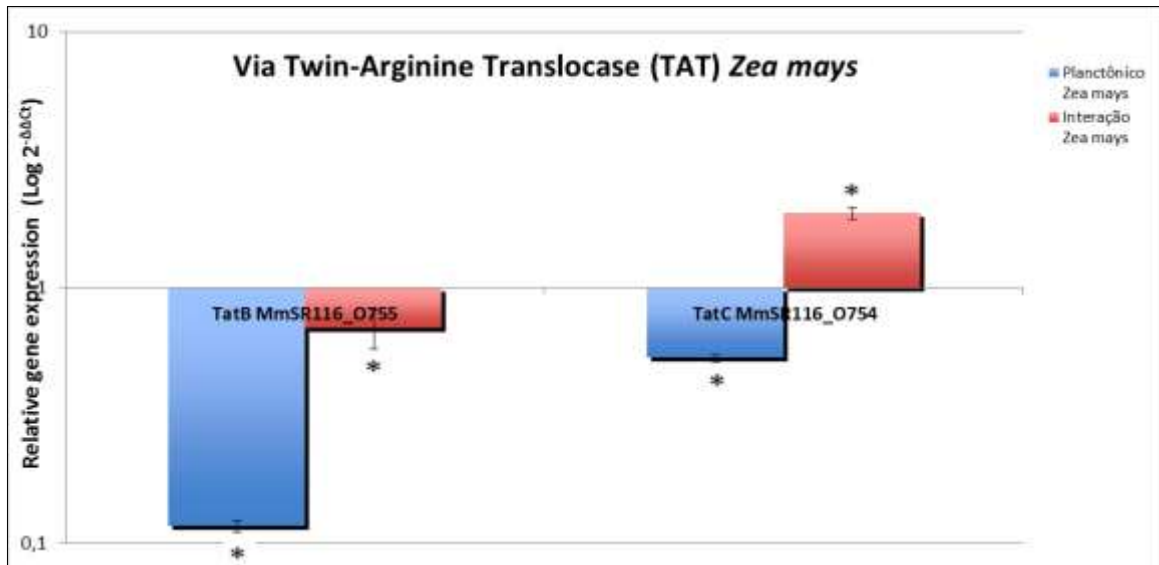
Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema de Secreção tipo II em milho, comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3+Metanol. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *zwf* e as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

Figura 25- Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema Sec em milho



Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema Sec em milho, comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3+Metanol. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *zwf* e as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

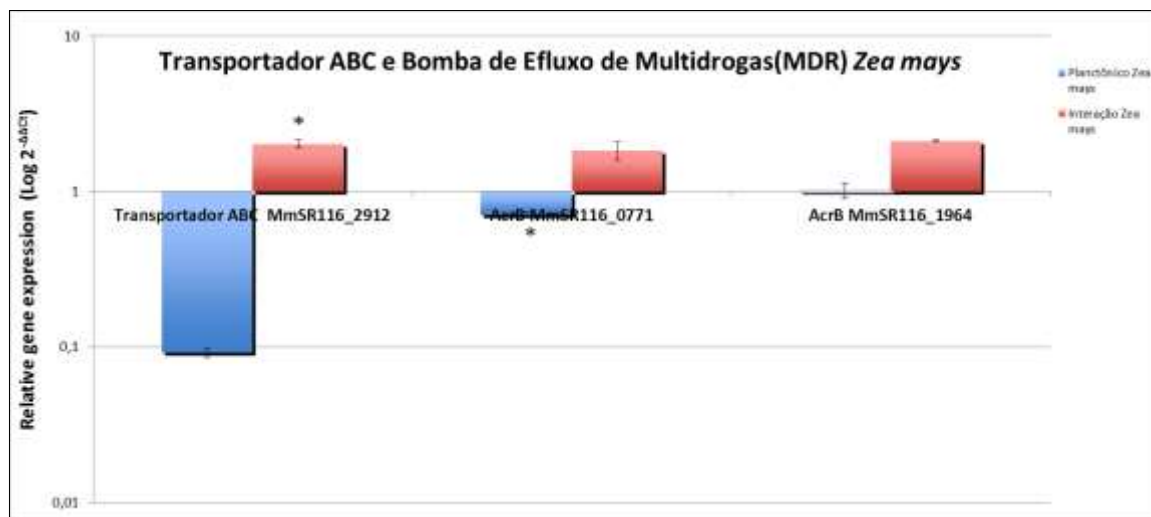
Figura 26 - Expressão gênica dos genes envolvidos na via Twin Arginine (TAT) em milho



Expressão gênica dos genes envolvidos na via Twin Arginine (TAT) em milho, comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3+Metanol. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *zwf* e as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

A bomba de efluxo de multidrogas importante na interação bacteriana com outros hospedeiros foi analisada também para dois genes da família AcrB e um transportador do tipo ABC (HlyD) de região transmembrana em *M. mesophilicum* SR1.6/6 (figura 27). Para este transportador, foi observado que gene que codifica uma proteína associada ao transportador do tipo ABC (MmSR116_2912) foi induzida durante a interação, enquanto um gene que codifica uma proteína AcrB (MmSR116_0771) foi reprimida no tratamento planctônico. A expressão de outro gene que codifica uma proteína AcrB (MmSR116_1964) não foi alterada nas condições avaliadas (figura 27), sugerindo que deva ser importante durante a colonização da planta hospedeira.

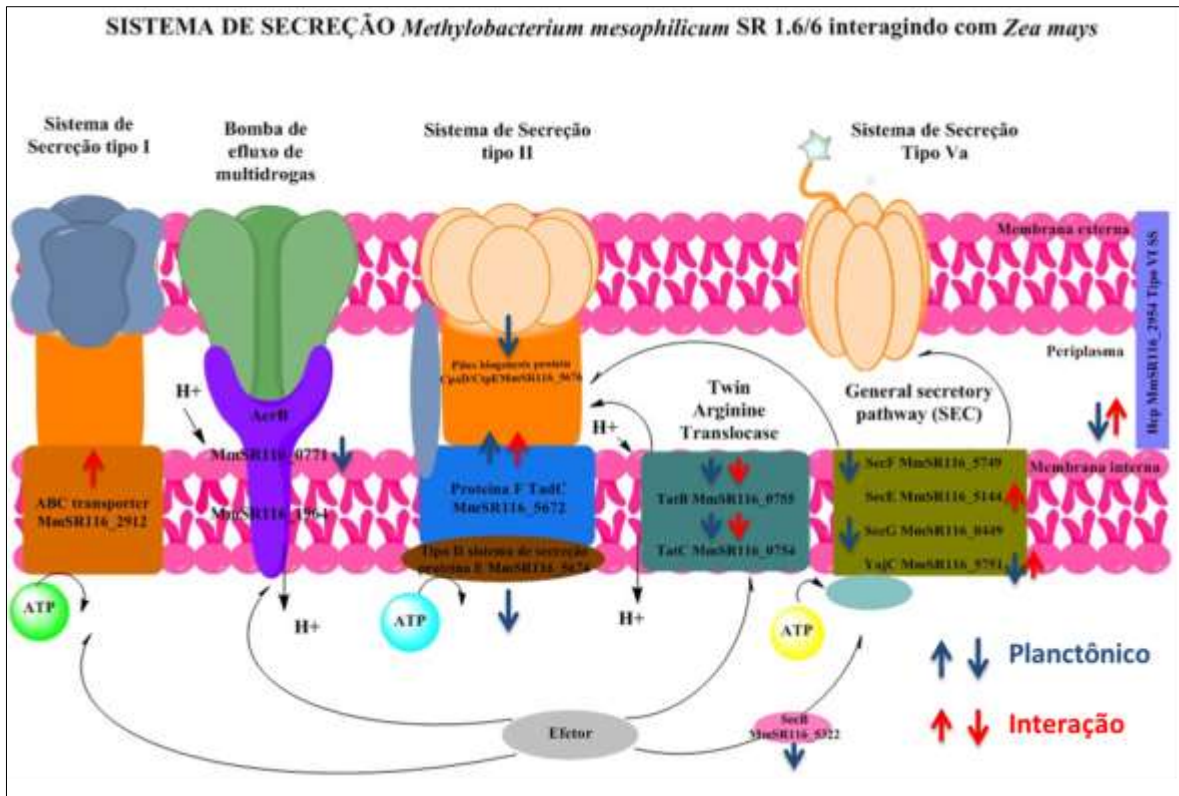
Figura 27 - Expressão gênica dos genes envolvidos na bomba de efluxo de multidroga e um transportador ABC em milho



Expressão gênica dos genes envolvidos na bomba de efluxo de multidroga e um transportador ABC em milho, comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3+Metanol. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *zwf* e as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

De forma geral, foi observado que os genes que codificam transportadores são reprimidos no tratamento planctônico e induzidos durante a interação, visto que dos 13 genes envolvidos com transporte em *M. mesophilicum* SR1.6/6 avaliados nestas condições, 8 genes foram reprimidos no tratamento planctônico e somente o gene que codifica a proteína F TadC (MmSR116_5672) do T2SS foi significativamente induzido nesta condição. Já para os genes avaliados durante a interação, 6 genes foram ativados e apenas o gene TatB (MmSR116_0755) foi reprimido na interação com plântulas de milho (figura 28).

Figura 28. Padrão de expressão de genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 que codificam proteínas envolvidas com transporte durante a interação com plântulas de milho (*Zea mays*).

