

ALINE APARECIDA CAMARGO DAS NEVES

**Análises genômicas de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6
com ênfase na interação com a planta hospedeira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Inteunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2015

ALINE APARECIDA CAMARGO DAS NEVES

**Análises genômicas de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6
com ênfase na interação com a planta hospedeira**

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação
Inteunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia

Área de concentração: Microbiologia e Biologia
Molecular

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível na Biblioteca Digital de
Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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

Neves, Aline Aparecida Camargo.

Análises genômicas de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com ênfase na interação com a planta hospedeira / Aline Aparecida Camargo Neves. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Luiz de Araujo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Ecologia Microbiana.

Versão do título para o inglês: Genomics analyzes of *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 with emphasis on the interaction with the host plant.

1. Microbiologia 2. Efeitos biológicos 3. Genética 4. Interação 5. Organização molecular 6. Técnicas moleculares I. Araujo, Prof. Dr. Wellington Luiz de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB053/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Aparecida Camargo Neves.

Título da Tese: Análises genômicas de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com ênfase na interação com a planta hospedeira.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

À minha família e amigos, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos fomentos que foram cruciais no suporte e motivação para a realização desta pesquisa, CNPq pelo primeiro ano de bolsa, Capes pela bolsa sanduíche e FAPESP pela bolsa de doutorado (2011/14290-5).

Ao meu orientador **Wellington Luiz de Araújo**, pela orientação, apoio e ensinamentos que foram determinantes para a formação de meu perfil científico.

Aos membros da banca examinadora da Qualificação: Prof^a. Dra. Heloiza Barbosa, Dr. Rodrigo Galhardo da Silva e Dr. José Gregório C. Gomez.

Aos meus queridos familiares, **Norma Suely de Camargo Neves** (mãe), **Benedito Aparecido das Neves** (pai), **Andréa Aparecida das Neves de Oliveira** (irmã), pelo apoio, credibilidade e amor incondicional.

À minha avó **Maria Eduarda de Camargo** *in memoriam*, por tudo o que significa em minha vida, por me guiar, amparar e amar...

Aos meus queridos tios e padrinhos **Maria Inês de Camargo Ferreira** e **José Antônio Ferreira** e prima **Nadine Camargo ferreira** por todo carinho que me oferecem.

Ao **Cuíca** pelo amor incondicional, por me fornecer o gás final para a conclusão deste trabalho.

Ao meu marido **Renato de Oliveira Nagy**, pelo apoio e principalmente compreensão para com todos os aspectos de minha vida, principalmente para a execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana da USP: **Almir, Daiene, Eliane, Emy, Jennifer, Leandro, Lina, Luiz Ricardo, Mabel, Manuella, Felipe**, pelos inesquecíveis momentos profissionais e principalmente sociais que me proporcionaram tamanho apoio e alegria.

Às colegas também participantes do projeto *Methylobacterium*, **Manuella, Jennifer** e **Daiene** pelo companherismo amizade e troca de experiências.

Ao amigo **Almir** pelo apoio incondicional que tem me oferecido nesses últimos 4 anos. Incluindo A amiga **Emy** pelas inúmeras terapias deste trio as terça-feiras.

Ao Laboratório de Polimorfismo do DNA pela parceria e valiosos ensinamentos em especial ao Dr. **Artur Silva** e Dr. **Rommel Ramos**, Dr. **Adriana Carneiro** pela oportunidade e aos amigos **Silvanira**, **Diogo** e **Diego** pela amizade e hospitalidade em Belém, PA.

Ao Prof. Dr. **Christopher James Marx** pela oportunidade e ensinamentos no doutorado sanduíche, ao colega Dr. **Joshua Michenner** pelo apoio no laboratório.

Muito Obrigada!

"Quando alguém encontra seu caminho precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada."

Paulo Coelho

RESUMO

NEVES, A. A. C. **Análises genômicas de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com ênfase na interação com a planta hospedeira.** 2015. 121 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Bactérias do gênero *Methylobacterium* são encontradas em associação com espécies vegetais e são capazes de promover o crescimento, aumentar a atividade fotossintética e reduzir a ação de patógenos ao hospedeiro. Além de conferir estas vantagens para a planta hospedeira, estas bactérias podem também produzir biopolímeros (PHA). Desta forma, os objetivos deste trabalho foram anotar o genoma de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 e avaliar o seu transcrito em estágio inicial da interação com *Citrus sinensis*. A análise do genoma mostrou que SR1.6/6 pode produzir hormônios de crescimento vegetal, regular o estresse da planta por meio da enzima ACC-desaminase, apresenta sistema de monitoramento populacional pelo sistema *quorum sensing* (QS) e um metabolismo metilotrófico completo. A análise do transcrito evidenciou que os exsudatos radiculares de *C. sinensis* 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. A interação entre *M. mesophilicum* SR1.6/6 e a planta hospedeira envolve mecanismos de reconhecimento e adaptação ao estresse antes mesmo de ocorrer o primeiro contato físico entre a célula bacteriana e a planta hospedeira, seguido da indução de genes de biofilme bacteriano. Além disso, foi estudada uma metodologia para a obtenção de mutações em *Methylobacterium* spp. que permitirá a obtenção de mutantes relacionados com a interação com a planta.

Palavras chave: Interação bactéria-planta. Endofítico. *Pink-Pigment Facultative Methylophilics* (PPFM). Expressão gênica.

ABSTRACT

NEVES, A. A. C. **Genomic analyzes of *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 with emphasis on the interaction with the host plant.** 2015. 121 f. Ph.D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Methylobacterium genus are found in association with plant species, where they are able to promote plant growth, increase the photosynthetic activity and reduce the incidence of pathogens to the host. In addition to providing these benefits to the host plant, these bacteria can also produce biopolymers (PHA). Thus, the aim was to annotate the genome of *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6 / 6 and assess their transcriptome in the early stages of interaction with *Citrus sinensis*. Genome analysis showed that SR1.6 / 6 can produce auxin, reduce plant stress by presence of ACC-deaminase, presents population monitoring system (QS) and a complete methylotrophic metabolism. The transcriptomic analysis showed that *C. sinensis* exudates induce the expression of genes related to oxidative stress followed by induction of adhesion and biofilm genes during colonization of the host plant. The interaction between *M. mesophilicum* SR1.6 / 6 and the host plant involves recognition mechanisms and adaptation to stress, even before the first physical contact occurs between the bacterial cell and the host plant, followed by the induction of bacterial biofilm genes. Furthermore, a method to generate strains carrying mutations in *Methylobacterium* spp. was developed, allowing the obtaining of mutants related to interaction with the plant.

Keywords: Bacteria-plant interaction. Endophytes. Pink-Pigment Facultative Methylotrophics (PPFM). Genes expression.

Lista de figuras

Figura 1.1 - Distribuição dos genes anotados por meio da plataforma RAST de acordo com sua categoria em cada subsistema. *M. mesophilicum* (SR1.6/6) possui cerca de 6,214,449 bp contendo 5,945 ORFS destas 3,022 alocadas em subsistemas.....30

Figura 1.2 - Organização de genes da via de oxidação primária de metanol de *M. mesophilicum* SR1.6/6, obtida pelo software Artemis (RUTHERFORD et al., 2000) - **A**) Gene *mxq* codifica um regulador quinase e pode estar envolvido da regulação da expressão de *mxpDM* e *LuxR/mxqE* codifica para um regulador de dois componentes da família transcricional LuxR I, que responde a quorum sensing; **B**) Gene *pqqF* e *pqqG* estão envolvidos com a biossíntese de pirroloquinolina quinona porém ocorre em módulos metabólicos separados dos demais genes (*pqqACE*) podendo participar como co-fator de outra desidrogenase em *M. extorquens* AM1; **C**) Gene *mxpD* e *mxpM* estão envolvidos com a regulação do gene *mxqF*, genes *pqqA*, *pqqB*, *pqqC* e *pqqE* estão envolvidos com a biossíntese de pirroloquinolina quinona; **D**) Gene *mxqB* também codifica para dois componentes da família transcricional LuxR I, que responde a *quorum sensing*, no geral este cluster contém 14 genes que são responsáveis pela codificação dos polipeptídeos estruturais da metanol desidrogenase.....33

Figura 1.3 - Árvore filogenética de *Methylobacterium* spp. baseada na sequência de proteína codificada pelo gene *phaC* alinhadas por MUSCLE com parâmetro neighbor-joining utilizando o programa MEGA 6. *Methylocella silvestris* BL2 foi utilizada como grupo externo.....35

Figura 1.4 - Organização estrutural dos genes que codificam a biossíntese de hopanóides em *M. mesophilicum* SR1.6/6 obtida pelo software Artemis (RUTHERFORD et al., 2000). *proteína tolerante a tolueno; **proteína hipotética; ***família do regulador transcricional MarR.....39

Figura 1.5 - Cluster terpeno proposto pelo software Antismash: carboxilmuconolactona decarboxilase putativo - MmSR116_0105; B) pequena cadeia desidrogenase/reductase SDR - MmSR116_0106; C) 1-deoxi-D-xilose-5-fosfato sintase - MmSR116_0116; D) açúcar epimerase associado com hopanóide - MmSR116_0117; E) esqualeno sintase - MmSR116_0118; F) esqualeno sintase - MmSR116_0119; G) esqualeno associado a FAD-dependente desnaturase - MmSR116_0120; H) esqualeno hopano ciclase - MmSR116_0121; I) TolC família do tipo I do sistema de secreção - MmSR116_0126.....47

Figura 1.6 - Cluster Linaridin proposto pelo software Antismash: A) RNA polymerase, sigma 24 subunit; B) regulador transcricional; C) proteína acil carreadora - MmSR116_1882; D) Beta-hidroxiacil-(proteína acil carreadora) desidratase FabA/FabZ - MmSR116_1883; E) Beta-ketoacil sintase - MmSR116_1884; F) cipemicina – que não foi anotado no genoma de SR1.6/6; G) *cold-shock* DNA- com domínio proteico - MmSR116_1885; H) N-acetiltransferase - MmSR116_1888; I) poliprenol-monofosfomanose sintase - MmSR116_1891; aciltransferase - MmSR116_1892; J) desidrogenase - MmSR116_1893; L) pequena subunidade carbamoil fosfato sintase - MmSR116_1894; M)ABC-2 transportador - MmSR116_1897; N) transportador ABC ATP-proteína ligante - MmSR116_1898.....48

Figura 1.7 - Modelo esquemático da via de biossíntese de auxina adaptado para <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	54
Figura 1.8 – Modelo esquemático de como a bactéria pode promover o crescimento da planta, produzindo AIA, ACC desaminase e controlar os níveis de etileno na planta diminuindo o estresse.....	55
Figura 1.9 - Árvore filogenética de espécies de <i>Methylobacterium</i> , sequencias de 7 proteínas foram concatenadas e alinhadas por <i>MUSCLE</i> com parametro <i>neighbor-joining</i> utilizando o programa MEGA 6. <i>Methylocella silvestris</i> BL2 foi utilizada como grupo externo.....	60
Figura 1.10 - Modelo esquemático da interação da linhagem SR1.6/6 de <i>M. mesophilicum</i> e a planta hospedeira e o inseto, cigarrinha, vetor da doença clorose variegada de citros (CVC) causada por <i>X. fastidiosa</i>	61
Figura 2.0 - Delineamento experimental para o estudo da interação entre SR1.6/6 e a planta hospedeira. GM1, GM2, GM3: Grupo 1,2, 3 <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6 ; GMC1, GMC2, GMC3: Grupo 1, 2, 3 <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 + Citros ; GC1, GC2, GC3: Grupo 1, 2, 3 Citros.....	84
Figura 2.1 - Curva de crescimento de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 em meio <i>Nutrient Broth</i> (Sigma).....	90
Figura 2.2 - Curva de crescimento de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 em meio mínimo (Hypho - Peel e quayle, 1961).....	90
Figura 2.3 - Tratamentos GM (SR1.6/6), GMC-A/B (SR1.6/6 + citros), GC (citros).....	91
Figura 2.4 - Monitoramento por qPCR de SR1.6/6 em colonização de raízes e caule de <i>C. sinensis</i> , após 1, 3 e 5 dias de interação.....	92
Figura 2.5 - <i>Methylobacterium mesophilicum</i> (SR1.6/6) na superfície de raiz de <i>Citrus sinensis</i> . (A) 24 h após a inoculação, (B) 72 h após a inoculação e (C) 120 h após a inoculação.....	93
Figura 2.6 - Padrão RNA ribossomal evidenciado pela seta, obtido por DHPLC - <i>Equipamento Transgenomic</i>	93
Figura 2.7 - A área evidenciada representa o tempo de coleta para a amostra e mRNA por meio de DHPLC - <i>Equipamento Transgenomic</i>	94
Figura 2.8 - Padrão RNA mensageiro, após a depleção de RNA ribossomal por meio de DHPLC <i>Equipamento Transgenomic</i>	94
Figura 2.9 - Expressão gênica dos genes <i>crtI</i> , ACC-deaminase, <i>patatin</i> , durante a interação com os exsudatos e com a planta hospedeira comparado com o controle SR1.6/6 em agua suplementada com 10% de meio SPW modificado. Os valores apresentam médias de medidas de	

expressão gênica relativa ao gene normalizador *zwf* as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,01$); **diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).....95

Figura 2.10 - Expressão gênica dos genes envolvidos na biossíntese de hopanóides, comparado com o controle SR1.6/6 em água suplementada com 10% de meio SPW modificado. 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 ($p < 0,01$).....96

Figura 2.11 - Gráfico *heatmap* dos tratamentos GM (A1, A2, A3); GMC-B (B1, B2, B3); GMC-A (C1, C2, C3) mostrando que a triplicata GMC-A foi o tratamento mais homogêneo entre as triplicatas.....99

Figura 3.1 - Mapa do plasmídeo *shc* e *hpnE*, apresentando as regiões de anelamento dos *primers* específicos.....115

Figura 3.2 - Sequências dos primers para a construção dos plasmídeos para nocaute, combinados com a técnica *Gibson Assembly*.....117

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Características dos genomas de <i>Methylobacterium</i> depositados no banco de dados NCBI (Dourado, et al 2015).....	27
Tabela 1.2 - Genes da via de Biossíntese de hopanóides anotados no genoma de SR1.6/6.....	34
Tabela 1.3 - Genes de flagelo de <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6.....	52
Tabela 1.4 - Receptores de sideróforos TonB-dependente com domínios proteicos em <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6 envolvidos com a aquisição e síntese de sideróforos.....	59
Tabela 2.1: Primers utilizados para a quantificação da expressão genica durante a interação <i>M. mesophilicum</i> <i>C. cinensis</i>	86
Tabela 2.2: Dados do sequenciamento dos transcritos das amostras GM (controle), GMC - A (planctônico), GMC-B.....	97
Tabela 2.3 - Genes diferencialmente expressos nos tratamento GMC-A (planctônico) e GMC-B (interação) comparados com o tratamento controle GM (sem inóculo da bactéria).....	98
Tabela 2.4 - Genes diferencialmente expressos em comparação aos tratamentos GMC-A (planctônico) e GMC-B (interação).....	98
Tabela 3.1 - Componentes do tampão 5X Isothermal reaction buffer (5X IRB).....	115
Tabela 3.2 - Reagentes para a reação Gibson Assembly para 8 amostras.....	116
Tabela 3.3 – Sequências, dos primers para a construção dos plasmídeos para nocaute, combinados com a técnica Gibson Assembly.....	117

SUMÁRIO

RESUMO do Capítulo 1	
ABSTRACT of Chapter	
Capítulo 1 – Genoma de <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6	20
1.1 INTRODUÇÃO	20
1.1.1 O GÊNERO <i>Methylobacterium</i>	20
1.1.2 A LINHAGEM SR1.6/6 DE <i>Methylobacterium mesophilicum</i>	22
1.1.3 TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	24
1.1.3.1 Ômicas em <i>Methylobacterium</i> spp	25
1.2 OBJETIVO	28
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
1.3.1 MONTAGEM GENÔMICA DE <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	28
1.3.2 ANÁLISE DE QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS.....	29
1.3.3 ANOTAÇÃO GENÔMICA DE <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	29
1.3.4 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DO GENOMA DE <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	29
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
1.4.1 MONTAGEM E ANOTAÇÃO GENÔMICA DE <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6.....	30
1.4.2 ANOTAÇÃO FUNCIONAL: GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM A PLANTA	32
1.4.2.1 Metabolismo Primário e Metilotrófico	32
1.4.2.1.1 Oxidação primária de metanol.....	32
1.4.2.1.2 Genes de polihidroxialcanoato (PHA) em SR1.6/6.....	34
1.4.2.1.3 Fagos e transposons.....	36
1.4.3 ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE	37
1.4.3.2 Estresse oxidativo	40

1.4.4 SR1.6/6 E A PLANTA HOSPEDEIRA.....	42
1.4.4.1 O sistema <i>quorum sensing</i> (QS)	42
1.4.4.2 Sistema de secreção	43
1.4.4.3 Proteção contra patógenos.....	46
1.4.4.3.1 Metabólitos secundários e compostos antimicrobianos	46
1.4.4.3.2 Formação de biofilme e a associação com inseto.....	48
1.4.4.5 Promoção de crescimento de plantas	52
1.4.4.5.1 Produção de hormônios citocinina, ácido idol acético (AIA) e o efeito de ACC-deaminase.....	53
1.4.4.5.2 Produção e captação de sideróforos.....	55
1.4.4.5.3 Solubilização de fosfato	59
<i>1.4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	59
REFERÊNCIAS* do Capítulo 1	62
RESUMO do Capítulo 2	
ABSTRACT of Chapter 2	
Capítulo 2 – Expressão gênica da interação de <i>Methylobacterium</i>	78
<i>mesophilicum</i> SR1.6/6 com a planta hospedeira <i>Citrus sinensis</i>	78
2.1 INTRODUÇÃO	78
2.1.1 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	78
2.1.2 INTERAÇÃO BACTÉRIA - PLANTA	79
2.2. OBJETIVOS.....	81
2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	81
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	82
2.3.1 ISOLADO DE <i>M. mesophilicum</i> E CONDIÇÕES DE CULTIVO	82
2.3.2 CRESCIMENTO AXÊNICO DE PLÂNTULAS (<i>in vitro</i>)	82
2.3.3 SELEÇÃO E PREPARO DAS PLANTAS	83

2.3.4 INOCULAÇÃO DE <i>M. mesophilicum</i> (SR1.6/6)	83
2.3.5 DELINEAMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO <i>M. mesophilicum</i> (SR1.6/6) - <i>Citrus sinensis</i>	83
2.3.6 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DA COLONIZAÇÃO DE SR1.6/6 NA PLANTA HOSPEDEIRA.....	84
2.3.7 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO BACTÉRIA-PLANTA.	85
2.3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA COLONIZAÇÃO DE SR1.6/6 E A PLANTA HOSPEDEIRA	87
2.3.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE POR RNAseq	87
2.3.10. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6 E <i>C. sinensis</i>	87
2.3.11 PROCESSAMENTO DO RNA.....	88
2.3.11.1 Enriquecimento de RNA mensageiro (mRNA).....	88
2.3.11.2 Preparo da biblioteca de cDNA para o transcriptoma	88
2.3.11.3 Preparo das microesferas para sequenciamento	88
2.3.11.4 Sequenciamento do RNA em plataforma SOLiD.....	89
2.3.11.5 Análise das sequências transcritômicas.....	89
2.3.11.6 Mapeamento do transcriptoma de <i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	89
2.4. RESULTADOS	90
2.4.1 ISOLADO DE <i>M. mesophilicum</i> E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	90
2.4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	90
2.4.2.1 PCR em tempo real da colonização de SR1.6/6 e a planta hospedeira.....	90
2.4.2.2 Microscopia eletrônica da colonização de SR1.6/6 e a planta hospedeira.....	92
2.4.3 PCR QUANTITATIVO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO BACTÉRIA-PLANTA..	94
2.4.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS TRANSCRIPTÔMICAS.....	96
2.5 DISCUSSÃO.....	99
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	
REFERÊNCIAS* do Capítulo 2	106

RESUMO do Capítulo 3	
ABSTRACT of Chapter 3	
CAPÍTULO 3 – Mutações em <i>Methylobacterium</i> spp.	113
3.1 INTRODUÇÃO	113
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	114
3.2.1 ISOLADO DE <i>Methylobacterium mesophilicum</i> E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	114
3.2.2 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA NOCAUTE DE GENES DE HOPANÓIDE EM SRI.6/6	114
3.2.3 CONJUGAÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA NOCAUTE EM SRI.6/6.....	116
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.3.1 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA NOCAUTE DE GENES DE HOPANÓIDE EM SRI.6/6	117
3.3.2 CONJUGAÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA NOCAUTE EM SRI.6/6.....	118
3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
REFERÊNCIAS* do Capítulo 3	119
4. CONCLUSÃO	121

RESUMO do Capítulo 1

NEVES, A. A. C. **Genoma de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6**. 54 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O gênero *Methylobacterium* é composto por bactérias de coloração rósea, metilotróficas facultativas (PPFMs) comumente encontradas em associação com plantas hospedeiras. Algumas espécies deste gênero são capazes de promover o crescimento vegetal, aumentar a atividade fotossintética e reduzir a ação de patógenos às plantas hospedeiras. Este gênero tem despertado grande interesse, pois além de ser capaz de colonizar diversas espécies de plantas, possui aplicação biotecnológica, tais como: promoção de crescimento do vegetal e produção de biopolímeros. Portanto, análises genômicas tem sido realizadas a fim de entender os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre *Methylobacterium* spp. e a planta hospedeira, incluindo as estratégias que determinam a adaptação destas bactérias aos tecidos da planta. A linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum* foi isolada do interior de ramos de citros (*Citrus sinensis*) e devido a sua interação com a planta hospedeira e, possivelmente, com o patógeno *Xylella fastidiosa*, tem sido foco de diversos trabalhos. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: *i*) remontar e reanotar o genoma da SR1.6/6; *ii*) identificar e descrever vias metabólicas associadas com a interação entre bactéria e a planta hospedeira no genoma de SR1.6/6. Foram identificados genes de vias metabólicas envolvidas no processo de associação com a planta hospedeira, genes envolvidos com o metabolismo metilotrófico, com a promoção de crescimento, com a comunicação bacteriana, formação de biofilme, reguladores, transporte de proteínas e com o sistema de secreção. O processo de interação bactéria planta envolve um complexo mecanismo de reconhecimento e adaptação dos envolvidos, e o conhecimento do genoma desta linhagem pode fornecer subsídios para o incremento na produção agrícola.

Palavras-chave: Endofítico. Interação. Genômica. PPMB

ABSTRACT of Chapter 1

NEVES, A. A. C. **Genomic of *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6**. 54 f. Ph.D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The genus *Methylobacterium* consists of bacteria pink pigment, methylotrophic facultative (PPFMs) and they are commonly found in association with host plants. Some species of this genus are able to promote plant growth, increase the photosynthetic activity and reduce the incidence of pathogens to the host plants. This genus has attracted great interest, as well as being able to colonize several plant species, has biotechnological applications, such as plant growth promotion and production of biopolymers. Therefore, genomic analysis has been carried out to understand the molecular mechanisms involved in the interaction between *Methylobacterium* spp. and the host plant, including strategies that determine the adaptation of these bacteria to the plant tissues. *M. mesophilicum* SR1.6/6 was isolated from citrus branches (*Citrus sinensis*) and due to its interaction with the host plant and possibly with *Xylella fastidiosa*, has been the focus of several studies. Thus, the objectives of this study were: i) reassemble and reannotate the genome of SR1.6/6; ii) identify and describe metabolic pathways associated with bacteria-plant interactions in the genome of SR1.6/6; ii) analyze the transcriptome of *M. mesophilicum* SR1.6/6 in response to interaction with the host plant. Described genes of metabolic pathways involved in the association process with the host plant, involved in the metabolism metilotrófico, growth promotion, communication bacterial, biofilm formation, regulators, protein transport and secretion system. The process plant bacterium interaction involves a complex mechanism for the recognition and adaptation, with the knowledge of the genome of this strain can help the agricultural.

Keywords: Endophytes. Interation. Genomic. PPMB.

Capítulo 1 – Genoma de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 O GÊNERO *Methylobacterium*

O gênero *Methylobacterium* foi criado por Patt e colaboradores no ano de 1976. Atualmente, este gênero pertence à classe Alpha-proteobacteria e é formado por bactérias Gram negativas. Tem como espécie tipo a linhagem *Methylobacterium organophilum* e inclui 51 espécies descritas (<http://www.bacterio.cict.fr/m/methylobacterium.html>).

Este gênero é caracterizado como PPFM (*Pink-Pigmented Facultative Methylotrophics*), pois, geralmente, apresentam pigmentação rósea devido a síntese de carotenóides (VAN DIEN et al., 2003) e possui a capacidade de utilizar compostos de apenas um carbono (C1) como fonte de energia, tais como, metanol e metilamina (TOYAMA et al., 1998). Bactérias deste gênero estão distribuídas em diferentes ambientes naturais, colonizando o solo, ar, poeira, água (doce e salgada), sedimentos e ambientes urbanos (suprimento de água, banheiro e ar condicionado) (VAN AKEN et al., 2004a), são também frequentemente isoladas de diversas espécies de plantas (OMER et al., 2004).

A principal característica deste grupo está na habilidade em oxidar metanol a formaldeído, por meio da enzima desidrogenase (MDH), a qual tem a sua subunidade maior codificada pelo gene *mxhF*. Essas bactérias apresentam como características taxonômicas, a forma de bastonete reto e metabolismo estritamente aeróbio, crescem ativamente em tecidos meristemáticos - formando populações entre 10^4 e 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido da planta (DORONINA et al., 2002), onde podem formar biofilmes (ANDREOTE et al., 2006) e utilizar o metabolismo metilotrófico como vantagem adaptativa durante a colonização da planta hospedeira (SY et al., 2005).

Estudos sugerem que o grau de associação entre *Methylobacterium* spp. e a planta hospedeira varia de forte ou simbiótico (JOURAND et al., 2004) a fraco ou epifítico (OMER et al., 2004), faixa esta que inclui também o estado intermediário de associação endofítica (LACAVA et al., 2004). Espécies do gênero *Methylobacterium* podem colonizar ativamente a superfície de folhas de diferentes hospedeiros (CHANPRAME et al., 1996) e colonizar endofiticamente hospedeiros como soja (KUKLINSKY-SOBRAL, 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 et al., 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).

Na agricultura, *Methylobacterium* spp. podem contribuir em várias aplicações biotecnológicas, Polaco e Holand (1991) patentearam (número US5268171) um processo onde *M. mesophilicum* pode alterar o metabolismo da planta, modificando os níveis de atividades enzimáticas, melhorando a performance agrônômica e em 1995 esses mesmos autores depositaram outra patente (número US5512069) onde utilizaram *Methylobacterium* spp. para melhorar a capacidade de germinação de sementes de plantas, e também produzir citocininas. Verginer et al. (2010) relataram que a linhagem *M. extorquens* DSM 21961 pode *in vitro* aumentar a produção de dois compostos furanóide 2,5-dimetil-4-hidroxi-2H-furanona (DMHF) e 2,5-dimetil-4-metoxi-2H-furanona, responsáveis pelo aroma de morango, mostrando que a bactéria pode influenciar nesta qualidade comercial deste fruto.

Adicionalmente ao metabolismo metilotrófico, Sy et. al., (2001) relataram a presença de genes da nitrogenase (*nifH*) e de nodulação (*nodA*) em linhagens de *M. nodulans*, mostrando que este grupo pode estar envolvido com o processo de fixação de nitrogênio atmosférico quando em associação com as plantas. Outras espécies de *Methylobacterium* são capazes de produzir fitohormônios 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). Cervantes-Martinez et al. (2004) verificaram que a presença da bactéria endofítica *Methylobacterium* sp. aumenta o número de estômatos, o teor de clorofila e o conteúdo de ácido málico em *Arabidopsis thaliana*, ou seja, maior atividade fotossintética.

O gene *cryIAa* de *Bacillus thuringiensis*, codificador de uma proteína com atividade tóxica específica contra insetos da ordem Lepidoptera foi clonado e expresso em *M. extorquens*, utilizando como promotor o gene *mxoF*. Esta bactéria foi capaz de expressar o gene de interesse e produzir a proteína recombinante, sugerindo que, *M. extorquens* pode ser desenvolvida para promover o crescimento vegetal e controlar pragas como insetos da ordem Lepidoptera (JAYASHREE et al., 2011). De um modo semelhante, pesquisadores foram capazes de expressar a enzima β -1,4-endoglucanase A (*eglA*) (a partir de *Bacillus pumilus*) em *M. extorquens* AR1.6/2 (FERREIRA FILHO et al., 2012), sugerindo que esta linhagem geneticamente modificada pode ser utilizada como um agente no controle biológico, visto que, a síntese desta endoglucanase juntamente com outras enzimas, tais como, pectinases e celulases, podem ser importante durante o processo de colonização da planta hospedeira, e

posteriormente, ativar o sistema de defesa da planta hospedeira por meio da indução da resistência sistêmica (LEE et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2006b). Portanto, bactérias do gênero *Methylobacterium* podem apresentar importantes papéis na manutenção do equilíbrio microbiológico na planta, evidenciando sua importância no desenvolvimento do hospedeiro em diferentes condições ambientais.

Além do potencial das bactérias do gênero *Methylobacterium* na agricultura, tem sido estudado o seu potencial biotecnológico aplicado à biorremediação e produção de compostos de valor agregado, neste sentido, Van Aken et al. (2004b) isolaram uma linhagem de *Methylobacterium* sp. BJ001, capaz de degradar trinitrotolueno (TNT), um explosivos tóxico, sugerindo que estas bactérias possam de alguma forma, atenuar ou biodegradar *in situ* compostos de ambientes contaminados por explosivos, Shen e Wu (2007) construíram uma linhagem capaz de super expressar uma hidroxipiruvato redutase, componente chave no ciclo da serina, levando ao acúmulo de glioxilato, um composto comercialmente importante na fabricação de perfumes, drogas e pesticidas. Foi relatado que espécies do gênero *Methylobacterium* são também capazes de sintetizar poliéster da família PHA (polihidroxialcanoato) que são biopolímeros biodegradáveis (HÖFER et al., 2011; YEZZA et al., 2006; ZÚÑIGA et al., 2013) e também de degradarem o diclorometano (DCM, CH_2Cl_2), um solvente halogenado volátil e tóxico ,utilizado e produzido por indústrias (KEYSER et al., 2002).

1.1.2 A LINHAGEM SR1.6/6 DE *Methylobacterium mesophilicum*

A linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum* foi previamente isolada como bactéria endofítica de ramos de *Citrus sinensis* (ARAÚJO et al., 2002). A avaliação da interação entre bactérias endofíticas em citros, sadios e com sintomas da CVC (clorose variegada dos citros) causada por *Xylella fastidiosa*, mostrou que *Methylobacterium* foi o gênero dominante no interior dos ramos de citros estudados, porém, apresentou uma variação na frequência de isolamento entre citros não infectados, sintomáticos (que apresentavam *Xylella fastidiosa* e os sintomas típicos da doença) e assintomáticos (que apresentavam *X. fastidiosa*, mas não apresentavam os sintomas da CVC). Os autores sugerem que *M. extorquens* poderia participar no desenvolvimento dos sintomas da CVC por favorecimento de *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2004). Por outro lado, a presença da bactéria endofítica *Curtobacterium flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* em tecidos internos de plantas assintomáticas de citros poderia estimular a produção de compostos ou elicitar, de alguma forma, um aumento na resistência destas

plantas à *X. fastidiosa* ou a redução no crescimento deste fitopatógeno vascular. Neste sentido, o estudo de interação *in vitro* comprovou que *M. mesophilicum* inibe o crescimento de *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2004, 2006). Dourado et al., 2015 observaram que alguns genes relacionados ao crescimento de *X. fastidiosa* foram reprimidos na presença de *M. mesophilicum* e neste contexto, uma das hipóteses seria a diminuição de formação de biofilme por *X. fastidiosa* quando em interação com *M. mesophilicum* durante a colonização da planta.

A interação de *M. mesophilicum* e *X. fastidiosa* foi também estudada em outros modelos de plantas (p.e. *Catharanthus roseus* e *Nicotiana clevelandii*), mostrando que *M. mesophilicum* é capaz de colonizar o xilema das plantas hospedeiras e pode alterar a comunidade endofítica local, assim, podendo viabilizar o seu uso no controle de *X. fastidiosa* (ANDREOTE et al., 2006), visto que pode ser transmitida de planta para planta por meio da cigarrinha *Bucephalagonia xanthophis* (GAI et al., 2009), um dos vetores da doença CVC que transmite *X. fastidiosa*. Estes resultados sugerem que *M. mesophilicum* pode interagir em diferentes momentos com o patógeno *X. fastidiosa*, além de colonizar a planta antes do estabelecimento da doença CVC na planta hospedeira. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos neste processo.

Rampelotti et al. (2010) sugeriram que *M. mesophilicum* pode se manter viável também no interior de lagartas (*Spodoptera frugiperda*) ao se alimentarem de ração infectada com esta bactéria, este trabalho indicou que a transferência de bactérias endofíticas modificadas (que expresse algum gene letal para insetos) da planta para o inseto pode ser uma estratégia a ser desenvolvida para o controle de pragas.