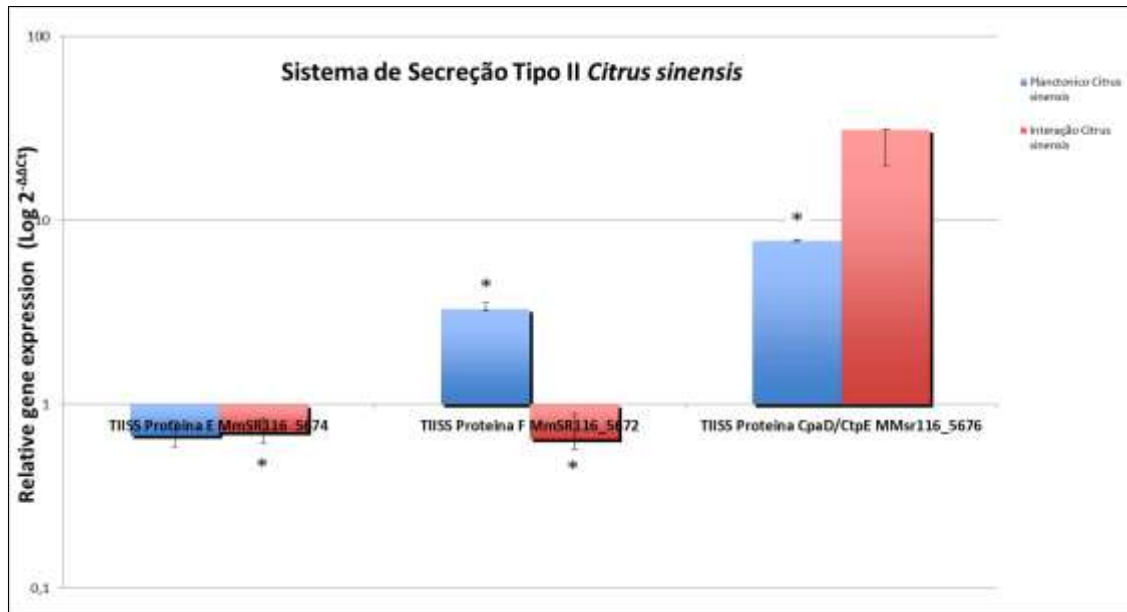


As setas indicam a direção dos níveis de expressão (Super-expresso para cima e reprimido para baixo) para os tratamentos planctônico (azul) e interação (vermelho) avaliados por PCR em tempo real em *Zea mays*+SR1.6/6.

5.4.2 Análises da expressão de genes envolvidos com transporte em *M. mesophilicum* SR1.6/6 durante interação com plântulas de citros (*citrus sinensis*)

A bactéria endofítica *M. mesophilicum* SR1.6/6 cresceu ativamente no meio de cultura com exsudados radiculares de citros e colonizou a superfície da planta hospedeira. Nestas condições foi observado que os genes que codificam a proteína F (TadC) de membrana (MmSr116_5672) e a proteína periplasmática CpaD/CtpE (MnSr116_5676) foram induzidos no tratamento planctônico, enquanto o gene que codifica a proteína E (MnSr116_5674) não foi modulada nesta condição. Por outro lado, estes genes do T2SS foram todos reprimidos durante a interação (colonização da superfície e do interior das raízes das plântulas de citros) (figura 29).

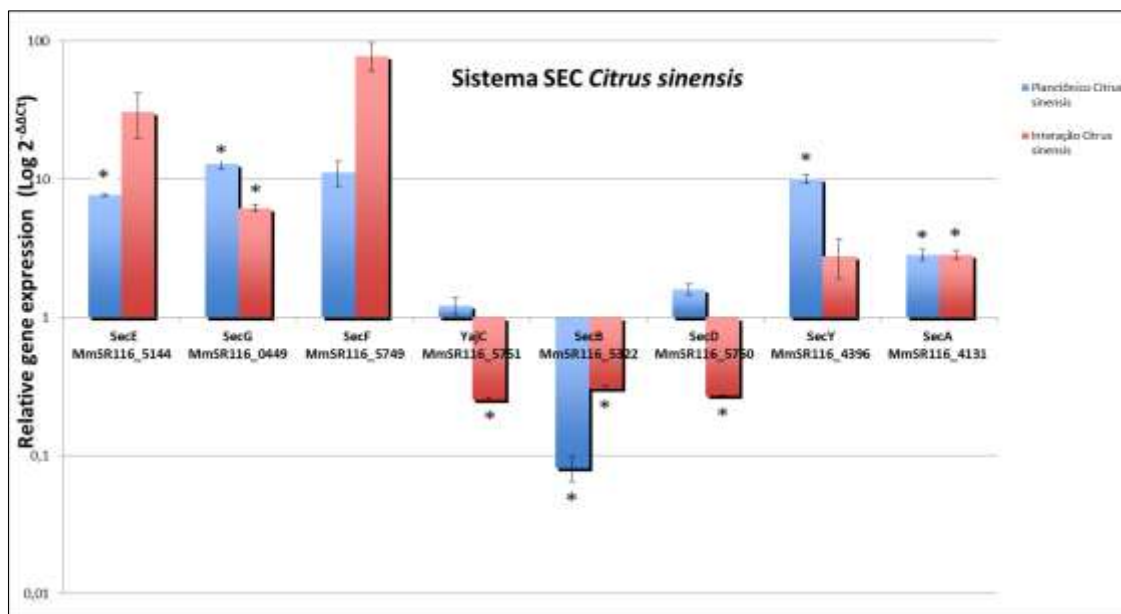
Figura 29 - Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema de secreção tipo II em citros



Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema de secreção tipo II em Citros, comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3+Metanol. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador zwfe as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

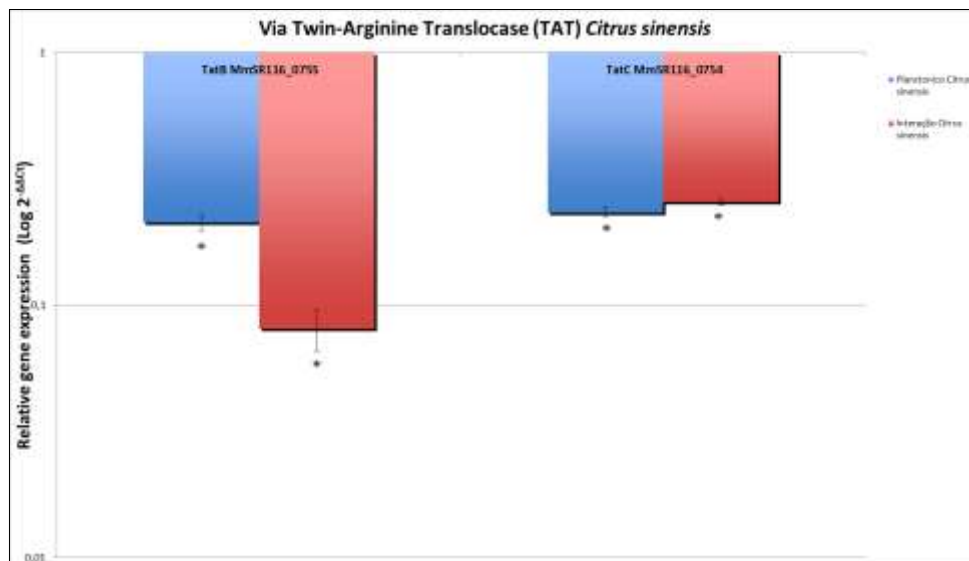
Sistemas de transporte que transportam proteínas do citosol para o espaço periplasmático são importantes tanto para T2SS como para T5SS. Neste contexto, genes que codificam proteínas dos sistemas SEC e TAT foram avaliados durante a interação de *M. mesophilicum* SR1.6/6 com plântulas de citros (Figuras 30 e 31). Para o sistema SEC, foi observado que os genes que codificam SecAEGY foram induzidos no tratamento planctônico e SecB foi reprimido, enquanto a expressão dos genes que codificam SecDF e YajC não foram modulados nestas condições quando comparado ao controle (ausência da planta hospedeira). No tratamento interação foi observado que os genes que codificam SecGA foram induzidos, enquanto os genes que codificam SecBD e YajC foram reprimidos. Os genes que codificam SecEY não foram modulados nesta condição quando comparado ao controle (Figura 30). Para o sistema TAT, foi observado que todos os 2 genes avaliados (TatBC) foram reprimidos significativamente nas duas condições avaliadas (planctônico e interação) quando comparado ao controle (figura 31).

Figura 30- Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema SEC em citros



Expressão gênica dos genes envolvidos no Sistema SEC em Citros, comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3+Metanol. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador zwf6 as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

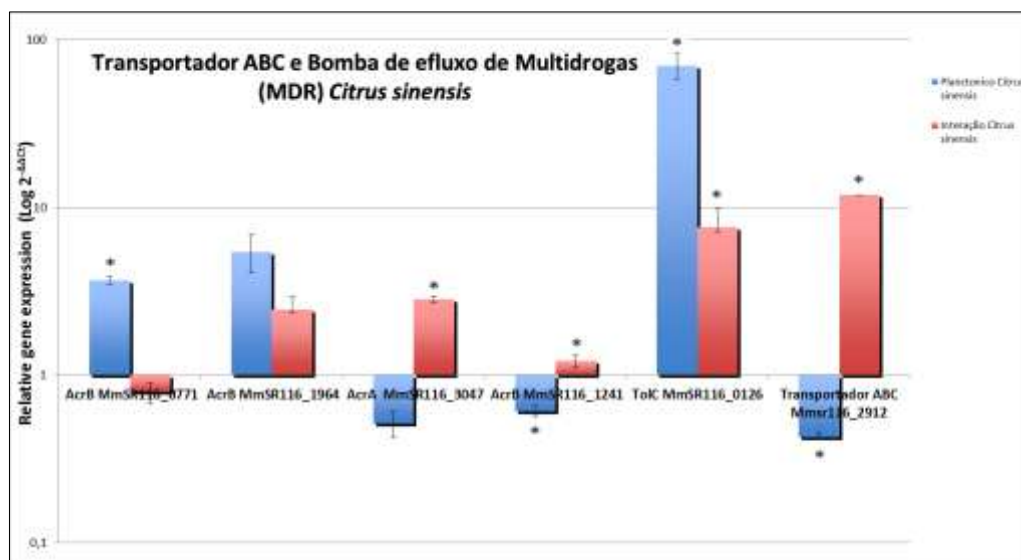
Figura 31 - Expressão gênica dos genes envolvidos na Via Twin Arginine (TAT) em Citros



Expressão gênica dos genes envolvidos na Via Twin Arginine (TAT) em Citros, comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3+Metanol. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador zwf6 as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

Tendo em vista que foram anotados no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 genes que codificam proteínas associadas a diferentes bombas de efluxo multidrogas, as quais têm sido descritas como importantes na interação de bactérias com seus hospedeiros, alguns genes foram selecionados para a avaliação na condição planctônica e interação (superfície e interior) de plântulas de citros (Figura 32). Foi observado que no tratamento planctônico ocorreu indução dos genes que codificam a proteína transmembrana AcrB (MmSR116_0771) e TolC (MmSR116_0126), sugerindo que esta bomba de efluxo de multidrogas (Figura 32) é ativada nesta condição. Por outro lado, os genes que codificam AcrB (MmSR116_1964) e AcrA (MmSR116_3047) não foram modulados neste tratamento em comparação ao controle, enquanto os genes que codificam AcrB (MmSR116_1241) e transportador ABC – HlyD (MmSR116_2912) foram reprimidos (figura 32). Nas células de *M. mesophilicum* SR1.6/6 em contato com as raízes de citros (tratamento interação) foi observado que os genes que codificam AcrB (MmSR116_1964 e MmSR116_0771) não foram modulados em comparação com o tratamento controle. Entretanto, os genes que codificam AcrA (MmSR116_3047), AcrB (MmSR116_1241), TolC (MmSR116_0126) e transportador ABC (MmSR116_2912) foram induzidos (Figura 32), mostrando que tanto a bomba de efluxo de multidrogas como o T1SS foram ativados durante a interação com a planta hospedeira.