Embora *M. mesophilicum* possa colonizar diversas espécies de plantas, o sucesso da colonização de bactéria da espécie *M. mesophilicum* varia de acordo com a espécie da planta e de seu estágio de desenvolvimento, o que refletiria em diferentes mecanismos de defesa das plantas hospedeiras (ANDREOTE et al., 2010; DOURADO et al., 2013).

Estudos bioquímicos e moleculares com *M. mesophilicum* foram realizados por Pomini et al. (2009) que identificaram e caracterizaram a produção de 6 tipos diferentes de acil-homoserinas-lactonas (AHL) em *M. mesophilicum* SR1.6/6. As AHLs são indutores, importantes moléculas sinalizadoras produzidas por bactérias, que fazem parte de um sistema denominado *Quorum Sensing* (QS), essencial na organização de comunidades bacterianas.

Dourado et al., 2013 observaram em *M. mesophilicum* SR1.6/6 a repressão de um gene envolvido com proteção celular contra danos oxidativos, o gene *crfI*, quando em interação

com eucalipto e arroz, entretanto, foi observado a indução de genes envolvidos com atividade de catalase e glutatona quando em interação com soja, sugerindo que estas atividades são essenciais para adaptação da bactéria com os exsudatos da planta na fase inicial da interação (ARAÚJO et al., 2015).

Embora estudos tenham sido realizados a fim de desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre *Methylobacterium* spp. e a planta hospedeira, muito ainda falta entender a respeito destas estratégias utilizadas pela bactéria para o seu reconhecimento e estabelecimento na planta hospedeira e, desta forma, o estudo da interação bactéria-planta descrito no capítulo 2 contribui com subsídios para um melhor entendimento deste mecanismo.

1.1.3 TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A utilização de técnicas moleculares para o sequenciamento de genomas possibilita o estudo da estrutura genômica e a predição do funcionamento do material genético de um organismo. A técnica de sequenciamento tem sido um dos grandes desafios da genômica e atualmente, tem apresentado grandes avanços, principalmente, após a chegada do sequenciamento de segunda geração (Next-generation DNA sequencing - NGS) que atribuiu à esta tecnologia, maior rapidez, melhor rendimento, maior cobertura e menor custo por base sequenciada, se tornando acessível a muitos laboratórios e pesquisadores, proporcionando uma vasta utilização desta tecnologia e por consequência resultando em um elevado número de genomas depositados em bancos de dados (CHAN, 2005).

O desenvolvimento de técnicas de sequenciamento é de extrema importância para a ciência, no âmbito da genômica, transcritômica e proteômica, pois, através do sequenciamento de DNA, RNA e proteínas juntamente com a bioinformática, novos genes e vias metabólicas tem sido descobertos em micro-organismos. Além do que, o estudo de genoma e transcriptoma pode permitir um melhor entendimento dos aspectos integrados da biologia dos organismos, assim como inter-relações de sequências, estudos da estrutura tridimensional, padrões de expressões gênicas em diferentes ambientes, como por exemplo, durante a interação entre bactéria e a planta hospedeira, interações e funções de proteínas individuais, permitindo também um melhor entendimento dos organismos, além de nortear modificações científicas de sistemas biológicos, assim como apoiar aplicações nas áreas de medicina, agricultura, indústria e tecnologia (LESK, 2008).

Neste contexto, um melhor conhecimento do genoma de microrganismos endofíticos pode auxiliar na exploração do uso do potencial destes organismos com fim agrônômico e botecnológico.

1.1.3.1 Ômicas em *Methylobacterium* spp.

Atualmente, existem 22 genomas de *Methylobacterium* disponíveis no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): *M. extorquens* (AM1, DM4, PA1, DSM13060, CM4), *M. nodulans* ORS2060, *M. populi* BJ001, *M. radiotolerans* JCM2831, *M. oryzae*, e 13 isolados pertencentes a espécies ainda não identificadas (*Methylobacterium* sp: 4-46, GXF4, MB200, 77, WSM2598, 285MFTsu5.1, 10, B1, B34, 88A, L2-4, EUR3 AL-11 e UNCCL110) e *M. mesophilicum* SR1.6/6, a qual é objeto de pesquisa do presente trabalho. Em geral *Methylobacterium* spp. tem sido isolada de diferentes ambientes, como: ar, biorreator, plantas, solo contaminado e lagos. A porcentagem de G+C destes genomas varia entre 60 e 72% com o tamanho entre 4.6-7.8 Mb (Tabela 1.1) (DOURADO et al., 2015).

O sequenciamento e a anotação de genomas bacterianos auxiliam os estudos de transcriptomas, sendo possível identificar uma grande variedade de genes diferencialmente expressos durante, por exemplo, a interação entre bactéria e a planta hospedeira. Kwak et al. (2014) através de uma análise filogenética de 36 genes essenciais denominados *housekeeping* (CICCARELLI et al., 2006) dividiram algumas espécies de *Methylobacterium* em três grupos: 1-) *M. extorquens* CM4, *M. extorquens* AM1, *M. extorquens* DM4, *M. extorquens* PA1, *M. extorquens* BJ001; 2-) *M. oryzae* CBMB20, *M. radiotolerans* JCM2831; 3-) *M. nodulans* ORS2060, *Methylobacterium* sp. 4-46 e relacionaram estes grupos quanto ao potencial em promover o crescimento de planta hospedeira. Foi observado que o grupo (1) é o grupo que possui menos genes em seu genoma relacionados com a promoção de crescimento, não possuindo o gene *acdS* codificador de ACC-deaminase, fitase, e sistema liase C-P. O grupo (2) é o grupo que mais possui genes relacionados com a promoção de crescimento da planta, sendo que, dos genes avaliados, não possui apenas genes de fixação de nitrogênio, enquanto o grupo (3) foi o único grupo que possuía genes de fixação de nitrogênio.

Nos últimos anos tem sido realizados sequenciamentos de linhagens de *Methylobacterium* isoladas de plantas. Gan et al. (2012) sequenciaram a linhagem GXF4 isolada de fluídos de xilema de videira, e demonstraram que esta linhagem é capaz de produzir acil-homoserina lactona (AHL) corroborando com Pomini et al. (2009) que também identificou a produção de AHL em *M. mesophilicum* SR1.6/6. Os autores sugeriram que estes

sinais bacterianos de comunicação podem influenciar a colonização da planta, neste caso o xilema, podendo implicar na gestão de doenças de videiras, com o potencial de melhorar o desenvolvimento de novas abordagens para a melhoria da resistência às doenças de xilema (ALMEIDA; PURCELL et al., 1996). Almeida et al. (2013) sequenciaram o genoma da linhagem SR1.6/6 (objeto deste estudo) previamente isolada de ramos de citros foi sequenciado e anotado e este foi o primeiro genoma sequenciado da espécie *M. mesophilicum*.

Um estudo de duas linhagens de *M. extorquens* (AM1 e DM4) revelou que embora os genomas destas duas linhagens sejam bastante similares, existe uma diferença no tamanho e no número de replicons entre elas, além de apresentarem conjuntos de genes específicos e com funções desconhecidas para cada uma das linhagens. A análise destes genomas evidenciou que existe variação no número de elementos de inserção - IS, assim como na organização de genes associados com a utilização de C1. Neste trabalho foi sugerido que os rearranjos genômicos e a transferência horizontal de genes são mais frequentemente associados com os IS, o que representa o principal mecanismo da evolução de *Methylobacterium* (VUILLEUMIER et al., 2009). Por outro lado, um estudo comparou duas linhagens de *M. extorquens* (PA1 e AM1) e mostrou que o conteúdo de G+C destas duas linhagens é bastante semelhantes, 68,2% e 68,5% respectivamente. Também apontou que cerca de 90 genes envolvidos com o metabolismo metilotrófico, compartilhados entre as linhagens, possui similaridade maior que 95% no nível de aminoácidos, sugerindo que estas duas linhagens utilizam um sistema bastante semelhante durante o crescimento em C1. Entretanto, quando utilizada outra a fonte de carbono, o crescimento das linhagens era distinto, variando bastante a taxa de crescimento. Esta diferença pode refletir na adaptação destas linhagens em diferentes nichos, com a capacidade em utilizar diferentes substratos (NAYAK; MARX, 2014). Marx et al. (2012) observaram que existe um *core* conservado no genoma de *Methylobacterium* spp. Neste trabalho, foram estudadas 6 linhagens (*M. extorquens* PA1; *M. extorquens* CM4; *M. extorquens* strain BJ001b; *M. radiotolerans* JCM 2831; *Methylobacterium* sp.; *M. nodulans* ORS 2060) e foi observado que 5 dessas 6 linhagens apresentavam genes conservados para as atividades de fotossíntese, incluindo genes envolvidos na biossíntese de bacterioclorofila e carotenóides.

Portanto, o gênero *Methylobacterium* apresenta grande potencial biotecnológico, visto que tem sido descrito como agente de controle biológico de patógenos, produtor de moléculas de interesse e fitohormônios. Entretanto, para que esta possibilidade se torne realidade, se faz necessário uma maior compreensão de seu genoma, incluindo a comparação de genomas e

estudos anteriores, visando principalmente elucidar a interação com plantas e demais atividades potenciais.

Tabela 1.1 - Características dos genomas de *Methylobacterium* depositados no banco de dados NCBI (DOURADO, et al 2015).

Organismo	Linhagem	GenBank Assembly ID	Tamanho do genoma (Mpb)	Conteúdo CG (%)	Número de Genes
<i>M. extorquens</i>	AM1	GCA_000022685.1	6.88	68.7	5065
<i>M. extorquens</i>	DM4	GCA_000083545.1	6.12	68.1	5851
<i>M. extorquens</i>	PA1	GCA_000018845.1	5.47	68.2	4956
<i>M. extorquens</i>	CM4	GCA_000021845.1	6.18	68.2	5463
<i>M. extorquens</i>	DSM13060	GCA_000243435.2	6.67	68.30	6894
<i>M. mesophilicum</i>	SR1.6/6	GCA_000364445.1	6.2	69.47	6052
<i>M. nodulans</i>	ORS2060	GCA_000022085.1	7.78	68.9	7765
<i>M. populi</i>	BJ001	GCA_000019945.1	5.80	69	5492
<i>M. radiotolerans</i>	JCM2831	GCA_000019725.1	6.08	71.5	5839
<i>Methylobacterium sp</i>	4-46	GCA_000019365.1	7.66	71.4	7145
<i>Methylobacterium sp</i>	GXF4	GCA_000272495.1	6.12	69.6	5976
<i>Methylobacterium sp</i>	MB200	GCA_000333655.1	5.77	68.9	5038
<i>Methylobacterium sp</i>	77	GCA_000372825.1	4.66	66.7	4108
<i>Methylobacterium sp</i>	WSM2598	GCA_000379105.1	7.67	71.2	6631
<i>Methylobacterium sp</i>	285MFTsu5.1	GCA_000383455.1	6.62	71	5970
<i>Methylobacterium sp</i>	10	GCA_000519085.1	4.98	66.7	4285
<i>Methylobacterium sp</i>	B1	GCA_000333255.1	5.91	69.6	-
<i>Methylobacterium sp</i>	B34	GCA_000333475.1	6.93	70.4	-
<i>Methylobacterium sp</i>	88A	GCA_000376345.1	4.89	67.1	4274
<i>Methylobacterium sp</i>	L2-4	GCA_000454305.1	6.8	70.8	6255
<i>Methylobacterium sp</i>	EUR3 AL-11	GCA_000526475.1	7.21	71.1	6670
<i>Methylobacterium sp</i>	UNCCL110	GCA_000745415.1	6.61	69.7	-

1.2 OBJETIVO

Realizar a montagem, predição e anotação automática e manual do genoma de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral, o presente trabalho apresenta os seguintes objetivos específicos:

(i) Realizar a remontagem do genoma de *M. mesophilicum* linhagem SR1.6/6 já sequenciado por meio de pirosequenciamento (454);

(ii) Realizar a predição e anotação do genoma de *M. mesophilicum* linhagem SR1.6/6;

(iii) Realizar a anotação funcional do genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 com ênfase no estudo de vias metabólicas possivelmente envolvidas com a interação bactéria-planta.

1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 MONTAGEM GENÔMICA DE *M. mesophilicum* SR1.6/6

Em etapa anterior ao presente projeto o genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi sequenciado utilizando o serviço de sequenciamento DNA FLX454 *Titanium/Roche* (Branford CT, EUA). A montagem parcial deste genoma foi realizada por meio da plataforma *gsAssembler* (montagem *de novo*) e *gsMapper* (montagem ancorada a um genoma de referência) do programa *Newbler* v. 2.3, fornecido pela Roche 454. Nestas análises preliminares, foram obtidos 187 contigs com um total de 6.5 Mb para um genoma estimado em 6.8 Mb (DINI-ANDREOTE, 2011). Entretanto, estas análises não foram suficientes para o fechamento do genoma deste isolado e, desta forma, as leituras obtidas no sequenciamento foram reanalisadas em parceria com o Laboratório de Polimorfismo do DNA (LPDNA, UFPA), sob a coordenação do Prof. Artur Luiz da Costa da Silva.

Os adaptadores e as sequências de baixa qualidade foram removidos com os scripts "sff_extract_0_2_13.py" (http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/), para a geração do "traceinfo.xml", filtrada com o script "pyseqfilter.py", considerando as leituras com 20 de qualidade *PHRED*. A estratégia de montagem utilizada combinou os softwares *Velvet* e *Mira*. Os *scaffolds* foram obtidos por curadoria e a extensão dos contigs foram realizadas com os softwares *SeqManNGen* e *SeqMan* (<http://www.dnastar.com/>). Os contigs não-extendidos foram mapeados utilizando *Workbench CLC Genomics* (CLC bio, Inc.) para a montagem de novo e maior extensão.

1.3.2 ANÁLISE DE QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS

Para avaliar a qualidade das sequências, foi utilizado o programa *CONSED* (<http://www.phrap.org>). Esta ferramenta foi utilizada para edição e visualização da anotação genômica e correção dos erros oriundos do sequenciamento baseado na qualidade de cada base, o que permitiu a visualização do valor de *PHRED* de cada base, a cobertura da região em número de leituras, bem como a averiguação da qualidade de região inteira do genoma. Desse modo, o *CONSED* permitiu a remoção ou inserção, quando necessária, de bases ou regiões que apresentaram um valor *PHRED* não confiável.

1.3.3 ANOTAÇÃO GENÔMICA DE *M. mesophilicum* SR1.6/6

Após a obtenção da sequência consenso representativa do genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6, foi realizado a predição dos prováveis genes presentes no genoma. A predição gênica aliada à curadoria automática e manual são alguns dos principais passos na anotação de um genoma. Neste ponto, foram incorporadas todas as informações gênicas correspondentes ao genoma. Para isso, foi utilizada a plataforma *RAST* (AZIZ et al., 2008) e os softwares *FgeneB* (predição de genes) (<http://linux1.softberry.com/>); *RNAmmer* (predição de rRNA que utiliza o modelo: *Hidden Markov Models – HMM* (LAGESEN et al., 2007)); *tRNAscan-SE* (predição de tRNA) (LOWE et al., 1997), *Tandem Repeat Finder* (predição de DNA repetitivo) (<http://tandem.bu.edu/trf/trf/html>) (BENSON, 1999) e *InterProScan* (ZDOBNOV et al., 2001) (predição de domínios e famílias de proteínas).

1.3.4 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DO GENOMA DE *M. mesophilicum* SR1.6/6

Foi realizada uma análise criteriosa dos contigs obtidos do genoma da SR1.6/6. Estes contigs foram submetidos à análise com o software *AntiSmash* (<http://www.secondarymetabolites.org>) a fim de avaliar a presença de clusters de síntese de metabólitos secundários. Foram estudados genes e vias metabólicas possivelmente envolvidas com a interação bactéria-planta, tais como: metabolismo primário, oxidação primária de metanol, produção de polihidróxialcanoato, biossíntese de hopanóides, auxina, ACC-deaminase, produção e captação de sideróforos, sistema *quorum sensing*, degradação de parede celular, formação de biofilme e secreção de proteínas. Desta forma, o estudo aprofundado do genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 auxiliou nas análises posteriores do RNAseq da interação bactéria-planta (Capítulo 2). O programa utilizado para a visualização da organização dos genes de interesse foi o software *Artemis* (RUTHERFORD et al., 2000), e

para a busca de vias metabólicas e genes de interesse foram utilizados os portais *KEGG* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, disponível em <http://www.genome.jp/kegg/>) e os bancos de dados *Biocyc* (<http://biocyc.org/>) e *NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Foi utilizado também o programa *MEGA 6* para construção de árvores filogenéticas.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 MONTAGEM E ANOTAÇÃO GENÔMICA DE *M. mesophilicum* SR1.6/6

O genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi sequenciado utilizando o serviço de sequenciamento de DNA FLX454 Titanium/Roche em etapa anterior ao presente trabalho. Utilizando os dados já obtidos foi realizada uma reanálise a qual verificou um total de 253,143,785 bp, 635,612 reads, com uma cobertura genômica de 40X. O genoma de *M. radiotolerans* JCM2831 foi utilizado como referência durante o processo de montagem.