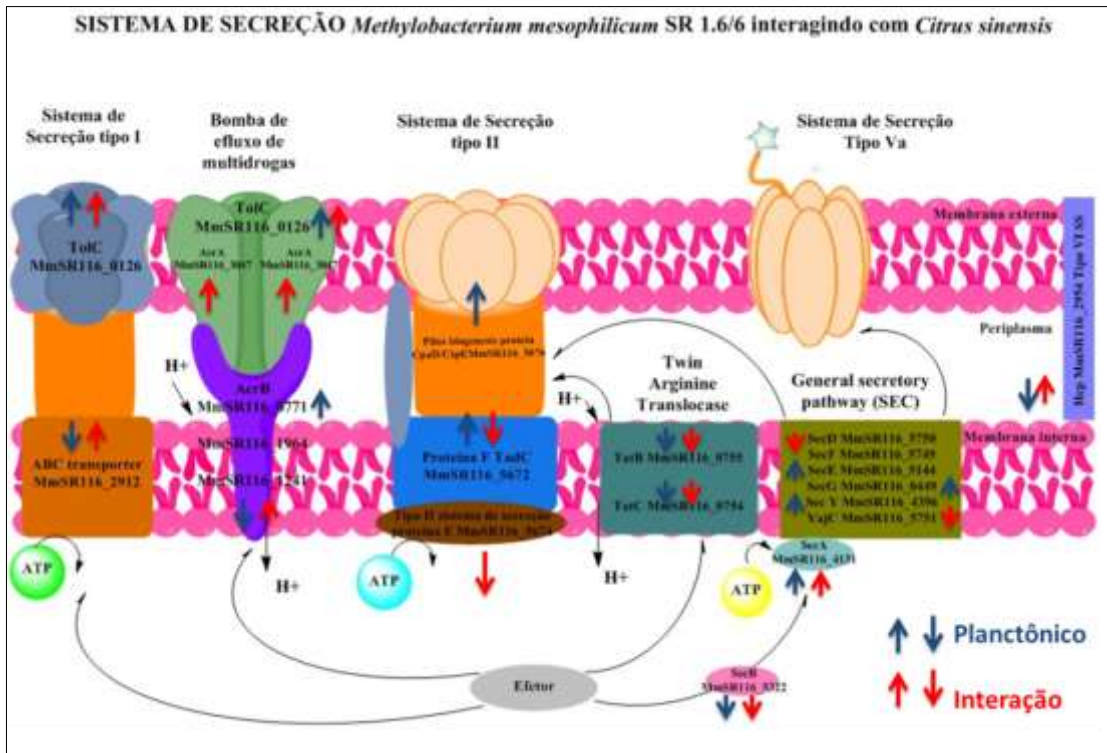
Figura 32 - Expressão gênica dos genes envolvidos na bomba de efluxo de resistência a multidrogas e um transportador do tipo ABC em Citros



Expressão gênica dos genes envolvidos na Bomba de efluxo de resistência a multidrogas e um transportador do tipo ABC em Citros, comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3+Metanol. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador zwf6 as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

Com tudo foi encontrado de forma geral que as bombas de efluxo e o T1SS encontram-se ativados durante a interação, o T2SS apresenta os genes reprimidos com exceção da proteína CpaD formadora do pilus (MmSR116_5676) que está induzida na interação, o sistema TAT é reprimido nos tratamentos e os transportadores do sistema SEC estão induzidos durante o tratamento planctônico (figura 33).

Figura 33. Análises da expressão gênica dos sistemas de secreção avaliados por PRC em tempo real para *Citrus sinensis* em interação com *M. mesophilicum* SR1.6/6

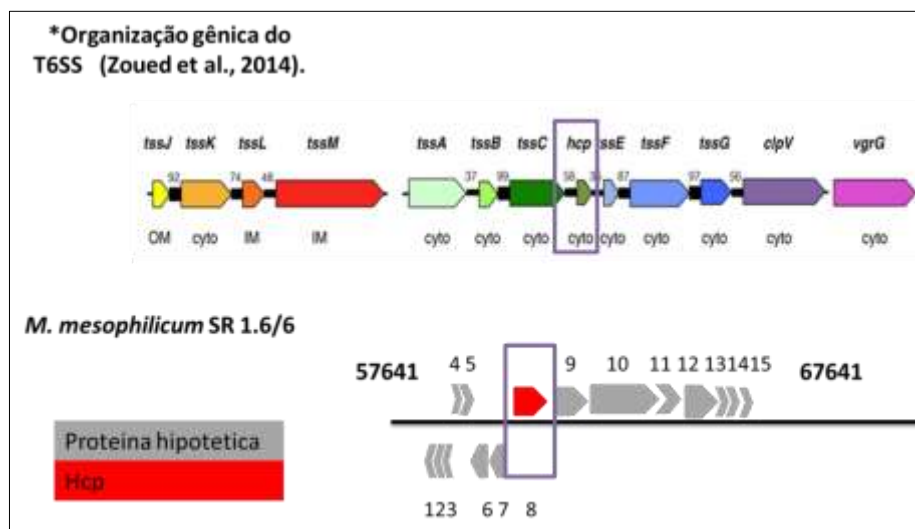


As setas indicam a direção dos níveis de expressão (Super-expresso para acima e reprimido para abaixo) para os tratamentos planctônico (azul) e interação (vermelho) avaliados por PCR em tempo real em *Citrus sinensis*+SR1.6/6.

5.4.3 Análise da expressão gênica de Hcp proteína do sistema de secreção tipo VI

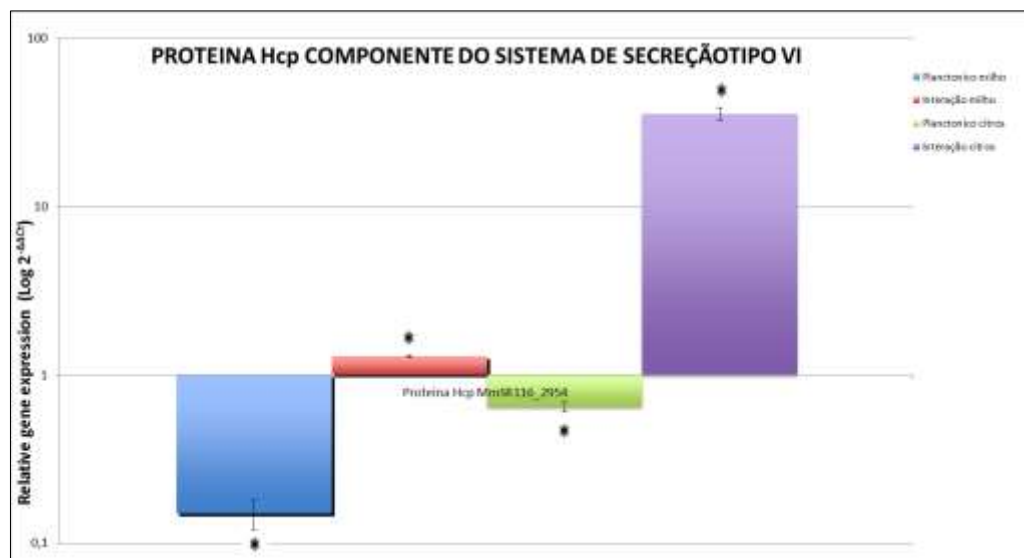
O gene que codifica a proteína de membrana Hcp (MmSR116_2954) associada ao T6SS foi anotada no genoma da *M. mesophilicum* SR1.6/6, mas os outros genes que compõem este sistema não foram encontrados (Figura 33), sugerindo que o sistema não pode ser montado, e, portanto, não é ativo nessa bactéria. Entretanto, a expressão deste gene foi avaliada na presença de raízes de plântulas de milho e citros. Foi observado que, em comparação com o controle (ausência da planta hospedeira), este gene foi reprimido no tratamento planctônico e induzido no tratamento interação (superfície e interior das raízes da planta hospedeira) (Figura 34), sugerindo que pode apresentar outra função nesta bactéria endofítica.

Figura 33. Contexto gênico do sistema de secreção do tipo VI e proteína Hcp associada ao sistema de secreção do tipo VI em *M. mesophilicum* SR1.6/6 locus tag MmSR116_2954 comparada com a organização gênica geral do T6SS.



*Representação esquemática geral da organização gênica do T6SS descrita por Zoued et al., 2014. O conjunto mínimo de genes para a montagem do T6SS funcional é mostrado na figura. Estes genes estão divididos segundo sua função. Genes envolvidos na montagem do complexo da membrana (tssJ, tssK, tssL e tssM) e genes envolvidos na formação do complexo da cauda (tssA, tssB, tssC, hcp, tssE, tssF, tssG, clpV e vgrG). Adicionalmente se menciona a localização dos produtos dos genes (cyto, citoplasma; IM, membrana interna; OM, membrana externa).

Figura 34 - Expressão gênica do gene envolvido na codificação da proteína Hcp do Sistema de secreção Tipo VI em Milho e Citros.



Expressão gênica do gene envolvido na codificação da proteína Hcp do Sistema de secreção Tipo VI em Milho e Citros, comparado com o controle SR1.6/6 em meio CHOI3+Metanol. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *zwf* e as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Methylobacterium mesophilicum SR1.6/6 foi isolada endofiticamente de ramos de planta sadia de citros e foi sugerido que esta linhagem pode interagir com o fitopatógeno de citros *Xylella fastidiosa*, agente causal da CVC (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004). A presença de grupos específicos de *Methylobacterium* spp. em tecidos internos de plantas de citros poderiam estar associados ao desenvolvimento ou inibição dos sintomas da CVC (LACAVA et al., 2004, 2006). Posteriormente foi observada que esta linhagem SR1.6/6 é capaz de colonizar diferentes espécies vegetais, entre elas tabaco, vinca, citros e soja (ANDREOTE et al., 2006; ARAUJO et al., 2015, 2009; DOURADO et al., 2013). Esta descrição para esta linhagem corrobora estudos anteriores que demonstram que *Methylobacterium* spp. podem ser isoladas a partir de plantas de cana-de-açúcar, algodão, amendoim, citros, pinheiro, eucalipto, vinca, morango, soja (ABANDA-NKPWATT et al., 2006; ANDA et al., 2011; MADHAIYAN et al., 2006, 2012; PIRTTILÄ et al., 2000; POHJANEN et al., 2014), bem como do solo (CAO et al., 2011).