Após esta análise de qualidade *PHRED* 20, o número de pares de bases foi reduzido para 163,1845,41, com uma cobertura de genoma de 22X. A estratégia de montagem utilizada combinou os softwares *Velvet* e *Mira* e foram gerados um total de 1.015 *contigs* com N50 de 333, 386pb.

Após a extensão dos *contigs* com os *SeqManNGen* e *SeqMan* (<http://www.dnastar.com/>) e o mapeamento com *Workbench CLC Genomics* (CLC bio, Inc.) foram obtidos 29 *scaffolds* com comprimento total de 6.214.449 pb, com N50 de 333.386. Desta forma, o genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi depositado em *DDBJ/EMBL/GenBank* em dezembro de 2012, sob número de acesso ANPA01000000 e submetido no periódico *Genome Announcements* em 3 de maio de 2013 e publicado em 20 de junho de 2013 (ALMEIDA et al., 2013 - Anexo A).

Por meio dos softwares utilizados para a anotação genômica foi observado que o genoma de *M. mesophilicum* (SR1.6/6) possui cerca de 6,214,449 bp contendo 5945 ORFS. A porcentagem G+C é equivalente a 69.47% e possui 46 tRNAs, 4 rRNA genes e 57 pseudogenes.

A anotação revelou que dos 29 *contigs* gerados na montagem do genoma para a melhor visualização, esta análise gerou um total de 6.151 características anotadas, sendo 6.096 equivalentes a CDS (sequências, codificadoras) e 55 equivalentes a RNA (tRNA, rRNA e outros pequenos RNAs). Desta forma, os genes anotados foram sublocados em subsistemas por meio do software *RAST*, que reconheceu 3.022 com funções específicas (Figura 1.1), fornecendo uma visão qualitativa destes genes anotados de acordo com sua função ou grupo

pré-estabelecido. Foi observado que 14% dos genes foram subalocados no subsistema envolvidos com a utilização de carboidratos, 12% com síntese de aminoácidos, 9% com cofatores, grupos proteicos e pigmentos e 6% com respiração. Esta análise automática é interessante, pois, fornece uma visão geral, porém, é uma análise resumida sobre o genoma em questão, sendo necessário uma análise criteriosa e manual dos processos de interesse.

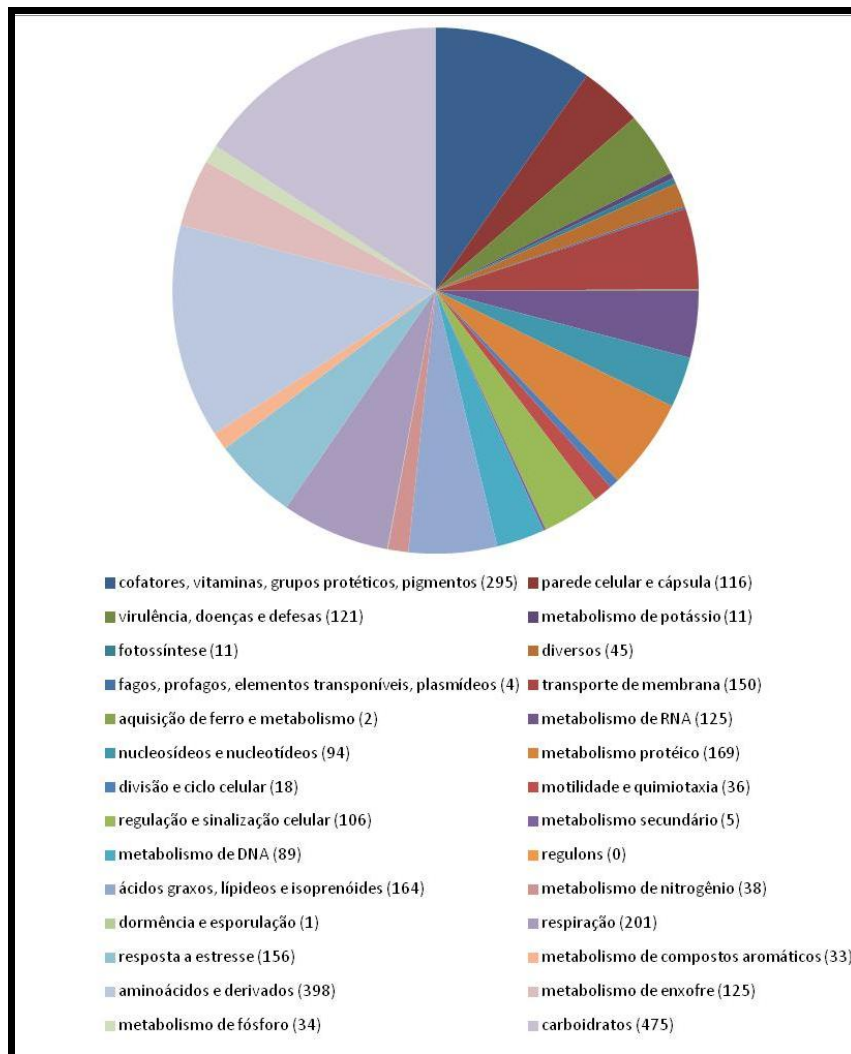


Figura 1.1 Distribuição dos genes anotados por meio da plataforma RAST de acordo com sua categoria em cada subsistema. *M. mesophilicum* (SR1.6/6) possui cerca de 6,214,449 bp contendo 5,945 ORFS destas 3,022 alocadas em subsistemas.

1.4.2 ANOTAÇÃO FUNCIONAL: GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM A PLANTA

1.4.2.1 Metabolismo Primário e Metilotrófico

Methylobacterium mesophilicum SR1.6/6 é uma bactéria metilotrófica facultativa, ou seja, é capaz de utilizar compostos C1 como fonte de carbono o que as confere uma vantagem adaptativa durante a colonização de ambientes específicos, como por exemplo, a superfície e o interior da planta hospedeira. Por meio do metabolismo metilotrófico de *Methylobacterium* spp. pode também ocorrer acúmulos e produção de compostos de valor agregado como, por exemplo, o polihidroxialcanoato (PHA).

1.4.2.1.1 Oxidação primária de metanol

O primeiro processo para a utilização de metanol como fonte de carbono é a oxidação primária do metanol, processo que converte metanol à formaldeído. Esta habilidade confere vantagem adaptativa as bactérias, especialmente durante a colonização da fitosfera. Durante a síntese de parede celular, após a desmetilação da pectina, metanol é liberado pelos estômatos e podem ser utilizados como fonte de carbono por bactérias metilotróficas (SY et al., 2005).

Foi estudado a organização estrutural da via de oxidação primária de metanol no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6, os genes estão localizados em quatro *clusters* no cromossomo com organização semelhante ao do genoma de *M. extorquens* AM1 (CHISTOSERDOVA et al., 2003). O *cluster* 1 (2,083 kb) contém os genes *mxq* (MmSR116_1075) e *mxqE* (MmSR116_1076) que codificam um sensor quinase e um regulador de dois componentes da família transcricional LuxR 1, respectivamente. No *cluster* 2 (6,167 kb), os genes *pqqABC/DE*, (*ppqA*; MmSR116_0199; MmSR116_0200; MmSR116_0201) relacionados com a biossíntese de pirroloquinolina quinona (PQQ), estão localizados 371-bp a jusante do gene *mxqDM* (MmSR116_0196; MmSR116_0197) que estão relacionado com a regulação da transcrição de metanol desidrogenase (CHISTOSERDOVA et al., 2003). O *cluster* 3 é uma pequena região (2,805 kb) que contém os genes *pqqF* (MmSR116_4464) e *pqqG* (MmSR116_4465) também relacionados com a biossíntese de PQQ, que de acordo com Chistoserdova et al. (2003), sugerem que a biossíntese de PQQ ocorre em módulos metabólicos separados podendo participar como co-fator de outra desidrogenase em *M. extorquens* AM1. O *cluster* 4 (12,389-kb) é transcrito na direção oposta à dos outros genes e contém 14 genes (*mxqFJGIRSACKLDEHB*) (MmSR116_5092; MmSR116_5091; MmSR116_5090, MmSR116_5089; MmSR116_5088; MmSR116_5087; MmSR116_5086; MmSR116_5085; MmSR116_5084; MmSR116_5083; MmSR116_5082; MmSR116_5081;

MmSR116_5080; MmSR116_5079) que são responsáveis pela codificação dos polipeptídeos estruturais da metanol desidrogenase (CHISTOSERDOVA et al., 2003) (Figura 1.2). Kwak et al. (2014) avaliaram a presença de genes envolvidos no metabolismo do metanol em linhagens isoladas de plantas e de outros ambientes e foi verificado que a maioria das espécies de *Methylobacterium* avaliadas compartilham genes envolvidos com a oxidação de metanol, exceto a linhagem *M. extorquens* BJ006 que não possui o gene *pqqA*.

Inúmeros projetos utilizando métodos moleculares de manipulação genética de genes relacionados ao metabolismo metilotrófico tem sido realizados a fim de melhorar a produção de compostos de interesse biotecnológico. Um exemplo, deste tipo de estudo foi a construção da linhagem *Methylobacterium* sp. MB200 capaz de super expressar o gene que codifica uma hidroxipiruvato redutase utilizando metanol como fonte de energia, o que resultou no acúmulo de glioxilato, um composto comercialmente importante na fabricação de perfumes, drogas e pesticidas (SHEN; WU, 2007). Assim como a linhagem de *Methylobacterium extorquens* ATCC 55.366, estudada para a produção de biopolíester pertencente a família de Polihidroxialcanoato (PHA) (ORITA et al., 2014).

Portanto, a utilização de metanol como fonte de carbono, além de ser uma vantagem adaptativa para a bactéria durante a colonização de diferentes ambientes, em especial, plantas, pode também resultar em produtos biotecnológicos com alto valor agregado.

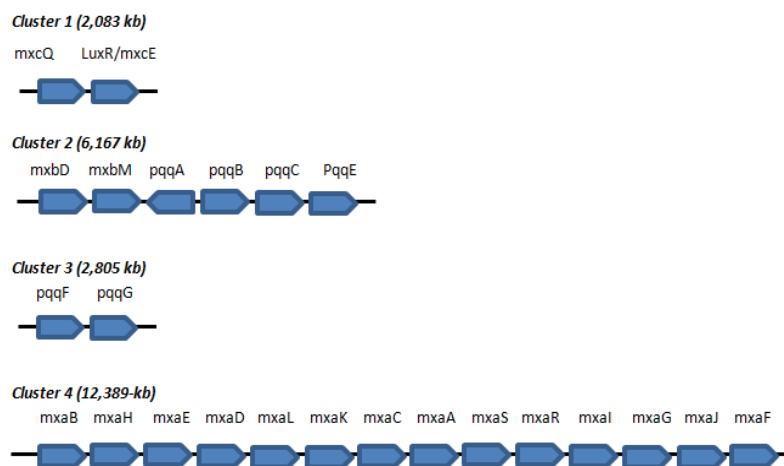


Figura 1.2. Organização de genes da via de oxidação primária de metanol de *M. mesophilicum* SR1.6/6, obtida pelo software Artemis (RUTHERFORD et al., 2000) - **A)** Gene *mxcQ* codifica um regulador quinase e pode estar envolvido da regulação da expressão de *mxbDM* e *luxR/mxcE* codifica para um regulador de dois componentes da família transcricional LuxR I, que responde a quorum sensing; **B)** Gene *pqqF* e *pqqG* estão envolvidos com a biossíntese de pirroloquinolina quinona porém ocorre em módulos metabólicos separados dos demais genes (*pqqACE*) podendo participar como co-fator de outra desidrogenase em *M. extorquens* AM1; **C)** Gene *mxbD* e *mxbM* estão envolvidos com a regulação do gene *mxAF*, genes *pqqA*, *pqqB*, *pqqC* e *pqqE* estão envolvidos com a biossíntese de pirroloquinolina quinona; **D)** Gene *mxAB* também codifica para dois componentes da família transcricional LuxR I, que responde a *quorum sensing*, no geral este cluster contém 14 genes que são responsáveis pela codificação dos polipeptídeos estruturais da metanol desidrogenase.

1.4.2.1.2 Genes de polihidroxicanoato (PHA) em SR1.6/6

Polihidroxicanoato (PHA) é uma família de poliéster biodegradável que pode ser acumulado no interior das células de algumas bactérias em forma de grânulos de carbono servindo como reserva energética. Este tipo de poliéster tem atraído grande interesse industrial (ANDERSON; DAWES, 1990), o ácido poli-3-hidroxi-butírico (P3HB) é o PHA mais estudado para a produção de bioplástico (STEINBUCHER, 1991). Na década de 1980, um isolado de espécie não identificada de *Methylobacterium* foi selecionada para participar da produção de P3HB a partir de metanol pela indústria *Imperial Chemical Industries* (ICI) (BYROM, 1987). Entretanto, devido à baixa produção de P3HB e com baixo peso molecular, este isolado de *Methylobacterium* foi desconsiderado para a produção naquele momento (BYROM, 1987). Porém, outros estudos continuaram a ser realizados, a fim de, melhorar os processos de produção de PHA por *Methylobacterium* spp. (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013; SUZUKI et al., 1986, 1988). Portanto, o gênero de *Methylobacterium* continua sendo uma alternativa para a produção de P3HB a partir de metanol. P3HB é sintetizado a partir de acetil-CoA em três passos enzimáticos catalizados pelas enzimas beta-ketotiolase (PhaA), acetoacetyl-CoA redutase NADPH dependente (PhaB) e PHA sintase (PhaC). Atualmente, o organismo modelo para a produção de PHA é a bactéria *Ralstonia eutropha* (REINECKE; STEINBUCHER, 2009). Desta forma, alguns genes envolvidos nesta síntese foram utilizados para um estudo de genes ortólogos em espécies de *Methylobacterium*, como os genes: *phaA*, *phaB*, *phaC* e *phaR*. O cluster *phaR-phaAB* é encontrado no genoma de todas as espécies de *Methylobacterium* estudadas incluindo a linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum* (MmSR116_2499; MmSR116_2500, MmSR116_2501).

O gene ortólogo putativo *phaC* foi detectado no genoma das linhagens de *M. nodulans* ORS 2060, *Methylobacterium* sp. 4-46, *M. radiotolerans* JCM 2831, *M. oryzae* CBMB200, *M. populi* BJ001, *M. extorquens* PA1, *M. extorquens* CM4 e *M. mesophilicum* SR1.6/6, sendo nesta última linhagem localizado no contig 5 (MmSR116_1934). A árvore filogenética das espécies estudadas baseada no gene *phaC* é semelhante a análise realizada com o gene ribossomal rDNA 16S (YEZZA et al., 2006) (Figura 1.3).

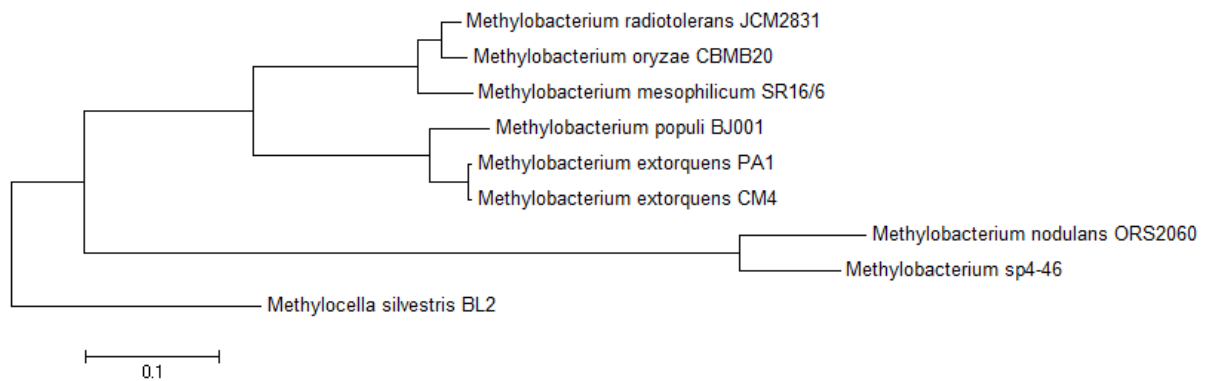


Figura 1.3.- Árvore filogenética de *Methylobacterium* spp. baseada na sequência de proteína codificada pelo gene *phaC* alinhadas por MUSCLE com parâmetro neighbor-joining utilizando o programa MEGA 6. *Methylocella silvestris* BL2 foi utilizada como grupo externo.