Acredita-se que a colonização da planta por bactérias endofíticas a partir do solo inicia-se com o reconhecimento dos exsudatos das plantas seja o primeiro passo da interação planta-bactéria (HARDOIM et al., 2008, 2015). Tais exsudatos são compostos principalmente por açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos (LEFEVRE et al., 2013; LI et al., 2013), e são capazes de atrair microrganismos específicos (HARDOIM et al., 2008). Estudos com *Methylobacterium* spp, indicam que os exsudatos podem influenciar o reconhecimento do hospedeiro, a formação de biofilme na raiz bem como a colonização endofítica (ROSSETTO et al., 2011). Sabe-se que a quantidade e composição destes exsudatos pode variar de acordo com a espécie vegetal, estágio de desenvolvimento, pH, temperatura e a presença do micro-organismo (BADRI; VIVANCO, 2009).

Bactérias endofíticas, como *Methylobacterium* spp., penetram na planta por meio de aberturas nas raízes e/ou folhas e são capazes de colonizar tecidos internos do hospedeiro, incluindo vasos condutores (GAN et al., 2012; HARDOIM et al. 2015) e espaços intercelulares (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996). No presente trabalho foi observado que *M. mesophilicum* SR1.6/6 coloniza de forma ativa a superfície das raízes de milho e citros, de forma semelhante ao já observado para plântulas de soja (ARAÚJO et al., 2015). Além disso, foi

observado que os exsudados liberados pelas plantas (milho e citros) induzem um aumento no crescimento desta bactéria (Figura 8). Entretanto, a presença da planta durante o crescimento da bactéria é importante, visto que as culturas bacterianas onde as plantas foram mantidas apresentaram um maior crescimento. Este resultado pode ser devido à liberação constante de exsudados da planta que manteriam o crescimento bacteriano, ou pela liberação de outras moléculas pela planta em resposta à presença da bactéria.

Dessa forma, os exsudados da cultura (planta, planta + SR1.6/6 e SR1.6/6) foram avaliados por GC-MS a fim de identificar os compostos liberados pela planta hospedeira que poderiam estar induzindo um aumento no crescimento desta bactéria endofítica. Em milho foi observado que até 30% dos seus exsudados foi composto por açúcares (Figura 10), sendo frutose o açúcar mais liberado pela planta (15,31%) (Tabela 2). Tendo em vista que na presença da bactéria a quantidade deste açúcar total aumentou significativamente (aproximadamente 68%), a quantidade de frutose diminuiu, é possível sugerir que o maior crescimento de SR1.6/6 na presença da planta é suportado pelo consumo desta frutose. Pelo menos outros 7 tipos de açúcares (D-manitol, D-manose, D-turanose, Dulcitol, L e D-arabitol e Pentitol) foram identificados somente nos exsudados da planta sem a presença da bactéria, sugerindo que poderiam ser utilizados também pela bactéria, ou a sua biossíntese ser inibida pela presença deste endófito. Embora, D-manose também tenha sido identificado nos exsudados da cultura bacteriana (Tabela 2). Estudos feitos mostrando a influência de compostos de carbono (galactose, arabinose, xilose, frutose, sucrose, manose e glicose) dos exsudados de três variedades de arroz (Mahsuri, Mayang Segumpal e MR219) na Malassia, em bactérias endofíticas diazotróficas e associadas á rizosfera mostraram que alguns micro-organismos apresentam fonte de carbono preferencial para seu desenvolvimento. Foi observado que a bactéria *Rhizobium* sp. consome mais açúcares e a sua população é aumentada na rizosfera ao ser comparado com *Corynebacterium* sp. O consumo de açúcares por *Rhizobium* sp. foi de 100% de manose, xilose, arabinose e sucrose nos exsudatos das três variedades de arroz. Por outro lado, *Corynebacterium* sp. apresentou diferenças no consumo de açúcares nas três variedades, visto que consumiu preferencialmente manose, xilose e frutose na variedade Mahsuri, xilose e arabinose na variedade Mayang Segumpal e arabinose e sucrose na variedade MR219 (NAHER et al., 2009). Segundo os autores, a identificação de fontes de carbono preferenciais (açúcares) pelas bactérias endofíticas pode aumentar a colonização das raízes em plantas hospedeiras e posteriormente facilitar a fixação de nitrogênio

em algumas espécies vegetais (NAHER et al., 2008). Outros compostos, entre eles aminoácidos (Ác. Aspártico, Prolina e Valina), ácido hexadecanóico (ácido graxo), ácidos orgânicos e compostos orgânicos foram encontrados identificados apenas na planta sem a bactéria, enquanto a ácido n-Pentadecanóico (ácido graxo) e o ácido 2-furanoacético foram encontrados apenas na interação (planta + bactéria). Estes resultados mostram que a síntese destes compostos poderia estar sendo regulada durante a interação, ocorrendo a inibição (ou consumo pela bactéria) ou indução. Estudos posteriores devem ser conduzidos para melhor entender o papel destes exsudados no estabelecimento da interação entre *M. mesophilicum* SR1.6/6 com plântulas de milho.

Em citros, o exsudado da planta sem a bactéria foi constituído por compostos orgânicos ($\cong 33\%$), nitrogenados ($\cong 18\%$) e açúcares ($\cong 9\%$) (Tabela 1). Na presença da bactéria, da mesma forma ao observado para plântulas de milho, foi observado um aumento na quantidade de açúcares de $\cong 9\%$ para $\cong 22\%$, ou seja, ou aumento de 2,5X. Entre estes açúcares, D-manose não foi observado na interação, enquanto D-frutose, Maltose e Arabinose foram observados apenas na interação (citros + SR1.6/6). Glicerol foi a molécula em maior abundância (31,7%) nos exsudados da planta, tendo esta abundância sido reduzida para 6,33% na presença de *M. mesophilicum* SR1.6/6, sugerindo que este composto foi consumido por esta bactéria. Foi encontrado que a bactéria metilotrófica isolada de musgo, *Methylobacterium funariae* sp. nov é capaz de utilizar glicerol como fonte de carbono, porém é incapaz de usar açúcares como xilose para seu desenvolvimento (SCHAUER; KUTSCHERA, 2011), adicionalmente em outro estudo foi observado que alguns linhagens de *Pseudomonas fluorescens* utilizam o glicerol exsudado pelas plantas de tomate ao incrementar a atividade nematicida contra o fitopatógeno *Meloidogyne javanica*, conhecido como nematoide das galhas caso contrário na presença de glicose o qual reprime essa atividade (SIDDIQUI; SHAUKAT, 2002), destacando assim o glicerol como uma importante fonte de carbono no desenvolvimento de bactérias endofíticas. Também foi observado que uréia foi uma importante molécula identificada nos exsudados da planta hospedeira, a qual não foi identificada nos exsudados da interação (citros + SR1.6/6). Foi demonstrado que bactérias metilotróficas isoladas de lamas de depuração são capazes de hidrolisar uréia e utilizar este composto como fonte de nitrogênio para seu metabolismo, além de apresentarem a enzima uréase que transforma a uréia em amônia, sendo importante esta conversão para influenciar a atividade

nematicida e poder empregar a amônia como fertilizante (DURSKA, 2007; SIDDIQUI; IQBAL, .; MAHMOOD, 2001).

Os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 e a planta hospedeira ainda não foram elucidados, principalmente aqueles envolvidos nos estágios iniciais da colonização e no reconhecimento dos exsudatos da planta hospedeira. Sendo assim, no presente trabalho, a expressão de genes envolvidos no transporte de moléculas foram avaliados durante o crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 na presença dos exsudatos da planta e na planta hospedeira. Bactérias desenvolveram sistemas de secreção com a finalidade de traslocar moléculas através do envoltório celular. Estes sistemas são complexos multiproteicos que formam uma maquinaria que permite regular as trocas com o meio extracelular (CHANG et al., 2014; DURAND et al., 2009; TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). Porém essas proteínas associadas a estes sistemas podem também estar envolvidas na modulação das interações bacterianas no ambiente (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). Os sistemas de secreção podem ser classificados em seis tipos diferentes (I, II, III, IV, V e VI), dependendo da forma como é realizada a translocação dos fatores de invasão para a célula hospedeira (CHANG et al., 2014). Em bactérias não patogênicas, como *M. mesophilicum* SR1.6/6, o sistema de secreção pode estar envolvido com o reconhecimento bactéria-planta, visto que vários sistemas de secreção incluem uma maquinaria para transportar proteínas através da membrana plasmática do hospedeiro e, desta maneira, induzir mudanças fisiológicas no hospedeiro que promovem a colonização (PEDROSA et al., 2011; TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). Entre estas proteínas secretadas, inclui os efetores e toxinas.

M. mesophilicum SR1.6/6 foi reanotado manualmente com a finalidade de identificar genes envolvidos com o transporte de moléculas associadas à interação dessa bactéria endofítica com a planta hospedeira. Foram identificados 3 sistemas de secreção (T1SS, T2SS e T5aSS), bem como sistemas de translocação de proteínas do citosol para o espaço periplasmático (Sistema SEC e TAT) e bombas de efluxo multidrogas, as quais estão envolvidas com a detoxificação de moléculas provenientes da célula hospedeira e que podem estar associadas aos mecanismos de interação planta-bactéria (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTINEZ, 2013).

Não foram encontrados no genoma da *M. mesophilicum* SR1.6/6 proteínas associadas ao T3SS o qual está presente em bactérias fitopatogênicas e mutualísticas e são importantes na translocação de efetores para a célula hospedeira (OCHMAN et al., 1996; TSENG; TYLER;

SETUBAL, 2009). O T3SS possui uma estrutura chamada injectossomo que libera fatores de virulência diretamente na célula hospedeira, modulando o metabolismo e os mecanismos de defesa da célula (GRANT et al., 2006; MOTA; CORNELIS, 2005). Este resultado mostra que a interação de *M. mesophilicum* SR1.6/6 não é modulada por efetores do tipo 3, sendo possivelmente associada a outros efetores.

O T4SS foi descrito em *Agrobacterium tumefaciens* (CRISTIE; CASCALES, 2005) e *Mesorhizobium loti* (HUBBER; SULLIVAN; RONSON, 2006) e pode transportar ácidos nucléicos ou proteínas para as células hospedeiras (CRISTIE; CASCALES, 2005). O T6SS também transloca proteínas efetoras diretamente no citoplasma da célula hospedeira (FILLOUX et al., 2008; SHRIVASTAVA; MANDE, 2008) podendo modular a resposta do hospedeiro à presença da bactéria. Por meio da anotação manual, foi observado que *M. mesophilicum* SR1.6/6 não apresenta os T4SS e T6SS, embora um ortólogo do gene *Hcp* (Hemolysin coregulated protein), o qual codifica para uma proteína que faz parte da estrutura que transfere o efector para o interior da célula hospedeira. A análise da expressão deste gene *Hcp* mostrou que foi reprimido nas células planctônicas na presença dos exsudados da planta, mas foi induzido quando *M. mesophilicum* SR1.6/6 estava em contato (superfície ou interior) da planta hospedeira. Em *Mesorhizobium loti* e *Rhizobium leguminosarum* o T6SS é requerido para a colonização eficiente da raiz e pode contribuir na formação do biofilme (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

O T1SS é formado por uma proteína de fusão de membrana HlyD e um transportador do tipo ABC ou também conhecida como proteína HlyB, as quais são codificadas por genes em um cluster. Além destas, a proteína de membrana externa TolC também está envolvida na montagem deste sistema de secreção. Em *E. coli* este sistema de transporte é formado pelo complexo TolC-HlyD-HlyB. TolC é uma proteína estrutural da membrana externa, enquanto HlyD é uma proteína de fusão de membrana e HlyB (transportador do tipo ABC) ocupam o espaço periplasmático e a membrana interna, sendo a toxina HlyA, a qual é secretada como uma proteína desdoblada, o substrato para este modelo (DELEPELAIRE, 2004; HOLLAND et al., 2005). Este sistema foi anotado no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 e a análise da expressão mostrou que tanto para citros como para milho este sistema de transporte foi reprimido no tratamento planctônico e induzido no tratamento interação, sugerindo que possa ser requerido para a colonização da planta hospedeira. Este sistema permite a secreção de proteínas de diferentes tamanhos e funções desde o citoplasma até o meio extracelular sem intermediários periplasmáticos e por uma via direta

(CHANG et al., 2014; DELEPELAIRE, 2004; TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). Adicionalmente, o sistema de secreção do tipo I encontra-se relacionado com a interação entre planta e micro-organismos (fitopatógenos, mutualistas e endófitos (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). No patógeno do arroz *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* a expressão da molécula efetora AvrXa21 requer o T1SS que consta de três proteínas RaxA, RaxB e RaxC, onde RaxB funciona como um transportador do tipo ABC, equivalente à HlyB em *E. coli*, que é secretada e detectada pela planta hospedeira (DA SILVA et al., 2004). Fatores de virulência tais como metalloproteases, adesinas e glucanases são secretadas pelo T1SS em patógenos como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa* (DELEPELAIRE, 2004; REDDY et al., 2007). Em *Sinorhizobium meliloti*, a proteína TolC pode afetar a simbiose, da mesma forma que proteínas secretadas por este sistema são também encontradas na interação de *Mesorhizobium loti* e *Bradyrhizobium japonicum* com a planta hospedeira (COSME et al., 2008; DELEPELAIRE, 2004).

No caso de micro-organismos endofíticos e mutualistas, algumas proteínas são secretadas pelo T1SS e estão envolvidas na formação de biofilme (RUSSO et al., 2006), pois o T1SS pode secretar exopolissacarídeos e proteínas que formam o biofilme. Estudos anteriores têm descrito que a formação de biofilme por *M. mesophilicum* SR1.6/6 precede a colonização endofítica (ANDREOTE et al., 2006; ROSSETTO et al., 2011).

Sistemas de secreção sec-dependentes (General Secretory Pathway) constituem a maior via de integração de proteínas para a membrana interna ou exportação para o espaço periplasmático, membrana externa ou mesmo para o meio externo, sendo necessário para isso intermediários periplasmáticos para a translocação destas proteínas. Neste caso, estes intermediários podem ser os sistemas TAT (*Twin Arginine Translocase*) ou SEC que transferem proteínas para o espaço periplasmático e em seguida podem ser secretadas pelo T2SS ou T5SS (CHANG et al., 2014; TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). O complexo SEC é formado por proteínas transmembranas SecY, SecE e SecG (complexo SecYEG) que juntas formam um canal por onde proteínas são translocadas ou integradas às membranas, uma proteína SecA que funciona como uma ATPase associada, que fornece energia ao sistema e controla a exportação da proteína não dobrada até o canal SecYEG. Além de proteínas auxiliares SecD, SecF e YajC que são recrutadas por YidC e uma chaperona SecB que apresenta as pre-proteínas não dobradas a

SecA (COLLINSON et al., 2001; COOPER et al., 2008; QINHONG et al., 2003). Os principais substratos do sistema TAT bacteriano são proteínas redox envolvidas na respiração anaeróbica, proteínas requeridas para biogênese e remodelamento do envoltório celular e proteínas de virulência (LEE et al., 2006; PALMER et al., 2010). Os componentes da via de secreção TAT reconhece um motivo rico em resíduos de aminoácidos básicos (S-R-R-x-F-L-K) na região N-terminal de um cofator que contém as proteínas que são traslocadas ao periplasma usando gradiente de prótons como fonte de energia (MULLER, 2005).

Os sistemas de secreção tipo 2 e 5a, juntamente com os sistemas TAT e SEC foram anotados no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6. Estes sistemas de secreção são dependentes da maquinaria SEC e/ou TAT para translocação de proteínas até o periplasma da célula bacteriana. A linhagem **SR1.6/6** de *M. mesophilicum* apresenta esses dois sistemas de secreção no seu genoma agrupados em um cluster que codifica nove proteínas. Este T2SS é composto por um núcleo de aproximadamente 12 proteínas codificadas em um operon, algumas das quais não estão presentes em todos os T2SS, sendo indispensáveis aquelas proteínas que o microrganismo considerar necessárias para a montagem deste sistema (FILLOUX et al., 1998; PUGSLEY et al., 1997; SANDKVIST, 2001). O T2SS é encontrado em bactérias do filo Proteobacteria, incluindo espécies de vida livre como simbioses obrigatórias, podendo ser mutualistas, comensais ou patogênicas, promovendo funções específicas na interação das espécies com seu meio ambiente (CIANCIOTTO, 2005; FILLOUX, 2005). No presente trabalho, a análise de expressão mostrou que o sistema TAT foi reprimido tanto no tratamento planctônico como na interação, quando comparado com o controle, tanto em milho como em citros, sugerindo não ser requerido para esta interação. Para o sistema SEC, 4 genes (*secAEGY*) foram induzidos no tratamento planctônico, mas somente *secAG* foram induzidos no tratamento interação em citros. Em milho, foi observado que somente houve indução de *secEF* e *yajC* no tratamento interação. Entretanto, foi observado que T2SS foi induzido apenas no tratamento planctônico para citros, embora o gene que codifica a proteína F (TadC) tenha sido induzida também no tratamento planctônico e na interação em milho. Esta proteína F é localizada na membrana interna e interage com as outras proteínas da membrana interna e emprega a maquinaria SEC para recrutar as moléculas que serão traslocadas com a participação da ATPase, as pseudopilinas e a secretina (proteína de membrana externa) (KOROTKOV et al., 2012; TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

Alguns compostos produzidos pelas plantas têm efeito antibacteriano, inibindo assim a colonização da planta por bactérias. Dessa forma, para que ocorra a colonização da planta, a bactéria precisa utilizar estratégia de detoxificação. Para isso, as bombas de efluxo estão envolvidas na proteção contra estes compostos exsudados pela planta (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTINEZ, 2013), e são requeridas pela bactéria desde os estágios iniciais da colonização (ESPINOSA-URGEL et al., 2000) e para sobreviver nos tecidos do hospedeiro (BARABOTE et al., 2003). Estudos têm demonstrado que as bombas de efluxo são importantes nas interações planta-micro-organismo, não somente em fitopatógenos, mas também para outros micro-organismos associados. As bombas de efluxo SmeAB em *Sinorhizobium meliloti* tem um importante papel na competitividade da nodulação (EDA et al., 2011). O efeito das bombas de efluxo nas interações planta-bactéria podem ser hospedeiro-específicas (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTINEZ, 2013), visto que a bomba de efluxo BdeAB de *Bradyrhizobium japonicum* é necessária para a fixação de nitrogênio durante a simbiose com soja, mas não é necessária em outras plantas hospedeiras, tais com feijão mungo e feijão-caupi (LINDEMANN et al., 2010). Em *M. mesophilicum* SR1.6/6 foram observados genes que codificam proteínas relacionadas com as bombas de efluxo multidrogas da família RND (*Resistance nodulation cell division*). Foi observado que os genes *acrAB* foram induzidos principalmente na presença de citros, sugerindo que também para *M. mesophilicum* SR1.6/6 pode haver especificidade na expressão desta família de genes.

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que a presença da planta hospedeira (milho e citros) estimula o crescimento da bactéria endofítica *M. mesophilicum* SR1.6/6, a qual responde ativando genes específicos de transporte de moléculas. Estes transportadores podem estar associados à obtenção de nutrientes, detoxificação da célula, reconhecimento do hospedeiro ou modulação da interação por meio da liberação de efetores. Estudos posteriores com mutagênese sítio dirigida poderá elucidar melhor o papel destes genes na interação entre esta bactéria e a planta hospedeira.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- Em cultura *in vitro*, plântulas de milho e citros, por meio do seu sistema radicular, secretam açúcares, aminoácidos, lipídios e outros compostos orgânicos que poderiam ser utilizados por micro-organismos presentes na rizosfera;

- Os exsudados liberados pelas raízes de citros e milho, independentes da presença da plântula, induzem um aumento no crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 em condições de laboratório;

- A cultura bacteriana na presença das plântulas de milho e soja alcançam uma maior densidade celular, quando comparado à cultura apenas com os exsudados sem as plântulas;

- *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresenta os sistemas de secreção do tipo I, II e Va, além da maquinaria de translocação via SEC ou TAT e bombas de efluxo multidrogas para o transporte, translocação e exportação de moléculas efetoras

- A análise da expressão de genes que codificam proteínas de transporte demonstrou que ocorre regulação diferenciada (indução ou repressão) destes genes durante a interação com a planta;

- Durante a interação física (superfície ou interior dos tecidos vegetal) da bactéria com a planta, ocorre preferencialmente uma indução destes genes de transporte;

- Os resultados indicam que os sistemas de transporte são importantes para o estabelecimento da interação entre *M. mesophilicum* SR1.6/6 e a planta hospedeira.