Os compostos copolímero poli-3-hidroxi-butilato-co-3-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV) aumentam o potencial de aplicações de PHA como bioplásticos uma vez que, pode ser alcançada uma ampla gama de propriedades termo-mecânicas (SILVA et al., 2000). Em *Ralstonia eutropha*, a síntese de monômeros 3HV a partir de acetil-CoA e propionil-CoA é catalisada por beta-ketotiolase, chamada BktB (SLATER et al., 1998). *M. extorquens* é capaz de produzir P3HB-co-3HV utilizando ácido valérico, álcool amílico e de forma menos eficiente, ácido propiônico, como co-substrato (HAYWOOD et al., 1989; KHOSRAVIDARANI et al., 2013; UEDA et al., 1992). A sequência do gene *bktB* de *R. eutropha* foi utilizada como base para identificar genes ortólogos putativos em *M. mesophilicum* SR1.6/6, e foi encontrado no contig 04 (MmSR116_1750). O gene *phaA* assim como o gene *bktB* codifica beta-ketotiolases.

Como PHA são compostos de carbono que geram energia, as células bacterianas capazes de produzir estes polímeros devem também ser capazes de mobilizá-los quando necessário. A degradação intracelular de P3HB envolve despolimerases P3HB intracelulares bem como 3HB oligômeros hidrolases (JENDROSSEK, 2007). Tem sido descrita a existência de duas classes de P3HB despolimerases intracelular (*phaZa* and *phaZd*). Em *R. eutropha* existem sete P3HB despolimerases intracelular (codificada por *phaZa1-5*, *phaZd1* e *phaZd2*) e também duas 3HB oligômeros hidrolases (codificada por *phaY1* and *phaY2*). Os genomas das linhagens de *M. extorquens* possui três despolimerases P3HB putativas de classe *phaZa* e três de classe *phaZd*, porém não possuem genes 3HB-oligômeros hidrolases (*phaY*), estas foram somente encontradas em *Methylobacterium* sp. 4-46 e *M. radiotolerans* JCM2831.

No genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi detectado a presença de genes envolvidos com a mobilização de P3HB como gene codificador de P3HB despolimerases intracelular da classe *phaZa* (MmSR116_1769; MmSR116_3329; MmSR116_4102). Os genes que codificam despolimerases P3HB intracelulares putativos da classe *phaZd* também foram detectados (MmSR116_3424; MmSR116_4522), sugerindo a possibilidade de que os genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 codificam de fato P3HB despolimerases extracelular. Não foram detectados genes que codificam 3HB oligomeros hidrolases similares a PhaY1. Entretanto, um gene putativo codificador de 3HB oligomeros hidrolases similar a PhaY2 (MmSR116_1744) foi observado no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6. Korotkova e Lindstrom (2001) analisaram mutantes do gene *pha* e sugeriram que pode haver uma conexão entre a biossíntese de PHA e o metabolismo de compostos C1 e C2. Portanto, a mobilização de genes P3HB poderia ser tão importante quanto o metabolismo de metanol.

Outro grupo proteico relevante para o acúmulo de P3HB é a PHAsin, que são proteínas pequenas, anfifílicas e são encontradas na superfície dos grânulos P3HB (PFEIFFER; JENDROSSEK, 2012). Em *R. eutropha*, sete PHAsin putativas foram detectadas (PÖTTER et al., 2004; PFEIFFER; JENDROSSEK, 2011; PFEIFFER; JENDROSSEK, 2012; WIECZOREK et al., 1995;), onde a mais importante é a PhaP1. O nocaute do gene *phaP1* levou a redução do conteúdo de P3HB dentro das células bacterianas (WIECZOREK et al., 1995), visto que o número e o tamanho dos grânulos de P3HB são determinados pelo nível de expressão de *phaP1* (WIECZOREK et al., 1995). Mesmo utilizando diferentes genes de *phaP* de *R. eutropha* como base, não foi possível identificar claramente genes ortólogos putativos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 e também em nenhuma das espécies de *Methylobacterium* avaliadas.

1.4.2.1.3 Fagos e transposons

Uma das principais vantagens evolutivas presentes em bactérias é a transferência horizontal de genes, que conferem resistência a antibióticos, metais pesados dentre outras vantagens ambientais. Alguns desses genes podem estar presentes em transposons, que podem mudar de posição dentro do genoma, podendo estar contidos no cromossomo, profagos e em plasmídeos, permitindo a transferência deste gene para outros organismos. Vuilleumier et al. (2009) demonstraram que existe variação no número de elementos de inserção - IS, em duas diferentes linhagens de *M. extorquens* (AM1 e DM4), sugerindo que os rearranjos genômicos

e a transferência horizontal de genes são mais frequentemente associados com os IS, o que representa o principal mecanismo da evolução de *Methylobacterium*, associado principalmente a genes envolvidos com a disponibilização de nutrientes.

O genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresentou 10 ilhas genômicas, representando 1,24% do genoma total. Nestas ilhas genômicas foi possível identificar 17 genes relacionados com transposase, incluindo quatro genes da família IS3 (MmSR116_0129, MmSR116_0136, MmSR116_0140, MmSR116_2083), cinco genes da família IS5 (MmSR116_0132, MmSR116_0866, MmSR116_0867, MmSR116_4732, MmSR116_4733), três genes da família IS256 (MmSR116_1472, MmSR116_2948, MmSR116_2949), dois genes da família IS66 (MmSR116_3911, MmSR116_3912), um gene da família IS1182 (MmSR116_2217), um gene da família IS630 (MmSR116_2337) e um gene da família ISL3 (MmSR116_5106). Destes, podem ser destacados os representantes da família IS5 e IS3 que representam mais de 90% de similaridade com uma transposase, denominada ISMex32 e ISMch2, encontradas em *M. extorquens* AM1 e *M. chloromethanicum* CM4, respectivamente. Futuramente, pode ser verificada a possibilidade de ocorrência de transferência horizontal de genes, já que esta transposase está contida em um plasmídeo (pMCHL01) em *M. chloromethanicum* CM4, o que possibilitaria a transferência deste transposon para o cromossomo de *M. mesophilicum* SR1.6/6.

Foram identificadas no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 sequências com similaridade a profago. Foi encontrado uma região de um profago incompleto no contig 6, contendo 9 genes na região (430324-448498pb) anotadas como proteínas hipotéticas.

1.4.3 ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE

O gênero *Methylobacterium* é descrito por sua plasticidade fenotípica, que confere a estas bactérias a capacidade de colonizar diferentes nichos ecológicos, e interagir com hospedeiros, adaptando-se em diferentes ambientes. Como descrito anteriormente, algumas características do metabolismo de *M. mesophilicum* SR1.6/6 podem conferir vantagens adaptativas no ambiente. Entre estas características, pode ser citada a utilização de composto C1 como fonte de energia, o acúmulo de grânulos energéticos (PHA) no interior de suas células e os elementos de transposição. A linhagem SR1.6/6 possui ainda, outras importantes características em sua membrana, o que permite uma colonização eficiente em diferentes ambientes.

1.4.3.1 Biossíntese de hopanóides

Hopanóides são lipídios de membrana bacteriana, que podem proteger as células em ambientes adversos, pois, aumenta a estabilidade e a permeabilidade da membrana bacteriana e confere resistência a condições de estresse incluindo pH, temperatura, exposição a detergentes e antibióticos (WELANDER et al., 2009,2012; MALOTT et al., 2012). Moléculas de hopanóides, podem ainda, estarem associada com a interação bactéria-planta (LÓPES-LARA et al., 2003). No presente trabalho, foram encontrados genes de biossíntese de hopanóides em *M. mesophilicum* SR1.6/6, (MmSR116_0117, MmSR116_1891, MmSR116_0118, MmSR116_0119, MmSR116_0120, MmSR116_0121, MmSR116_0122, MmSR116_5719, MmSR116_3697, MmSR116_3698, MmSR116_5723, MmSR116_3695, MmSR116_5721) (Tabela 1.2) e a organização deste cluster é bastante semelhante ao descrito para *M. extorquens* AM1 (WELANDER et al., 2012) (Figura 1.4).

Algumas espécies bacterianas são capazes de produzir moléculas de hopanóides, e bactérias do gênero *Methylobacterium* estão incluídas neste grupo (BRADLEY et al., 2010; WELANDER et al., 2012). A linhagem SR1.6/6 apresentam genes de biossíntese de hopanóides e esses genes tem sido alvo de estudos, pois, podem estar associadas ao processo de adaptação entre a bactéria e a planta hospedeira. LÓPES-LARA et al. (2003) sugerem que os hopanóides podem estar envolvidos com a adaptação de bactérias em ambiente micro aeróbicos e quando há queda do valor do pH no meio de cultura, hipótese também sugerida na ecologia de *Frankia* sp. onde foi observada diferença na expressão de genes de hopanóides em diferentes condições de adaptação ambiental (NALIN et al., 2000). Mais estudos são necessários envolvendo estas moléculas e a habilidade de SR1.6/6 em colonizar a planta hospedeira, desta forma um estudo de expressão gênica foi realizado no capítulo 2.

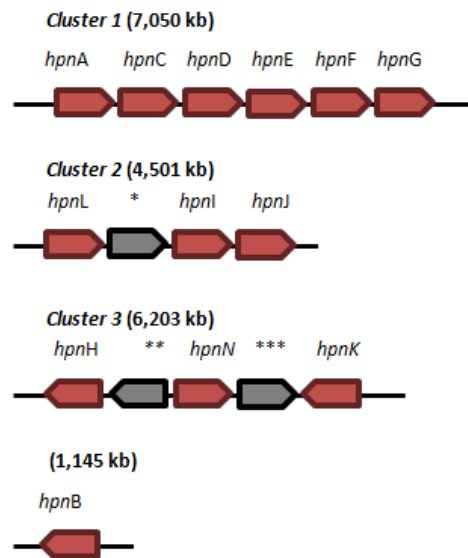


Figura 1.4 - Organização estrutural dos genes que codificam a biossíntese de hopanóides em *M. mesophilicum* SR1.6/6 obtida pelo software *Artemis* (RUTHERFORD et al., 2000). *proteína tolerante a tolueno; **proteína hipotética; ***regulador transcricional da família MarR.

Tabela 1.2 - Genes da via de Biossíntese de hopanóides anotados no genoma de SR1.6/6.

Síntese de hopanóides			
Locus Tag	Gene	Função	Contig
MmSR116_0117	hpnA	hopanoid-associated sugar epimerase	2
MmSR116_1891	hpnB	Glycosyl transferase	5
MmSR116_0118	hpnC	squalene synthase	2
MmSR116_0119	hpnD	squalene synthase	2
MmSR116_0120	hpnE	squalene-associated FAD-dependent desaturase	2
MmSR116_0121	hpnF	squalene-hopene cyclase	2
MmSR116_0122	hpnG	Hopanoid-associated phosphorylase	2
MmSR116_5719	hpnH	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnH	26
MmSR116_3697	hpnI	hopanoid biosynthesis associated glycosyl transferase protein HpnI	9
MmSR116_3698	hpnJ	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnJ	9
MmSR116_5723	hpnK	hopanoid biosynthesis associated protein HpnK -	26
MmSR116_3695	hpnL	Conserved hypothetical protein, possibly involved in side chain formation	9
MmSR116_5721	hpnN	hopanoid biosynthesis associated RND transporter like protein HpnN	26

* hpnF é também denominado de gene shc

1.4.3.2 Estresse oxidativo

O primeiro estágio da interação entre bactéria e planta é o reconhecimento, seguido da adaptação. Normalmente os exsudatos das plantas não são considerados um estresse para a bactéria, entretanto, peróxido de hidrogênio, produto do estresse durante o reconhecimento do microrganismo pela planta, pode desencadear uma transdução de sinais nas bactérias. Uma análise proteômica analisou a interação entre *M. extorquens* (colonizando a filosfera da folha) e *Arabidopsis thaliana* (planta modelo) e foi observado a super expressão de proteínas do sistema antioxidante, ressaltando o aumento da expressão do regulador PhyR, que regula a transcrição de enzimas antioxidantes, que é um fator importante na colonização da filosfera da folha. O papel deste regulador foi confirmado por meio da sua deleção, resultando em mutantes com deficiência na colonização de plantas, mostrando que PhyR é um regulador chave para a adaptação epifítica de *M. extorquens* (GOURION et al., 2006). Esses resultados foram também confirmados por meio da análise de transcrito, mostrando que o gene codificador de PhyR também é regulado em interações proteína-proteína, a qual é diferente de outros reguladores de estresse bem conhecidos, como por exemplo, σ^S and σ^B , sugerindo que Alphaproteobacteria possui um outro mecanismo de resposta a stress (FRANCES-CHARLOT et al., 2009). *M. mesophilicum* SR1.6/6 possui o gene codificador de PhyR (MmSR166_1871), podendo também estar envolvido na interação desta bactéria endofítica com a planta hospedeira.

Análises “Omics” revelam a importância do sistema antioxidante durante a interação bactéria-planta. A primeira linha de defesa do sistema antioxidante é a enzima superóxido dismutase, dismutando o radical superóxido (O_2^-) gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 . Este sistema é encontrado em organismos aeróbicos e aeróbicos facultativos (ALSCHER et al., 1997; MCCORD; FRIDOVICH, 1969). Super óxido dismutase (SODs) podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com os seus cofatores: manganês (Mn) SOD-A, ferro (Fe) SOD-B, cobre/zinco (Cu/Zn) SOD-C e níquel (Ni) SOD. No genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foram encontrados dois genes superóxido dismutase, um que codifica FeSOD citoplasmático (MmSR166_3074) e outro que codifica Cu/ZnSOD periplasmático (MmSR166_5119), semelhante a *M. oryzae* CBMB20 (KWAK et al., 2014).

O peróxido de hidrogênio (produto da atividade de SOD), assim como espécies reativas de oxigênio (ERO) gerados em outros processos celulares, como na respiração, são eliminado por peroxidases. Foram encontrados 12 genes que codificam para catalase no genoma de SR1.6/6 (MmSR166_1546, MmSR166_2273, MmSR166_3487, MmSR166_3610,

MmSR166_3903, MmSR166_3904, MmSR166_3977, MmSR166_3978, MmSR166_4261, MmSR166_4742, MmSR166_5222, MmSR166_5901), em diferentes *contigs*, e genes de peroxidases, sendo dois *gpx* (MmSR166_3179; MmSR166_5471) que codificam glutathione peroxidase, semelhante a *M. oryzae* CBMB20 (KWAK et al., 2014). Também foi anotado um gene que codifica uma glutathione sintase (GSH) (MmSR166_3592), a qual é responsável pela principal desintoxicação celular após a exposição a diferentes estresses. Esta GSH está associada ao estresse a cádmio em *E. coli* (MASIP et al., 2006) e em *Candida tropicalis* 2222 (REHMAN; ANJUM, 2011), assim como, herbicidas acetocloro e metolaclo em linhagens de *Enterobacter* sp. (MARTINS et al., 2014) e ametrina e clomazona em *Pseudomonas* sp. (PETERS et al., 2014).

A glutathione redutase além de estar relacionada com a detoxificação de moléculas tóxicas, é também responsável pela eliminação de EROs (principalmente radical superóxido O_2^- e peróxido de hidrogenio H_2O_2) (SCRUTTON et al., 1987), esse compostos reativos oxidam a glutathione, inativando essas moléculas. Glutathione redutase é a enzima que reduz a glutathione oxidada (GSSG) à GSH, usando NADPH (GRATÃO et al., 2005b). Semelhante ao genoma de *M. oryzae* CBMB20 (KWAK et al., 2014) em *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi observada somente uma glutathione-dissulfeto redutase (MmSR166_1589).

Existem funções redundantes no sistema tiol-redox, em que o mesmo processo pode ser realizado por diferentes enzimas (RITZ et al., 2001), por exemplo, tioredoxina e glutathione podem apresentar função redox semelhantes. Tiorredoxina redutase catalisa a redução de tioredoxina dependente de NADPH (TUGGLE et al., 1985). No genoma da SR1.6/6 foram observados oito genes relacionados a tioredoxinas (MmSR166_0155, MmSR166_0308, MmSR166_0320, MmSR166_0643, MmSR166_1089, MmSR166_1790, MmSR166_2191, MmSR166_5486), onde MmSR166_0155 é a tioredoxina redutase.

Outra importante enzima envolvida no estresse oxidativo é a glutathione S-transferase, que usa GSH como doador de tiol e catalisa grupos de glutathione eletrofílica em diferentes compostos tóxicos hidrofóbicos (ALLOCATI et al., 2008; DIXON et al., 2002). A enzima GST é responsável por detoxificação de compostos xenobióticos, toxinas, metabólitos secundários, incluindo flavonóides e herbicidas (GHELFI et al., 2011). Olchanheski et al. (2014) mostraram que a presença de mesotrione um herbicida inibidor de 4-hidroxi-fenilpiruvato dioxigenase - HPPD, necessário para a biossíntese de carotenoides e pode aumentar a atividade de GST. Esta GST pode apresentar diversas funções, algumas ainda não descritas, indicando que ainda há um grande potencial ainda não estudado para a sua

compreensão e aplicações futuras (VUILLEUMIER; PAGNI, 2002). No genoma de SR1.6/6 foram descritos 16 genes que codificam o domínio GST proteico ou GST putativo (MmSR166_0230, MmSR166_0475, MmSR166_0480, MmSR166_0532, MmSR166_0735, MmSR166_0875, MmSR166_1252, MmSR166_1854, MmSR166_2718, MmSR166_2774, MmSR166_2813, MmSR166_2924, MmSR166_3066, MmSR166_3872, MmSR166_4044, MmSR166_4619).