REFERÊNCIAS*

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

AENDEKERK, S.; DIGGLE, S. P.; SONG, Z.; HOIBY N.; CORNELIS, P.; WILLIAMS, P. C.; AMARA, M. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to cell communication. **Microbiology**, v. 15, p. 1113–1125, 2005.

AENDEKERK, S.; GHYSELS, B.; CORNELIS, P.; BAYSSE, C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microbiology**, v. 148, p. 2371–2381, 2002.

ALVAREZ-ORTEGA, C.; OLIVARES, J.; MARTINEZ, J. L. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-11, 2013.

ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 1139–1148, 1999.

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**, v. 57, p. 82-93, 2009.

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

ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. S.; DINI-ANDREOTE, F.; SALGUEIRO-LONDOÑO, J. K.; CAMARGO-NEVES, A. A.; ANDREOTE F. D.; DOURADO M. N. Genes related to antioxidant metabolism are involved in *Methylobacterium mesophilicum*-soybean interaction. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, p. 951-963, 2015.

ARAÚJO, W. L. W.; MACCHERONI J. R.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229–236, 2001.

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

ARNOLD, R.; JEHL, A.; RATTEI, T. Targeting effectors: the molecular recognition of type III secreted proteins. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 346–358, 2010.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BADRI D, V.; LOYOLA-VARGAS, V.M.; BROECKLING, C. D.; DE-LA-PEÑA, C.; JASINSKI, M.; SANTELIA D.; MARTINOIA, E.; SUMNER, L.W.; BANTA, L.M.; STERMITZ, F.; VIVANCO, J. M. Altered Profile of Secondary Metabolites in the Root Exudates of Arabidopsis ATP-Binding Cassette Transporter Mutants. **Plant Physiology**, v. 146, p. 762–771, 2008.

BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, p. 666–681, 2009.

BAIS, H. P. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 57, p. 233–266, 2006.

BAIS, H. P.; PRITHIVIRAJ, B.; JHA, A.K.; AUSUBEL FM.; VIVANCO JM. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. **Nature**, v. 434, p. 217–221, 2005

BAREA, J. M. Microbial cooperation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.

BARNARD, A. M. L.; BOWDOWN, S. D.; BURR, T.; COULTHURST, S. J.; MONSON, R. E.; SALMOND, G. P.C. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 362, p. 1165-1183, 2006.

BASLER, M.; MEKALANOS, J. J. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. **Science**, v. 337, p. 815, 2012.

BASLER, M.; PILHOFER, M.; HENDERSON, G. P., JENSEN, G. J.; MEKALANOS, J. J. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. **Nature**, v. 483, p. 182–186, 2012.

BECK, D.; VASISHT, N.; BAGLIERI, J.; MONTEFERRANTE, C. G.; VAN-DIJL J. M.; ROBINSON, C.; SMITH, C. J. Ultrastructural characterisation of Bacillus subtilis TatA complexes suggests they are too small to form homooligomeric translocation pores. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 8, p. 1811–1819, 2013.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 11-18, 2009.

BHATTY, M.; LAVERDE GOMEZ, J. A.; CHRISTIE, P. J. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. **Research in Microbiology**, v. 164, p. 620–639, 2013.

BINGLE, L. E.; BAILEY, C. M.; PALLAN, M. J. Type VI secretion: a beginner's guide. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 3-8, 2008.

BLAIR, J. M.; PIDDOCK, L. J. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 512–519, 2009.

BLOCKER, A. J.; DEANE, J. E.; VEENENDA, AL, A. K.; ROVERSI, P.; HODGKINSON, J. L.; JOHNSON, S.; LEA, S. M. What's the point of the type III secretion system needle? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 6507-6513, 2008.

BROECKLING, C. D.; REDDY, I. R.; DURAN, A. L.; ZHAO, X.; SUMNER, L.W. MET-IDEA: Data Extraction Tool for Mass Spectrometry-Based Metabolomics. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 78, p. 4334-4341, 2006.

BROWNING, C.; SHNEIDER, M. M.; BOWMAN, V. D.; SCHWARZER, D.; LEIMAN, P. G. Phage pierces the host cell membrane with the iron-loaded spike. **Structure**, v. 20, p. 326-339, 2012.

BURNS, D. L. Type IV transporters of pathogenic bacteria. **Currents Opinion Microbiology**, v. 6, p. 29-34, 2003.

BURSE, A.; WEINGART, H.; ULLRICH, M. S. The phytoalexin inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 43-54, 2004.

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

CANBOLAT, M. Y.; BILEN, S.; CAKMAKCI, R.; AHIN, F.; AYDIN, A. Effect of plant growth promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 350-357, 2006.

CAO, T. B.; SAIER, M. H. The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1609, p. 115-125, 2003.

CHANG, J. H.; ALLISON, D. D.; CREASON, L. The ABCs and 123s of Bacterial Secretion Systems in Plant Pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 521, p. 317-346, 2014.

CHARKOWSKI, A. O.; HUANG H. C.; COLLMER A. Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hrp mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 3866-3874, 1997.

CHARKOWSKI, A.; BLANCO, C.; CONDEMINE, G.; EXPERT, D.; FRANZA T. The role of secretion systems and small molecules in soft-rot Enterobacteriaceae pathogenicity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 425-449, 2012.

CHRISTIE, P. J.; CASCALES, E. Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). **Molecular Membrane Biology**, v. 22, p. 51-61, 2005.

CHRISTIE, P. J.; ATMAKURI K. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 451-485, 2005.

CIANCIOTTO, N. P. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 581-588, 2005.

CISNEROS, D. A.; BOND, P. J.; PUGSLEY, A. P.; CAMPOS, M.; FRANCETIC, O. Minor pseudopilin self-assembly primes type II secretion pseudopilus elongation. **EMBO J.**, v. 31, p. 1041-1053, 2012.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 811-825, 2005.

CORNELIS, G. R.; VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of tipe III secretory systems. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 735-774, 2000.

COSME, A. M.; BECKER, A.; SANTOS, M. R.; SHARYPOVA, L. A.; SANTOS, P. M.; MOREIRA, L. M: The outer membrane protein TolC from *Sinorhizobium meliloti* affects protein secretion, polysaccharide biosynthesis, antimicrobial resistance, and symbiosis. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 21, p. 947-957, 2008.

COSTA, R. V. da; SILVA, D. D. da; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, A. da S.; CASELA, C. R. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. **Summa Phytopathologica**, v. 36, p. 122-128, 2010.

DA SILVA, F. G.; SHEN, Y.W.; DARDICK, C.; BURDMAN, S.; YADAV, R. C.; DE LEON, A. L.; RONALD, P. C: Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 17, p. 593-601, 2004.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772, 2012.

DELEPELAIRE, P: Type I secretion in gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 149-161, 2004.

DOURADO M. N.; BOGAS A. C.; POMINI A. M.; ANDREOTE F. D.; QUECINE M. C.; MARSAIOLI A. J.; ARAÚJO W. L. Interaction genes regulated by plant exudate and quorum sensing molecules. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 95-104, 2013.

DOURADO, M. N.; CAMARGO-NEVES, A. A.; SANTOS, D. S; ARAUJO, W. L. Biotechnological and Agronomic Potential of Endophytic Pink-Pigmented Methylophilic *Methylobacterium* spp. **BioMed Research International**, p. 1-19, 2015.

DOURADO, M. N.; SANTOS, D. S.; NUNES, L. R.; COSTA DE OLIVEIRA, R. L.; DE OLIVEIRA, M. V.; ARAÚJO, W. L. Differential gene expression in 9a5c during co-cultivation with the endophytic bacterium SR1.6/6. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p. 1357-1366, 2015.

DURSKA, G. Some properties of methylophilic bacteria isolated from the sewage sludges derived from a mechanical and biological sewage treatment plants. **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, p. 251-255, 2007.

EVANS, K.; PASSADOR, L.; SRIKUMAR, R.; TSANG, E.; NEZEZON, J.; POOLE K. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 5443-5447, 1998.

FAUVART, M.; MICHIELS, J. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, p. 1-9, 2008.

FERNANDEZ, D.; TISSERANT, E.; TALHINAS, P.; AZINHEIRA, H.; VIEIRA, A. SOPHIE PETITOT, A.; LOUREIRO, A.; POULAIN, J.; SILVA, C.; SILVA, M. C.; DUPLESSIS, S. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 17-37, 2012.

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

FILLOUX, A. Secretion signal and protein targeting in bacteria: a biological puzzle. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 3847-3849, 2010.

FILLOUX, A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 163-179, 2004.

FRONZES, R.; SCHAFER, E.; WANG, L.; SAIBIL, H.R.; ORLOVA, E.V.; WAKSMAN, G. Structure of a type IV secretion system core complex. **Science**, v. 323, p. 266-68, 2009.

GAI, C. S.; LACAVAL, 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 *Bucephalagonia xanthophis* for paratransgenic control strategy of Citrus Variegated Chlorosis. **Journal of Microbiology**, v. 47, p. 448-454, 2009.

GALÁN, J. E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, v. 284, p. 1322-1328, 1999.

GAN, H. M.; CHEW, T. H.; HUDSON, A. O.; SAVKA, M. A. Genome sequence of *Methylobacterium* sp. strain GXF4, a xylem-associated bacterium isolated from *Vitis vinifera* L. grapevine. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 5157-5158, 2012.

GARDNER J. M.; KONO, Y.; TATUM, J. H.; SUZUKI, Y. S. Structure of major component of ACRL toxins, host-specific phytotoxic compound produced by *Alternaria citri*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, p. 1235-1238, 1985.

GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. **Journal Theor Biology**, v. 190, p. 63-68, 1998.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, p. 1-10, 2013.

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**, v. 103, p. 13186-13191, 2006.