Outro grupo de compostos relacionado com o estresse oxidativo é o carotenóide o qual confere a cor rósea de *Methylobacterium*, e que protege os microrganismos contra estresse foto-oxidativo, principalmente em bactéria fotossintética (VAN DIEN et al., 2003). A fitoeno sintase é responsável pela biossíntese de carotenoides, sendo observado 5 fitoeno sintase (3 *crtI* genes: MmSR116_0829, MmSR116_1893, MmSR116_1900; 1 *ctrB* MmSR116_0828 e 1 *ctrD* MmSR116_0811) no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6. A presente análise demonstrou que SR1.6/6 apresenta um arsenal genético envolvido à resposta ao estresse oxidativo, o que pode conferir melhor adaptação a diferentes ambientes, incluindo as plantas hospedeiras.

1.4.4 SR1.6/6 E A PLANTA HOSPEDEIRA

A linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum* tem sido descrita por ser capaz de colonizar diferentes espécies de plantas (OMER, et al., 2004), evidenciando sua habilidade durante a adaptação em diferentes ambientes, especialmente, aqueles associados às plantas. Alguns aspectos do genoma de SR1.6/6 serão discutidos adiante, a fim de entender o sucesso de colonização desta linhagem, descrevendo alguns sistemas favoráveis as bactérias, o que pode ser essencial na adaptação a plantas hospedeiras.

1.4.4.1 O sistema *quorum sensing* (QS)

Bactérias podem produzir moléculas sinalizadoras QS, um mecanismo de comunicação bacteriana que pode influenciar a organização de comunidades microbianas (CAMILLI; BASSLER, 2006), a formação de biofilme (ANBAZHAGAN et al., 2013) e a interação entre a bactéria e a planta hospedeira (ZÚÑIGA et al., 2013). *M. mesophilicum* SR1.6/6 possui três genes que codificam para uma monooxigenase similar a luciferase (MmSR116_3827, MmSR116_4453, MmSR116_5854), e 11 genes que codificam para reguladores transcricionais da família LuxR (MmSR116_1076, MmSR116_1130,

MmSR116_1284, MmSR116_2120, MmSR116_2704, MmSR116_2993, MmSR116_3937, MmSR116_4112, MmSR116_5079, MmSR116_5888).

Assim como foi descrito para o genoma de *M. oryzae* CBMB20 (KWAK et al., 2014) a linhagem SR1.6/6 também possui genes que codificam para enzimas modificadores de homoserina: O-acetilhomoserine (MmSR116_5807) e O-succinilhomoserina (MmSR116_5195). Adicionalmente Pomini et al. (2009) caracterizou seis diferentes homoserinas-acil-lactona (HSLs) em SR1.6/6: homólogos saturados (S)-N-dodecanoil-HSL e (S)-N-tetradecanoil-HSL, uma cadeia incomum N-tridecanoil-HSL, um novo produto natural (S)-N-(2E)-dodecenoil-HSL, e os homólogos insaturados (S)-N-(7Z)-tetradecenoil e (S)-N-(2E,7Z)-tetradecadienil-HSL. Portanto, este sistema QS pode estar diretamente envolvido com o sucesso de colonização de plantas por SR1.6/6 e a sua resposta durante a interação com a planta e com outras bactérias.

1.4.4.2 Sistema de secreção

Durante o reconhecimento e a adaptação da bactéria na planta, alguns sinais são secretados para estabelecer a interação. Os sistemas de Secreção Sec-dependentes (*General Secretory Pathway*) constitui a maior via de exportação ou integração de proteínas para a membrana interna, espaço periplasmático, membrana externa ou mesmo para o meio externo em bactérias Gram-negativas (PEDROSA et al 2011; TSENG et al 2009). A secreção de proteínas desempenha um papel central nas interações bacterianas e, até o momento, seis tipos de sistemas de secreção de proteínas foram descritos para bactérias Gram negativas (TSENG et al., 2009).

O complexo 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, uma ATPase associada que fornece energia ao sistema. Além de proteínas auxiliares SecD, SecF e YajC e uma chaperona SecB (COLLINSON et al., 2001; COOPER et al., 2008; PUGSLEY, 1993).

Este sistema pode modular as interações de bactérias em diferentes ambientes. Em bactérias não patogênicas, como *M. mesophilicum* SR1.6/6, o sistema de secreção pode estar envolvido com o reconhecimento bactéria-planta, pois um grande número de proteínas secretadas são destinados a entrar na célula hospedeira (efetores e toxinas), e, assim, vários sistemas de secreção incluem aparelhos para translocar proteínas através da membrana

plasmática do hospedeiro, e desta maneira podem modificar a fisiologia do hospedeiro e promover a colonização (PEDROSA et al., 2011; TSENG et al., 2009).

Bendtsein et al. (2005) analisaram um grande número de genomas bacterianos e indicou que até 17% dos genes podem codificar para proteínas com sequências sinais para a via geral de secreção (GPS). O genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 possui uma ampla gama de genes associados com GPS, incluindo genes do tipo de secreção tipo I, II, V e VI (T1SS, T2SS, T5SS e T6SS respectivamente) e não possui genes do tipo III e IV (T3SS, T4SS). Em bactérias Gram-negativas o sistema de secreção de algumas proteínas ocorre da membrana interna e externa por um único passo via Tipo I, Tipo III, Tipo IV ou Tipo VI (TSENG et al., 2009), enquanto outras proteínas são primeiramente exportadas para o espaço periplásmico via sistema Sec ou transport Tat e em seguida transportadas para a membrana externa por meio do Tipo II, Tipo V ou menos comum, via tipo I e tipo IV (TSENG et al., 2009).

Foram encontrados genes associados a sistemas de secreção (tipo I, II, V e VI), este sistema pode ser classificado como, Sec-dependente: Tipo II – T2SS (MmSR116_5674; MmSR116_5672), Tipo V – complexo SecYEG; SecY (MmSR116_4396), SecE (MmSR116_5144) e SecG (MmSR116_0449), uma proteína SecA (MmSR116_4131), proteínas auxiliares SecD (MmSR116_5750), SecF (MmSR116_5749) e YajC (MmSR116_5751), uma chaperona SecB (MmSR116_5322), e dois genes patatin (MmSR116_3150; MmSR166_3177), estes dois genes são descritos por fazer parte do sistema de secreção do tipo Vd, ainda pouco estudado, que pode estar relacionado com interações ambientais (LEO et al., 2012). O genoma SR1.6/6 também possui gene do Sec-independente: Tipo I – transportador ABC de região transmembrana (MmSR116_2912) e TolC (MmSR116_0126), Tipo VI – T6SS (MmSR116_5301; MmSR116_2954). Foram encontrados um sistema de transporte TatB (MmSR116_0755) e TatC (MmSR116_0754), (MmSR116_0754), AcrA (MmSR116_3047) e AcrB (MmSR116_0771; MmSR116_1241; MmSR116_1610; MmSR116_1964; MmSR116_2358; MmSR116_3113).

Em *E. coli* foi descrito que ocorre uma interação entre os componentes de transporte AcrA/B e o componente TolC para a expulsão de uma série de compostos tóxicos à célula como corantes, antibióticos e solventes orgânicos (TIKHONOVA; ZGURSKAYA, 2004). Este sistema de efluxo AcrA/B da família RNA, não foram encontrados nas outras linhagens de *Methylobacterium* avaliadas.

O sistema de secreção do Tipo I é utilizado para exportar proteínas (geralmente proteases) em ambas as membranas (interna e externa) para o meio extracelular (Delepelaire

et al. 2004). No genoma da SR1.6/6, T1SS é composto pela família de proteína PrtD (MmSR116_2912), parte do sistema ABC e TolC (MmSR116_0126). O mecanismo de secreção de tipo I foi bastante estudado em grande detalhe com base em α -hemolisina (HlyA) encontrada em alguns *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) (THANABALU et al., 1998, Schmitt et al., 2003, Koronakis et al., 2000). Este sistema é conservado em bactérias endófitas, bem como no gênero *Methylobacterium*, sendo encontrado em todas as linhagens analisadas (*M. chloromethanicum* CM4, *M. extorquens* AM1, DM4, PA1, *M. radiotolerans* JCM2831, *M. oryzae* CBMB20, *M. nodulans* ORS2060). No sistema de secreção de tipo I a proteína excretada é levada para o meio externo por um translocador constituído por proteínas que abrangem o envelope da célula. Nos sistemas do Tipo II, IV, VI existe uma unidade de translocação, semelhante uma agulha, que permite a injeção direta de proteínas no citoplasma de células hospedeiras (VEENENDAAL ET AL. 2007).

Não foram encontrados genes homólogos ao sistema de secreção do Tipo III (T3SS) no genoma SR1.6/6. Este sistema está presente em bactérias Gram-negativas patogênicas de animais e plantas, mas também já foi descrito em bactérias simbióticas, saprófitas e associativas (SCHIMIDT et al. 2012). O T3SS consiste de um aparelho que proporciona a secreção de uma série de proteínas efetoras (GRANT et al., 2006). As proteínas efetoras manipulam e controlam o metabolismo da célula hospedeira para a vantagem do agente patogênico e pode reprimir os mecanismos de defesa.

Foi observado também a ausência do tipo VI - T6SS em linhagens de *Methylobacterium*, entretanto, no genoma de SR1.6/6 foi encontrado dois genes deste sistema: um gene pertencente a família ClpV1 (MmSR116_5301) e outro um relacionado a um gene pertencente a família ClpV1 (MmSR116_5301) e o outro pertencente a família HCP1 (MmSR116_2954). Os membros da família ClpV1 são homólogos a ClpB, uma ATPase associada com as funções relacionadas com chaperonas. Estes homólogos ClpB são relacionados com patogenicidade bacteriana, a família HCP1 inclui HCP1 (proteína hemolisina) envolvida com virulência. Este sistema, embora esteja descrito por estarem envolvidos com patogenicidade e virulência, tem sido encontrado em bactérias endofíticas e foi representado em um estudo de metagenoma de endófitos isolados da raiz de arroz (SESSITSCH et al., 2012), indicando que pode desempenhar um papel benéfico na interação com o hospedeiro. Um outro estudo verificou que, aproximadamente 25% de todas as bactérias Gram-negativas sequenciadas e analisadas dos gêneros *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, tem genes codificadores do sistema T6SS (BOYER et al., 2009). Este sistema

de secreção também já foi associado com a colonização das raízes por bactérias fixadoras de nitrogênio e formação de biofilme (TSENG et al., 2009).

A importância do sistema de secreção de proteínas em bactérias patogênicas assim como em bactérias em associação com plantas, especialmente, T3SS, T4SS e T6SS tem sido descrito (TSENG et al., 2009), entretanto, outros sistemas também desempenham importantes funções na interação. Bactérias Gram-negativas utilizam o sistema de secreção do Tipo II para o transporte de um grande número de proteínas secretadas do periplasma para o meio extracelular, este sistema tem sido encontrado em muitos genomas sequenciados de bactérias associadas com plantas, muitas das proteínas secretadas pelo Tipo II - T2SS são, por exemplo, fatores de virulência (Johnson et al. 2006), toxinas, proteases, celulasas e lipases (TRUJILLO et al. 2014).

Desta forma, por meio de sinais moleculares a bactéria pode perceber sinais químicos liberados pelas plantas (exsudatos) e outras bactérias (moléculas QS) e assim se comunicar com outros organismos. Por meio desta maquinaria diversa, interagir com organismos presentes nos diferentes ambientes, auxiliando, por exemplo, na colonização de plantas.

1.4.4.3 Proteção contra patógenos

Os micro-organismos endofíticos de uma forma geral podem proteger plantas hospedeiras contra estresse biótico e abiótico por meio da indução de resistência sistêmica, produção de compostos antimicrobianos e competição por nutrientes.

1.4.4.3.1 Metabólitos secundários e compostos antimicrobianos

Lacava et al. (2004) descreveram que *M. mesophilicum* SR1.6/6 é capaz de inibir *in vitro* *Xylella fastidiosa*. Entretanto, o mecanismo envolvido neste processo ainda não foi elucidado. O genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 possui genes envolvidos com a síntese de compostos antimicrobianos tais como o gene *ubiA* (MmSR116_0976) que codifica para 4-hidroxibenzoato polipreniltransferase, também identificado no genoma de *M. oryzae* CBMB20, composto este, associado com a síntese de moléculas com atividade antimicrobiana (KWAK et al., 2014).

Com a utilização do software *Antismash* foi verificado a presença de *clusters* relacionados à síntese de metabólitos secundários. No *contig* 02 foi encontrado um cluster relacionado com a biossíntese de terpenos, um metabólito secundário bastante descrito por possuir atividade antimicrobiana (TOGAASHI et al., 2008), faz parte deste *cluster*, genes que

codificam uma carboxil-muconolactona descarboxilase putativa (MmSR116_0105), cadeia curta desidrogenase/reductase SDR (MmSR116_0106), 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (MmSR116_0116), alguns genes também relacionados com a biossíntese de hopanóides, descrito anteriormente no item (1.4.3.2.1) também fazem parte deste custer biossintético, tais como hopanoide associado ao açúcar epimerase (MmSR116_0117), esqualeno sintase (MmSR116_0118), esqualeno sintase (MmSR116_0119), esqualeno associado desnaturase FAD-dependente (MmSR116_0120), esqualeno hopano ciclase (MmSR116_0121), e um gene regulador pertencente a família TolC secreção tipo I (MmSR116_0126) (Figura 1.5).

No *contig* 05 foi encontrado um *cluster* de biossíntese de compostos da família linaridina (Figura 1.6), este cluster foi recentemente estudado por meio da bioinformática e foi proposto que compostos da família linaridina podem apresentar atividade antimicrobiana (CLAESEN et al., 2010). Segundo análise *Antismash* este *cluster* é composto por três genes reguladores: RNA polimerase, sigma subunidade 24 (MmSR116_1871), regulador transcricional (MmSR116_1876) e proteína *cold-shock* contendo o domínio de ligação com DNA (MmSR116_1885), oito genes biossintéticos: proteína transportadora de acil (MmSR116_1882), Beta-hidroxiacil-(proteína transportadora de acil) desidratase FabA/FabZ (MmSR116_1883), Beta-cetoacil sintase (MmSR116_1884), N-acetiltransferase – (MmSR116_1888), poliprenol-monofosfomanose sintase (MmSR116_1891), aciltransferase (MmSR116_1892), desidrogenase (MmSR116_1893), carbamoil fosfato sintase (MmSR116_1894), e dois genes relacionados ao transporte: ABC-2 transporte (MmSR116_1897) e proteína carreadora de ATP do transportador ABC (MmSR116_1898). Estes *clusters* devem ser melhores estudados, quanto à utilização destes metabólitos secundários para a inibição de patógenos.



Figura 1.5 - *Cluster* terpeno proposto pelo software *Antismash*: carboxilmuconolactona descarboxilase putativo - MmSR116_0105; B) pequena cadeia desidrogenase/reductase SDR - MmSR116_0106; C) 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase - MmSR116_0116; D) açúcar epimerase associado com hopanóide - MmSR116_0117; E) esqualeno sintase - MmSR116_0118; F) esqualeno sintase - MmSR116_0119; G) esqualeno associado a FAD-dependente desnaturase - MmSR116_0120; H) esqualeno hopano ciclase - MmSR116_0121; I) TolC família do tipo I do sistema de secreção - MmSR116_0126.



Figura 1.6 - Cluster Linaridina proposto pelo software *Antismash*: A) RNA polymerase, sigma 24 subunit; B) regulador transcricional; C) proteína acil carreadora - MmSR116_1882; D) Beta-hidroxiacil-(proteína acil carreadora) desidratase FabA/FabZ - MmSR116_1883; E) Beta-ketoacil sintase - MmSR116_1884; F) cipepicina – que não foi anotado no genoma de SR1.6/6; G) *cold-shock* DNA- com domínio proteico - MmSR116_1885; H) N-acetiltransferase - MmSR116_1888; I) poliprenol-monofosfomanose sintase - MmSR116_1891; aciltransferase - MmSR116_1892; J) desidrogenase - MmSR116_1893; L) pequena subunidade carbamoil fosfato sintase - MmSR116_1894; M)ABC-2 transportador - MmSR116_1897; N) transportador ABC ATP-proteína ligante - MmSR116_1898.

A produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana apresenta uma grande vantagem adaptativa, pois, principalmente em ambientes com escassez de nutrientes esta habilidade pode favorecer o seu estabelecimento, limitando outras populações microbianas. Além disso, durante a interação com a planta, poder proteger o hospedeiro contra ataques de patógenos. O genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresenta poucos *clusters* de produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana conhecida. Entretanto, foi descrito para *Methylobacterium* spp. a habilidade em desencadear resistência sistêmica no hospedeiro, protegendo assim a planta contra o ataque de patógenos (MADHAIYAN, et al., 2006; YIM et al., 2013).

1.4.4.3.2 Formação de biofilme e a associação com inseto

Biofilmes são aglomerados de células que juntamente com substâncias poliméricas extracelulares “EPS” (exopolissacarídeos) formam uma matriz aderente a superfícies, bastante comum durante a colonização superficial de tecidos de plantas, durante a patogênese, interações simbióticas e comensais (RAMEY et al., 2004).

Lacava et al. (2004) e Gai et al. (2009) demonstraram que SR1.6/6 pode, além de ocupar o mesmo nicho do patógeno *X. fastidiosa* em citros, ser transmitida por cigarrinhas, um dos vetores de *X. fastidiosa*. Entretanto, o mecanismo envolvido durante a interação entre inseto- *Methylobacterium* sp. ainda é desconhecido. Durante a transmissão de *X. fastidiosa* para planta por meio de inseto, o patógeno deve ser retido no intestino dianteiro, seguido de colonização da superfície do inseto (ALMEIDA e PURCELL, 2006). Insetos adultos são capazes de transmitir o patógeno para plantas após meses de infecção, desde que *X. fastidiosa* seja capaz de se multiplicar dentro dos vetores (CHATTERJEE et al., 2008).

Gai et al. (2009) observaram a presença de *M. mesophilicum* SR1.6/6 na cabeça do inseto após 24h de infecção, sugerindo que essas bactérias são capazes de colonizar o intestino dianteiro do inseto e se fixar na cutícula para que não se desgrudem. A maquinaria necessária para a colonização deste tipo de ambiente inclui algumas adesinas, que são

proteínas de superfície celular que ajudam a na adesão célula-a-célula ou célula-substrato. Existem dois tipos de adesinas: fimbrial (pili) e afimbrial (SOTO; HULTGREN, 1999). A adesina fimbrial são também chamadas de pili (singular de pilus) e *M. mesophilicum* SR1.6/6 possui alguns genes codificadores de proteínas envolvidas com o pili tipo IV.

Pili tipo IV bacteriano são filamentos superficiais, longos, flexíveis, envolvidos com diversas funções, especialmente relacionada com interação celular entre bactérias e hospedeiros, incluindo, a adesão de superfície, formação de biofilme, transdução de fago, motilidade, secreção de proteínas e quimiotaxia (BEEBY et al., 2009; GIRAUD et al., 2010; GUZZO et al., 2009). *M. mesophilicum* SR1.6/6 possui 4 genes codificadores de proteína de montagem do pilus Tipo IV - PilZ (MmSR116_0523; MmSR116_1946; MmSR116_3145; MmSR116_3545). De acordo com Guzzo et al. (2009), PilZ pode desempenhar diferentes papéis na biogênese de pilus de tipo IV, sendo observado em *Pseudomonas aeruginosa* que este gene é importante na biogênese do pilus e na motilidade. Um ortólogo PilZ em *Neisseria meningitidis* pode ser importante para produzir agregados bacterianos e um nocaute no gene PilZ em *Xanthomonas campestris* pv *campestris* reduziu ligeiramente a motilidade em ágar semi-sólido (GUZZO et al., 2009).

O gene Flp/Fap (proteína fimbrial de baixo peso molecular) (MmSR116_2883) é um componente Flp/Tad do pilus, o qual é descrito como essencial na formação de biofilme, além de ser um importante fator para a virulência de muito patógenos bacterianos (NYKYRI et al., 2013). Este componente de pilus em *M. mesophilicum* SR1.6/6 é um domínio putativo conservado similar a Pila de *Rhizobium leguminosarum*. Skerker e Shapiro (2000) identificaram que além de *pilA*, 6 gene adjacentes *cpaA-cpaF* são importantes para a formação do pilus em *Caulobacter crescentus*, uma bactéria não patogênica de vida livre. O gene MmSR116_2884 codifica para peptidase A24A, a qual é uma proteína prepilin tipo IV com um domínio conservado similar ao tipo IV prepilin peptidase CpaA de uma bactéria da família Bradyrhizobiaceae linhagem SG-6C.

O gene MmSR116_5678 codifica para CpaB. O gene *cpaC* de *Caulobacter crescentus* tem 36% de identidade (e-value: 5e-86) com o gene MmSR116_5677 de *M. mesophilicum* SR1.6/6. O gene MmSR116_5676 codifica para CpaD. Outros genes como *cpaE* tem 51% de identidade (e-value: 3e-133) com MmSR116_5675 e o gene *cpaF* tem 76% de identidade (e-value: 0.0) com MmSR116_5674. Portanto, parece que *M. mesophilicum* possui todos os genes envolvidos com a biogênese de pilus, quando comparado com os genes de *Caulobacter crescentus* (SKERKER; SHAPIRO, 2000).

Não existem muitos dados a respeito da formação de biofilme durante a colonização de inseto por *M. mesophilicum* SR1.6/6, entretanto, Andreote et al. (2006) descreveram que *M. mesophilicum* forma biofilme sobre os tecidos de *C. roseus* e *Nicotiana clevelandii*, fato este que segundo os autores deve preceder a colonização endofítica. Alguns genes importantes durante a formação de biofilme descrito por Niba et al. (2007) em *Escherichia coli* foram encontrados no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 e estão descritos na Tabela 1.3.

Niba et al. (2007) rastrearam uma biblioteca de mutantes em *E. coli* e identificaram que a maioria dos mutantes defectivos para a formação de biofilme tinham nocaute de genes envolvidos com a formação de flagelo. Embora uma biblioteca de mutantes não tenha sido avaliada para *M. mesophilicum* SR1.6/6, a identificação destes genes (Tabela 1.3) pode sugerir que podem estar associados à mesma função nesta bactéria endofítica. Foi observado um gene anotado como codificador de uma proteína hipotética (MmSR116_2002) o qual teve 26% de identidade (e-value: $7e-20$) com o gene *flgE* de *Escherichia coli* str. K-12 substr. W3110 e também *cyxA* - adenilato/guanilato ciclase (MmSR116_0145; MmSR116_0516; MmSR116_0663; MmSR116_1153; MmSR116_1294; MmSR116_3686) e *crp* - Crp/regulador transcricional da família FNR (MmSR116_0306; MmSR116_0645), os quais são genes importantes para a expressão de genes de flagelo.

Cada flagelo consiste de um longo e fino filamento, helicoidal, com um motor rotativo em sua base. O motor flagelar possui diferentes proteínas estruturais e requer outras proteínas para a sua expressão e montagem (SOWA; BERRY, 2008). A nomenclatura dos genes foi unificado por Iino et al. (1988), onde o gene é designado *flg*, *flh*, *fli*, ou *flj* dependendo de sua localização no cromossoma bacteriano. Os produtos dos genes *motA* e *motB* são proteínas de membrana integrais necessárias para a rotação do flagelo de *E. coli* (DEAN et al., 1984). Os flagelos são importantes para o contato das células e as superfícies e propagação de bactérias ao longo de uma superfície, como mostrado por Sauer et al. (2002), onde um mutante de flagelo da linhagem *Pseudomonas aeruginosa* PA14 apresentou aderência a superfície mais fraca do que o isolado selvagem. Em um estudo que avaliou as mudanças globais de expressão gênica em *Candidatus Liberibacter asiaticus* em uma planta hospedeira e seu inseto vetor, foi observado que os genes flagelares constituíam uma importante parcela dos genes regulados positivamente nestes hospedeiros (YAN et al., 2013).

M. mesophilicum SR1.6/6 também possui 7 genes *dsb* chamados de dissulfeto oxidoreduases (MmSR116_4156; MmSR116_2297; MmSR116_2296; MmSR116_1596; MmSR116_0297; MmSR116_0669; MmSR116_0040). Proteínas Dsb são responsáveis por

catalisar a formação de ligações dissulfeto em muitas proteínas de membrana e proteínas exportadas, sem os quais eles não conseguem atingir sua conformação funcional (TINSLEY et al., 2004). Estes genes foram também descritos como responsáveis pela montagem do flagelo, e formação de biofilme mediado pela adesão do pilus (NIBA et al., 2007; TINSLEY et al., 2004).

Além dos genes envolvidos com a formação de flagelos, Niba et al. (2007) também verificaram que mutantes de *E. coli* para genes curli demonstraram redução na formação de biofilme. Curli são agregados de fibras finas, o maior componente proteico de matriz extracelular produzido por muitas Enterobacteriaceae, que estão envolvidos com a adesão em superfície, agregados de células e formação de biofilme (BARNHART; CHAPMAN, 2006). *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresenta quatro genes que tiveram sequencias semelhantes a genes curli (MmSR116_5207) com 69% de identidade ao gene *csgG* que codifica a produção de curli, em *Rhodopseudomonas palustris* (e-value: 5e-122); MmSR116_5208 com 50% de identidade com o gene *csgF* que codifica uma proteína de *R. palustris* (e-value: 5e-12); MmSR116_5209 apresentando 35% de identidade com o gene de *R. palustris* que codifica uma pequena subunidade de curli (e-value: 2e-04) e MmSR116_5211 com 31% de identidade com o gene curli de *Pseudomonas resinovorans* (e-value: 1e-14).

Agregados bacterianos estruturados em biofilmes são incorporados em uma matriz polimérica de exopolissacarídeo (EPS) produzidos pelas próprias bactérias, contendo canais cheios de água, que têm sido propostos para promover o fluxo de nutrientes e o efluxo de produtos residuais (ANDERSEN et al., 2007; DANESE et al., 2000; MAH; O'TOOLE, 2001). *M. mesophilicum* SR1.6/6 possui genes envolvidos com a produção de EPS como, MmSR116_0469, que codifica a biossíntese de um exopolissacarídeo poliprenil glicosil-fototransferase, MmSR116_1115, que codifica uma proteína YjbE envolvida com a produção de exopolissacarídeo; MmSR116_1261, que codifica a síntese de exopolissacarídeo ExoD; MSR116_4409, que codifica uma fosfoglucumutase; MmSR116_4972, que codifica uma fosfoglucumutase/fosfomanomutase subunidade alfa e beta; MmSR116_0034, que codifica uma UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase. Os últimos três genes estão presentes no genoma de *X. fastidiosa* e é conhecido por estar envolvido com a produção de exopolissacarídeos. No genoma de SR1.6/6 também foi encontrado um gene MmSR116_2789 (proteína tirosina kinase não específica) envolvido com o transporte de EPS.

Tabela 1.3 - Genes de flagelo de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6.

<i>Locus Tags</i>	<i>Genes</i>	<i>Anotação putative</i>
MmSR116_5497	<i>flgA</i>	Flagellar basal body P-ring formation protein FlgA
MmSR116_5009	<i>flgB</i>	Flagellar basal body rod protein
MmSR116_3518	<i>flgC</i>	Flagellar basal body rod protein FlgC
MmSR116_1925	<i>flgD</i>	Flagellar hook capping protein
MmSR116_5499	<i>flgF</i>	Flagellar basal body rod protein FlgF
MmSR116_5498	<i>flgG</i>	Flagellar basal-body rod protein FlgG
MmSR116_5496	<i>flgH</i>	Flagellar basal body L-ring protein
MmSR116_2009	<i>flgI</i>	Flagellar P-ring protein 2
MmSR116_2004	<i>flgL</i>	Bacterial flagellin C-terminal helical region protein
MmSR116_2036	<i>flhA</i>	Flagellar biosynthesis protein FlhA
MmSR116_5002	<i>flhB</i>	Flagellar biosynthesis protein FlhB
MmSR116_1923	<i>fliF</i>	Flagellar MS-ring protein
MmSR116_1922	<i>fliG</i>	Flagellar motor switch protein G
MmSR116_5003	<i>fliG</i>	Flagellar motor switch protein FliG
MmSR116_1921	<i>fliH</i>	Flagellar assembly protein H
MmSR116_2033	<i>fliI</i>	Flagellar protein export ATPase FliI
MmSR116_2034	<i>fliJ</i>	Flagellar export protein FliJ
MmSR116_5006	<i>fliM</i>	Flagellar motor switch protein FliM
MmSR116_5501	<i>fliM</i>	Flagellar motor switch protein FliM
MmSR116_5004	<i>fliN</i>	Flagellar motor switch protein FliN
MmSR116_1920	<i>fliN</i>	Flagellar motor switch protein FliN
MmSR116_1914	<i>fliP</i>	Flagellar motor switch protein FliP
MmSR116_0563	<i>motA</i>	MotA/TolQ/ExbB proton channel
MmSR116_5007	<i>motA</i>	MotA/TolQ/ExbB proton channel

Portanto, em comparação com o genoma de outras espécies bacterianas já estudadas, *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresenta todo o aparato para a formação de biofilme, sendo sugerido que, a formação de biofilme possa ser um dos principais mecanismos utilizados para a colonização de diferentes espécies de plantas e de insetos que se alimentam do xilema da planta, como já descrito anteriormente (ANDREOTE et al., 2006; GAI et al., 2009).

1.4.4.5 Promoção de crescimento de plantas

A promoção de crescimento do vegetal por bactérias pode ocorrer por meio de sinergismo entre diferentes vias metabólicas. Dessa forma, a fim de estudar os possíveis mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal por *Methylobacterium*, genes putativamente envolvidos neste processo (ACC-desaminase, síntese de citocinina, auxina e produção e captação de siderofóros, solubilização de fosfato) foram anotados no genoma de SR1.6/6.

1.4.4.5.1 Produção de hormônios citocinina, ácido indol acético (AIA) e o efeito de ACC-deaminase

No genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 foram encontrados genes *miaA*, que participam na produção de zeatina, um tipo de citocinina (MmSR116_3107 e MmSR116_0936), genes do sistema cobalamina (MmSR116_5269; MmSR116_527; MmSR116_5271; MmSR116_4626; MmSR116_5165; MmSR116_5164; MmSR116_0456; MmSR116_0457; MmSR116_0458; MmSR116_0459; MmSR116_0460; MmSR116_0461; MmSR116_0462; MmSR116_0463; MmSR116_0464; MmSR116_0465; MmSR116_0466), descritos por estarem envolvidos na interação bactéria-planta e por participarem da promoção do crescimento da planta hospedeira.

O genoma de SR1.6/6 também possui o gene *acdS* (MmSR116_4653) codificador da enzima ACC-deaminase, juntamente com o seu regulador, o gene *acdR* (MmSR116_4654). Possui também 24 genes pertencentes a via de biossíntese de auxina (MmSR116_5790; MmSR116_5791; MmSR116_2250; MmSR116_2715; MmSR116_3569; MmSR116_5622; MmSR116_5763; MmSR116_3997; MmSR116_0038; MmSR116_4785; MmSR116_3850; MmSR116_4083; MmSR116_1182; MmSR116_1663; MmSR116_1639; MmSR116_1992; MmSR116_2202; MmSR116_2188; MmSR116_2942; MmSR116_4311; MmSR116_3979; MmSR116_4808; MmSR116_1211; MmSR116_2937). Foram anotadas três possíveis vias para a produção de auxina: 1- a partir de indol-3-acetonitrila, 2 - a partir de indol-3-acetamida, 3 - a partir de triptamina (Figura 1.7). Na primeira rota Indol-3-acetonitrila é catalisada para ácido indol acético por meio da enzima Nitrilase/cianida hidratase e N-aciltransferase. Na segunda rota, Indol-3-acetonitrila é catalisada por Nitrila-hidratase (subunidade alfa e beta) a Indol-3-acetamida e depois a auxina por enzimas amidases. Na terceira rota, AIA pode ser sintetizada por meio da triptamina e indol acetaldéido. Não foram encontradas as enzimas Trp decarboxilase e triptofano-2-monooxigenase para metabolizar L-Triptofano no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6, assim como, no genoma de *M. oryzae* CBMB20 (KWAK et al., 2014).

A produção de auxina, em especial AIA (ácido indol acético) por plantas e bactérias exerce um papel muito importante no processo de interação bactéria-planta. Para a planta este hormônio é essencial para o desenvolvimento, pois, é responsável por controlar processos fisiológicos, incluindo crescimento e divisão celular, diferenciação de tecidos e resposta a luz (PAPONOV et al., 2005). Em contrapartida, AIA bacteriana em associação com plantas podem também afrouxar as paredes celulares de plantas, por alongamento das células e favorecerem o processo de infecção de micro-organismos biotróficos (REINEKE et al., 2008).