GRANT, S. R.; FISHER, E. J.; CHANG, J. H.; MOLE, B. M.; DANGL, J. L. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 425-449, 2006.

GRIJPSTRA, J.; ARENAS, J.; RUTTEN, L.; TOMMASSEN, J. Autotransporter secretion: varying on a theme. **Research in Microbiology**, v. 164, p. 562-582, 2013.

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**, v. 16, p. 463-471, 2008.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA-ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 68, p. 692-744, 2004.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 67–113, 1992.

HINSA, S. M.; ESPINOSA-URGEL, M.; RAMOS, J. L.; O'TOOLE, G. A. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein, **Molecular Microbiology**, v. 49, p. 905–918, 2003.

HOLLAND, I. B.; SCHMITT, L.; YOUNG, J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. **Molecular Membrane Biology**, v. 22, p. 29-39, 2005.

HOLLAND, M. A. Occam's razor applied to hormonology: Are cytokinins produced by plants? **Plant Physiology**, v. 115, p. 865-868, 1997.

HUBBER, A. M.; SULLIVAN, J. T.; RONSON, C. W. Symbiosis-induced cascade regulation of the Mesorhizobium loti R7A VirB/D4 type IV secretion system. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 20, p. 255-261, 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M. S.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413–425, 2010.

IEVA, R.; BERNSTEIN, H. D. Interaction of an autotransporter passenger domain with Bama during its translocation across the bacterial outer membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 19120–19125, 2009.

JACOB-DUBUISSON, F.; FERNANDEZ, R.; COUTTE, L. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 235-257, 2004.

JAYASHREE, S.; VADIVUKKARASI, P.; ANAND, K; KATO, Y.; SESHADRI, S. Evaluation of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria for phosphate solubilization. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 543-552, 2011.

KANONENBERG, K.; SCHWARZ, C. K. W.; SCHMITT, L. Type I secretion systems: a story of appendices. **Research in Microbiology**, v. 164, p. 596–604, 2013.

KARUNAKARAN, R.; RAMACHANDRAN, V. K.; SEAMAN, J. C.; EAST, A. K.; MOUHSINE, B.; MAUHLIN, T. H. Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 4002–4014, 2009.

KAZEMI-POUR, N.; CONDEMINE, G.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. **Proteomics**, v. 4, p. 3177–3186, 2004.

KNOWLES, T. J.; SCOTT-TUCKER, A.; OVERDUIN, M.; HENDERSON, I. R. Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 206–214, 2009.

KOHLER, T.; VAN DELDEN, C.; CURTY, L. K.; HAMZEHPUR, M.; PECHERE, J. C. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5213–5222, 2002.

KORONAKIS, V.; SHARFF, A.; KORONAKIS, E.; LUISI, B., HUGHES, C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. **Nature**, v. 405, p. 914–919, 2000.

KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 336–351, 2012.

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

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

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

LEE, H. S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C. W.; CHOI, S. J.; CHUNG, K. Y.; SA, T. M. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylophilic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 2, p. 402–408, 2006.

LEFEVRE, G. H.; R. M. HOZALSKI, R. M.; NOVAK, P. J. Root exudate enhanced contaminant desorption: an abiotic contribution to the rhizosphere effect. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 11545–11553, 2013.

LEIMAN, P. G.; BASLER, M.; RAMAGOPAL, U. A.; BONANNO, J. B.; SAUDER, J. M. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 4154–4159, 2009.

LEO, J. C.; GRIN, I.; LINKE, D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. **Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological**, v. 367, p. 1088–1101, 2012.

LETOFFE, S.; GHIGO J. M.; WANDERSMAN, C. Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter, **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 5372–5377, 1994.

LEYTON, D. L.; ROSSITER, A. E.; HENDERSON, I. R. From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 213–225, 2012.

LI, X. G.; ZHANG, T. L.; WANG, X. X.; HUA, K.; ZHAO, L.; HAN, Z. M. The composition of root exudates from two different resistant peanut cultivars and their effects on the growth of soil-borne pathogen. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 164-173, 2013.

LI, X. Z.; NIKAIIDO, H. Efflux mediated drug resistance in bacteria, an update. **Drugs**, v. 69, p. 1555–1623, 2009.

LLAMA-PALACIOS, A.; LOPEZ-SOLANILLA, E.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. The ybiT gene of *Erwinia chrysanthemi* encodes for a putative ABC transporter and is involved in competitiveness against endophytic bacteria during infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1624-1630, 2002.

LUBELSKI, J.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. **Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 463–476, 2007.

LUGTENBERG, B.; CHIN-A-WOENG, T.; BLOEMBERG, G. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 373–383, 2002.

LYCKLAMA, A.; NIJEHOLT, J. A.; DRIESSEN, A. J. M. The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. **Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological**, v. 1592, p. 1016–1028, 2012.

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**, v. 57, p. 168-176, 2006a.

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

MAGGIORANI VALECILLOS, A.; RODRIGUEZ PALENZUELA, P.; LOPEZ SOLANILLA E. The role of several multidrug resistance systems in *Erwinia chrysanthemi* pathogenesis. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 19, p. 607–613, 2006.

MATOS, E. S. R. Formas de fósforo no solo em sistemas de milho exclusivo e consorciado com feijão sob adubação orgânica e mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 625-632, 2006.

MICHIELS, T.; CORNELIS, G. R. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1677–1685, 1991.

MORI, H.; ITO, K. The Sec protein-translocation pathway. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 494–500, 2001.

MORRISSEY, J. P.; DOW, J. M.; MARK, G. L.; O'GARA, F. Are microbes at the root of a solution to world food production? **EMBO Reports**, v. 5, p. 922–926, 2004.

MOTA, L. J.; CORNELIS, G. R. The bacterial injection kit: type III secretion systems. **Annals of Medicine**, v. 37, p. 234-249, 2005.

NAHER, U. A.; RADZIAH, O.; HALIMI, M. S.; SHAMSUDDIN, Z. H.; RAZI, I. M. Specific growth rate and carbon sugar consumption of diazotrophs isolated from rice rhizosphere. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 1008–1014, 2008.

NEVES, A. A. C. **Análises genômicas de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com ênfase na interação com a planta hospedeira.** 165 p. Dissertação (Doutorado) - Inteadunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

PALMER, T.; BERKS, B. C. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 483–496, 2012.

PAVLOVA, O.; PETERSON, J. H.; IEVA, R.; BERNSTEIN, H. D. Mechanistic link between β barrel assembly and the initiation of autotransporter secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 10, p. 938–947, 2013.

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; AYUB, R. A.; COLAUTO N. B. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, e. 1002064, 2011.

PIDDOCK, L. J. Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 629–636, 2006a.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 382–402, 2006b.

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**, v. 66, p. 3073-3077, 2000.

POHJANEN, J.; KOSKIMÄKI, J. J.; SUTELA, S.; ARDANOV, P.; SUORSA, M.; NIEMI, K.; SARJALA, T.; HÄGGMAN H.; PIRTTILÄ, A. M. Interaction with ectomycorrhizal fungi and endophytic *Methylobacterium* affects nutrient uptake and growth of pine seedlings in vitro. **Tree Physiology**, v. 34, n. 9, p. 993-1005, 2014.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 20–51, 2005.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**, v. 39, p. 162–176, 2007.

POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; YIM, W.; KIM, K.; SA, T. Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescent-marked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 1033-1043, 2008.

PUKATZKI, S.; MA, A.T.; REVEL, A. T.; STURTEVANT, D.; MEKALANOS, J. J. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 15508–15513, 2007.

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

REDDY, J. D.; REDDY, S. L.; HOPKINS, D.L.; GABRIEL, D. W. TolC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 20, p. 403-410, 2007.

RODRIGUEZ, F.; ROUSE, S. L.; TAIT, C. E.; HARMER, J.; DE RISO, A. Structural model for the protein translocating element of the twin-arginine transport system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 1092–1110, 2013.

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**, v. 42, p. 878–883, 2011.

RUHE, Z. C.; LOW, D. A.; HAYES, C. S. Bacterial contact-dependent growth inhibition. **Trends in Microbiology**, v. 5, p. 230–237, 2013.

RUSSMANN, H.; KUBORI, T.; SAUER, J.; GALAN, J. Molecular and functional analysis of the type III secretion signal of the *Salmonella enterica* InvJ protein. **Molecular. Microbiology**, v. 46, p. 769–779, 2002.

RUSSO, D. M.; WILLIAMS, A.; EDWARDS, A.; POSADAS, D. M.; FINNIE, C. M.; DOWNIE, J. A.; ZORREGUIETA, A. Proteins exported via the PrsDPrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4474-4486, 2006.

SAIER, M. H. Jr: Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. **Journal of Membrane Biology**, v. 214, p. 75-90, 2006.

SANCHES-CONTRERAS, M.; BAUER, W. D.; GAO, M.; ROBINSON, J. B.; DOWNIE, A. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 62, p. 1149-1163. 2007.

SCHAUER, S.; KUTSCHERA, U. A novel growth-promoting microbe, *Methylobacterium funaria* sp. nov., isolated from the leaf surface of a common moss. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p. 510-515, 2011.

SCHONER, B. M.; GEISTLICH, P.; ROSTECK, Jr. R. N.; RAO, E.; SENO, P.; REYNOLDS, K.; COX, S.; BURGETT, C.; HERSHBERGER, R.. Sequence similarity between macrolide-resistance determinants and ATP-binding transport proteins. **Gene**, v. 115, p. 93–96, 1992.

SEKIYA, H.; MIMA, T.; MORITA, Y.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, mexHI–opmD, from a

Pseudomonas aeruginosa mutant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 2990–2992, 2003.

SEVERINO, F. J.; CARVALHO, S. J. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Interferências mútuas entre a cultura do milho, espécies forrageiras e plantas daninhas em um sistema de consórcio. I – implicações sobre a cultura do milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 589-596, 2005.

SIDDIQUI I.A.; SHAIKAT S. S. Zinc and glycerol enhance the production of nematicidal compounds in vitro and improve biocontrol of *Meloidogyne javanica* in tomato by fluorescent pseudomonads. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 212-217, 2002.

SIDDIQUI, Z. A.; IQBAL, A.; MAHMOOD, I. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 16, p. 179-185, 2001.

SILVA, L. J. Laercio, duncan test, tukey test and scott-knott test. R package version 1.0-0, 008. 5 p, 2008.

SILVERMAN, J. M.; BRUNET, Y.R.; CASCALES, E.; MOUGOUS, J. D. Structure and regulation of the type VI secretion system. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, p. 453–472, 2012.

SKOVVAN, E.; PALMER, A. D.; ROUNTREE, A. M.; GOOD, N. M.; LIDSTROM, M. E. XoxF is required for expression of Methanol Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 6032–6038, 2011.

SORY, M. ; BOLAND, A.; LAMBERMOUNT, I.; CORNELIS, G. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 11998–2002, 1995.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P. et al. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 214-220, 2001.

SY, A.; TIMMERS, A. T. J.; KNIEF, C.; VORHOLT, J.A. Methylo-trophic Metabolism is Advantageous for *Methylobacterium extorquens* during Colonization of *Medicago truncatula* under Competitive Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7245-7252, 2005.

TAVARÉ, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences. **American Mathematical Society**, v. 17, p. 57-86, 1986.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Currents Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 420-430, 2000.

TOTH, I. K.; BELL, K. S.; HOLEVA, M. C.; BIRCH, P. R. J. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 17–30, 2003.

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

TSENG, T. T.; TYLER, B. M.; SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1-9, 2009.

VAN DEN BERG, B. Crystal structure of a full-length autotransporter. **Journal of Molecular Biology**, v. 396, p. 627–633, 2010.

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**, v. 149, p. 601–609, 2003.

VILA, J.; MARTINEZ, J. L. Clinical impact of the overexpression of efflux pump in nonfermentative gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. **Current Drug Targets**, v. 9, p. 797–807, 2008.

VOULHOUX, R.; BALL, G.; IZE, B.; VASIL, M. L.; LAZDUNSKI, A. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. **EMBO Journal**, v. 20, p. 6735–6741, 2001.

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

WALLDEN, K.; WILLIAMS, R.; YAN, J.; LIAN, P. W.; WANG L. Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 11348–11353, 2012.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 9–11, 2003.

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

WU, H. Y.; CHUNG, P. C.; SHIH, H. W.; WEN, S. R; LAI, E. M: Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 2841-2850, 2008.

WU, C. P.; HSIEH, C. H.; WU, Y. S. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. **Molecular Pharmacology**, v. 8, p. 1996–2011, 2011.

ZECHNER, E.L.; LANG, S.; SCHILDBACH, J. F. Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 367, p. 1073–1087, 2012.

ZHU, H.; SUN, S. J. Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by *Tremella fuciformis* extract. **Current Microbiology**, v. 57, p. 418–422, 2008.

ZOUED, A.; BRUNET, Y. R.; DURAND, E.; ASCHTGEN, M. S.; LOGGER, L.; DOUZI, B.; JOURNET, L.; CAMBILLAU, C.; CASCALES, E. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, p. 1664–1673, 2014.

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

APÊNDICE – Informações adicionais

Tabela 1A. Sequências de primers empregadas para Análises da expressão gênica envolvida nos diferentes tipos de sistema de secreção para *Methylobacterium mesophilicum* SR 1.6/6.

Numero	Nome do Primer	Anotação no genoma da <i>M. mesophilicum</i> SR 1.6/6	Locus tag	Sequência 5'- 3'	Tamanho do fragmento
1	Mm_5674T2SSF	Sec-dependente: Tipo II – T2SS	MmSR116_5674	TTCATCAGCTGCTGGTTGTC	221
	Mm_5674T2SSR			ATCATCGGGCTCAAGAACAT	
2	Mm_5672T2SSF	Sec-dependente: Tipo II – T2SS	MmSR116_5672	ACGAGGTTCTCGTAGGCTTG	237
	Mm_5672T2SSR			GGAGCTGTTCTCGTCAATG	
3	Mm_5676Tpo IVF	Tipo IV – (pill) Pilus assembly	MmSR116_5676	TACTGGCCGACCTGAGACTT	235
	Mm_5676Tpo IVR			CGAGCTTCCAAGTCGATTACA	
4	Mm_4396SecYF	Tipo V – complexo SecYEG; SecY	MmSR116_4396	GCACACGAAGGTCAGGTACA	188
	Mm_4396SecYR			CGCTGATCATCTTCTCACG	
5	Mm_5144SecEF	Tipo V – complexo SecYEG; SecE	MmSR116_5144	ACGACCATCACGAAGACCAT	215
	Mm_5144SecER			AACGAAGCGACCAAGAAGGT	
6	Mm_0449SecGF	Tipo V – complexo SecYEG SecG	MmSR116_0449	TCGTCGTCCACCTCATCATC	187
	Mm_0449SecGR			AGACTGGTGCGAAGAACAG	
7	Mm_4131SecAF	Tipo V- SecA	MmSR116_4131	ACGTTGTGTGCGTCGTAGAG	247
	Mm_4131SecAR			ACGAGGTCGATTCAATCCTG	
8	Mm_5750SecDF	Proteínas auxiliares SecD	MmSR116_5750	GCTCGTAGATCAGCACGTTG	180
	Mm_5750SecDR			CCTTCATGTTGCCACCTAC	
9	Mm_5749SecFF	Tipo V- SecF	MmSR116_5749	GAGCATCAGGCCAGATAGA	207
	Mm_5749SecFR			GACCTGCTCAACCTGTGCGAT	
10	Mm_5751YajCF	Tipo V- YajC	MmSR116_5751	GCGATCTCCACCTCGATCT	183
	Mm_5751YajCR			GTTGCTCCTGATCTTCGTGA	
11	Mm_5322SecBF	Tipo V- Chaperona SecB	MmSR116_5322	GTCCAGAACGATGTGCTGTT	212
	Mm_5322SecBR			CGGTAGAGGCTGACGAAGTC	
12	Mm_2912TransporABCF	Sec-independente: Tipo I- ABC transporter	MmSR116_2912	GAGGAGCTGTCTTCACGTT	202
	Mm_2912TransporABCR			GGTCCCAGTGCTCGTAATTG	
13	Mm_0126TolCF	Tipo I-TolC	MmSR116_0126	GTTGCTGAGCACGTTTATGT	192
	Mm_0126TolCR			ACGATCCGGACGACCTATCT	
14	Mm_5301T6SSF	Tipo VI – T6SS ClpV	MmSR116_5301	GAGTCGGTGAGGAGCTGG	164
	Mm_5301T6SSR			CCGCGCCTTCCGACATC	

15	Mm_2954T6SSF Mm_2954T6SSR	Tipo VI – T6SS Hcp	MmSR116_2954	GAACGACAAGGCGATCGATG ACGACGATCTCCAGCTCATC	225
16	Mm_0755TatBF Mm_0755TatBR	Tipo I-Sistema de transporte TatB	MmSR116_0755	CCTCCTGTTCGGCCTTCA TCGACCTTCAATCCC GTTCA	157
17	Mm_0754TatCF Mm_0754TatCR	Tipo I-TatC	MmSR116_0754	ACTTGATCAACAGCGGCATC CAACATCAAGCTCAGCGTCT	197
18	Mm_3047AcrAF Mm_3047AcrAR	AcrA	MmSR116_3047	ATCAAGCAGGGCATCGACT CCCACGGTGATCTTCTGGAA	221
19	MmSR116_0771AcrBF MmSR116_0771AcrBR	AcrB	MmSR116_0771	GAACTCCTCGATCTGGCTCA CTGATGATGCAGCTCCAGAG	195
20	Mm_1241AcrBF Mm_1241AcrBR	AcrB	MmSR116_1241	GGTCTTCTCCGGCATGATCG TCAATGACTATGCGCGACAG	178
21	Mm_1610AcrBF Mm_1610AcrBR	AcrB	MmSR116_1610	GAAGTCTTCTCGACCTTGC TGACCTTCACGCCCTATCTC	209
22	Mm_1964AcrBF Mm_1964AcrBR	AcrB	MmSR116_1964	GGTGATGGTCGAGAGGATGT CTCGTCCTGATGATCCTGGG	201
23	Mm_2358AcrBF Mm_2358AcrBR	AcrB	MmSR116_2358	GCTCTCCATGCTCTCGATCT CATTCCGATCCTCCTGTCTCGA	226
24	Mm_3113AcrBF Mm_3113AcrBR	AcrB	MmSR116_3113	CTGACCTCCTACCTGCTGTC CATAGCTCCTGTGAAACCGC	226
25	Endógeno: ZwfF Endógeno: ZwfR	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	MmSR116_3203	AGCAGCTGGAACATGTGGTT CGACGAGAGCCAGTTCTACC	231

Tabela 2A. Genes segundo o tipo de sistema de secreção que amplificaram ao serem avaliados por PCR em tempo real para plantas de milho (*Zea mays*), em interação com *M. mesophilicum* SR1.6/6 nos diferentes tratamentos.

Twin Arginine (TAT)	Sistema SEC	T1SS	T2SS	TIPO VI	MDR
TatB	SecE	Transportador	T2SS Proteína E	Hcp	AcrB
MmSR116_0755	MmSR116_5144	ABC MmSR116_2912	MmSR116_5674	MmSR116_2954	MmSR116_0771
TatC	SecG		T2SS Proteína F		AcrB
MmSR116_0754	MmSR116_0449		TadC		MmSR116_1964
	SecF		MmSR116_5672		
	MmSR116_5749		Pilus assembly		
	SecB		MmSR116_5676		
	MmSR116_5322				
	YajC				
	MmSR116_5751				

Tabela 3A. Genes segundo o tipo de sistema de secreção que amplificaram ao serem avaliados avaliados por PCR em tempo real para plantas de citros (*Citrus sinensis*), em interação com *M. mesophilicum* SR1.6/6 nos diferentes tratamentos.

Twin Arginine (TAT)	Sistema SEC	T1SS	T2SS	T6SS	MDR
TatB	SecE	Transportador	T2SS Proteína E	Hcp	AcrB
MmSR116_0755	MmSR116_5144	ABC MmSR116_2912	MmSR116_5674	MmSR116_2954	MmSR116_0771
TatC	SecG	ToIC	T2SS Proteína F		AcrB
MmSR116_0754	MmSR116_0449	MmSR116_0126	TadC MmSR116_5672		MmSR116_1964
	SecF		Pilus assembly		AcrA
	MmSR116_5749		MmSR116_5676		MmSR116_3047
	YajC				AcrB
	MmSR116_5751				MmSR116_1241
	SecB				
	MmSR116_5322				
	SecD				
	MmSR116_5750				
	SecY				
	MmSR116_4396				
	SecA				
	MmSR116_4131				