Além disso, este afrouxamento da parede celular pode também aumentar a quantidade da exsudação radicular fornecendo nutrientes adicionais para a comunidade microbiana (HARDOIM et al., 2008). Dessa forma, por meio da liberação de triptofano pelas raízes durante a exsudação, a planta hospedeira pode induzir bactérias associadas (rizoplano e epifíticas) a produzirem AIA, desencadeando uma promoção de crescimento vegetal ou induzindo a transcrição de ACC sintase (*1-aminociclopropano-1-carboxilato*), por meio da conversão de SAM (*S-adenosil metionina*) à ACC e, posteriormente, a 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) (Figura 1.8).

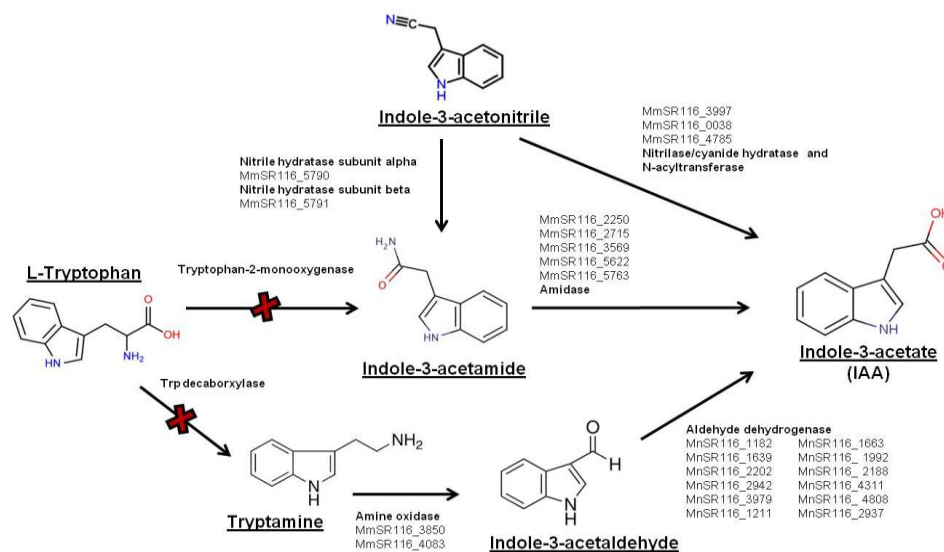


Figura 1.7 - Modelo esquemático da via de biossíntese de auxina adaptado para *M. mesophilicum* SR1.6/6.

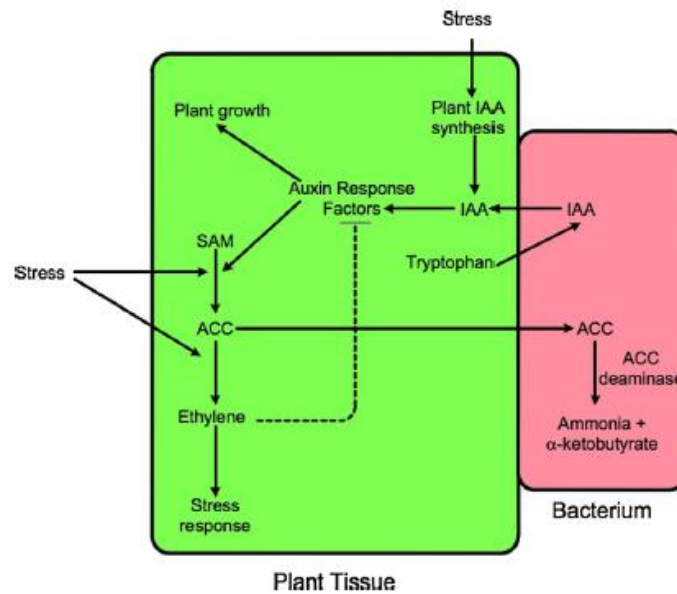


Figura 1.8: Modelo esquemático de como a bactéria pode promover o crescimento da planta, produzindo IAA, ACC deaminase e controlar os níveis de etileno na planta (Glick et al 2013).

1.4.4.5.2 Produção e captação de sideróforos

O elemento ferro é um dos mais importantes nutrientes para o desenvolvimento de uma bactéria, pois, tem a capacidade de aceitar e doar elétrons, interconvertendo-se entre a forma férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}). Esta propriedade o torna um componente muito útil em redução de oxigênio, no transporte de cadeias de elétrons, na catálise de reações enzimáticas, como por exemplo, as que estão envolvidas no metabolismo de hidrogênio, oxigênio e nitrogênio (NEILANDS, 1995).

A habilidade em produzir ou captar sideróforos é uma das vantagens para o sucesso da colonização do microrganismo em um meio competitivo, pois torna o elemento ferro disponível para utilização (Miethke & Marahiel, 2007) o que também contribui para uma melhor colonização de raízes, caule e folhas de plantas hospedeiras (Loaces et al. 2010; Miethke and Marahiel 2007; Neilands 1995).

O elemento ferro é abundante na terra, porém, é facilmente oxidado na presença de oxigênio e pH neutro tornando-se indisponível para ser absorvido e utilizado pelas células (FARALDO-GOMEZ; SAMSOM, 2003). Ferro está envolvido em importantes processos fisiológicos, como fotossíntese, respiração, transporte, regulação gênica, biosíntese de DNA e fixação biológica de nitrogênio (Krewulak & Vogel, 2008). Desta forma, bactérias que são capazes de capturar ou produzir sideróforo, os quais quelam íons de ferro, possui uma vantagem adaptativa. Para linhagens de *Methylobacterium*, a habilidade em produzir ou

capturar sideróforos é uma importante estratégia para o crescimento, para a disponibilização do ferro resistência a metais pesados (Van Aken and Schnoor 2004).

Sideróforos são classificados de acordo com a maquinaria enzimática envolvida em sua biossíntese. Um grupo chamado NRPSs que depende de peptídeo síntase não ribossomal e outro grupo independente chamado NRPSs independente (Barry and Challis 2009). Algumas bactérias produzem sideróforos do tipo hidroxamato enquanto outras produzem o tipo catecol (Neilands and Nakamura, 1991). A produção de sideróforos por microrganismos pode ser benéfica para a planta hospedeira, pois pode inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, indisponibilizando o elemento ferro no ambiente (Sharma and Johri 2003), e também pode estimular o crescimento da planta melhorando a absorção e nutrição mediada por ferro, aumentando a solubilidade deste elemento (Lemanceau et al., 2009). Diversos estudos têm mostrado que sideróforos pode também aumentar a imunidade, ativando o sistema de resposta a resistência sistêmica na planta por eliminação de ferro (DE VLEESSCHAUWER; HOFTE, 2009).

O sistema de transporte de sideróforos em bactérias Gram-negativas é um complexo de três proteínas de membrana (TonB, ExbB e ExbD) o que são geralmente chamados de receptores dependentes de TonB (BRADBEER 1993; KASERER et al. 2008), estes receptores são frequentemente encontrados em bactérias Gram-negativas, incluindo *Methylobacterium* (LOPER; Buyer 1991).

Em *Pseudomonas* sp. a captação e a síntese de sideróforos são associadas com fatores de virulência, patogênese e competitividade no solo, especialmente em rizosfera (GHYSELS et al. 2005). Desta maneira, a presença de genes associados com a captação e síntese de sideróforos em *M. mesophilicum* SR1.6/6 pode ser associada a interação com a planta hospedeira. Foi constatado a produção *in vitro* de sideróforos em algumas linhagens de *Methylobacterium*, como, *M. extorquens* AR1.6/2 (Silva-Stenico et al. 2005), *M. phyllosphaerae* CBMB-5 e MB-27 que produzem sideróforos do tipo hidroxamato (Vaidehi and Sekar 2012) e sete linhagens de *M. extorquens*, 3 linhagens de *M. zatmanii*, 2 linhagens de *M. radiotolerans*, 2 linhagens de *M. fujisawaense* e 22 linhagens de *M. mesophilicum* incluído a linhagem SR1.6/6, objeto deste estudo (Lacava et al. 2008).

O genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresenta 15 receptores dependentes de TonB (MmSR116_3891, MmSR116_4265, MmSR116_4861, MmSR116_4309, MmSR116_4614, MmSR116_4445, MmSR116_0511, MmSR116_4123, MmSR116_2650, MmSR116_2406, MmSR116_3374, MmSR116_3893, MmSR116_4301, MmSR116_4691 e MmSR116_3374),

estes receptores estão presentes em linhagens de *Methylobacterium* os quais desenvolvem se como um sistema de transporte para complexos ferro-siderofos em bactérias Gram negativas (GHYSELS, 2005).

Por outro lado, bactérias podem regular o metabolismo do ferro dependendo da disponibilidade deste elemento no ambiente, por exemplo, *Fur* (*Ferric-uptake regulator protein*) controla a expressão de genes envolvidos com a aquisição de ferro, processo observado em *E. coli* (Hantke, 2001) e *Salmonella typhimurium* (Ernst et. al., 1978). Esta proteína foi encontrada no genoma de diferentes linhagens de *Methylobacterium* (*M. populi* BJ001, *Methylobacterium* sp. 4-46, *Methylobacterium extorquens* PA1, *M. extorquens* CM4, *M. extorquens* AM1, *M. extorquens* DM4, *M. radiotolerans* JCM 2831, *M. oryzae* CBMB20, *M. nodulans* ORS 2060), assim como em *M. mesophilicum* SR 1.6/6 (MmSR116_1579).

Foram também encontrados no genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 alguns outros genes descritos por serem conservados em outras bactérias, como o gene *phuR* (MmSR116_4301) e *hasR* (MmSR116_4691) os quais são descritos como receptores de ferro em *P. aeruginosa* com homologia com receptores TonB em SR1.6/6, o gene *fpvA* (*ferric pioverdin receptors*) (MmSR116_3374), uma mistura do tipo hidroxamato e catecol, envolvidos com a biossíntese de pioverdina, o gene *pirA* (MmSR116_4445) e *pfeA* (MmSR116_3893) que estão envolvidos com receptores de sideróforos enterobactina (DRAPER, et al 2011). Genes envolvidos com a biossíntese de sideróforos alcaligina, como *alcA* (MmSR116_4826) e *alcB* (MmSR116_4827) também estão presentes no genoma das linhagens de *Methylobacterium* avaliadas, assim como em SR1.6/6.

Tabela 1.4 - Receptores de sideróforos TonB-dependente com domínios proteicos em *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 envolvidos com a aquisição e síntese de sideróforos.

<i>Locus tag</i>	Proteína	Domínios proteicosTonB	Tipo de sideróforo/sistema de captação de ferro
MmSR116_3891		<i>ferrichrome receptor precursor protein</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Receptor TonB
MmSR116_4265		<i>TonB family protein</i>	Receptor TonB
MmSR116_4861		<i>TonB protein</i>	Receptor TonB
MmSR116_4309		<i>Ferrienterobactin_receptor</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Receptor TonB
MmSR116_4614		<i>Ferrienterobactin_receptor</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Receptor TonB
MmSR116_4445	PirA	<i>Ferrienterobactin_receptor</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Receptor TonB
MmSR116_0511		<i>Protein_TolA</i> <i>TonB family C-terminal domain</i>	Receptor TonB
MmSR116_4123		<i>Protein_TolA</i> <i>Gram-negative bacterial TonB protein C-terminal</i>	Receptor TonB
MmSR116_2650		<i>Outer membrane receptor for monomeric catechols</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Receptor TonB
MmSR116_2406		<i>ferrichrome outer membrane transporter</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Receptor TonB
MmSR116_3374	FpvA	<i>ferrioxamine B receptor precursor protein</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Pioverdina
MmSR116_3893	PfeA	<i>Outer membrane cobalamin receptor protein</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Enterobactina
MmSR116_4301	PhuR	<i>ferrichrome outer membrane transporter</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Pioquelina
MmSR116_4691	HasR	<i>ferrichrome receptor precursor protein</i> <i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i>	Pioquelina
MmSR116_1579	FuR	<i>TonB dependent/Ligand-Gated channels</i> <i>Ferric uptake regulator(Fur)</i>	Supressor
MmSR116_2044	FoxR	<i>Zeta_toxin</i>	Regulador
MmSR116_2912	FiuR	<i>ABC transporter transmembrane region</i>	Regulador
MmSR116_4826	AlcA	<i>L-ornithine 5-monooxygenase</i>	Alcaligina
MmSR116_4827	AlcB	<i>Siderophore biosynthesis protein domain AlcB</i>	Alcaligina
MmSR116_4828	NRPS	<i>Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)</i> <i>MbtH, amino acid adenylation domain-containing protein</i> <i>The adenylation domain of nonribosomal peptide</i> <i>non-ribosomal_peptide_synthetase</i> <i>Phosphopantetheine attachment site</i> <i>Esterase_lipase</i>	Vicibactina

1.4.4.5.3 Solubilização de fosfato

Fósforo, depois do nitrogênio, é o segundo macronutriente mais limitante para o crescimento da planta, pois, está envolvido na regulação de vias metabólicas, e é o componente-chave de moléculas como, ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP, e, conseqüentemente, as plantas não podem crescer sem este nutriente deste nutriente (SINGH et al., 2014). SR1.6/6 possui um gene *phn* (MmSR116_5590) que codifica o sistema C-P liase, também envolvido na disponibilização de fósforo, genes codificadores da enzima fitase (MmSR116_2248; MmSR116_1945), esta enzima fitase (mio-inositol-hexaquifosfato fosfohidrolase) catalisa a liberação do fosfato de fitato (mio-inositol hexaquifosfato), o qual é a principal forma de fósforo em grãos cereais, legumes e sementes oleaginosas (PANDEY et al., 2001) e representa cerca de (10–50% da quantidade de fósforo total no solo (SINGH et al., 2014), a presença desta enzima em bactérias associadas a plantas hospedeira pode melhorar a nutrição de plantas disponibilização de fósforo (SINGH et al., 2014).

1.4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Methylobacterium spp. podem ser encontradas em associação com diferentes espécies de plantas (OMER, et al 2004), como por exemplo, *M. radiotolerans* (isolada de *Curcubita pepo*), *M. oryzae* CBMB20 (isolada de caule de arroz), *M. mesophilicum* SR1.6/6 (isolada de *Citrus sinensis*), *M. sp.* GXF4 (isolada de xilema de videira), *M. populis* BJ001 (isolada de *Populus* sp.), *M. extorquens* PA1 (isolada de *Arabidopsi thaliana*), *M. extorquens* DSM13060 (isolada de *Pinus sylvestris*), *M. nodulans* ORS2060 (isolada de *Crotolaria* sp.), *M. sp.* 46-4 (possui interação com planta, mas o seu isolamento é desconhecido) (EEVERS et al., 2015; DOURADO et al., 2015).

Foi observado que muitos dos genes avaliados são conservados em todas as linhagens avaliadas, como por exemplo, genes envolvidos com a síntese de pqq (BCDE), regulador PhyR, gene *shc* precursor da via de síntese de hopanóides, genes *phn* envolvidos com a produção de zeatina, genes envolvidos com a formação de pilus e produção de exopolissacarídeos.

Kwak et al. (2014) analisou genes essenciais de diferentes espécies de *Methylobacterium* isoladas de diferentes ambientes, e por meio de uma árvore filogenética dividiram as espécies em três grupos: 1-) *M. extorquens* CM4, *M. extorquens* AM1, *M. extorquens* DM4, *M. extorquens* PA1, *M. extorquens* BJ001; 2-) *M. oryzae* CBMB20, *M. radiotolerans* JCM2831; 3-) *M. nodulans* ORS2060, *Methylobacterium* sp. 4-46 e relacionaram estes grupos quanto ao potencial em promover o crescimento de planta

hospedeira. Desta forma, foi observado que o grupo (1) é o grupo que possui menos genes em seu genoma relacionados com a promoção de crescimento, não possuindo o gene *acdS* codificador de ACC-deaminase, fitase, e sistema liase C-P. O grupo (2) é o grupo que mais possui genes relacionados com a promoção de crescimento da planta, sendo que, dos genes avaliados, não possui apenas genes de fixação de nitrogênio, enquanto o grupo (3) é o único grupo que possui genes de fixação de nitrogênio. O grupo 2 e o grupo 3 são compostos por bactérias que normalmente apresentam um nicho ecológico associado com plantas hospedeiras.

Neste estudo descrito acima, os autores não incluíram a linhagem de *M. mesophilicum* SR1.6/6, desta forma, no presente trabalho esta análise filogenética foi feita novamente incluindo a linhagem em questão, e foi verificado que a linhagem de *M. mesophilicum* SR1.6/6 está inserida no mesmo grupo que as espécies *M. oryzae* CBMB20 e *M. radiotolerans* JCM2831, descrito por Kwak et al. (2014) (Figura 1.9), e que compartilha os mesmos genes envolvidos com a promoção de crescimento vegetal avaliados.

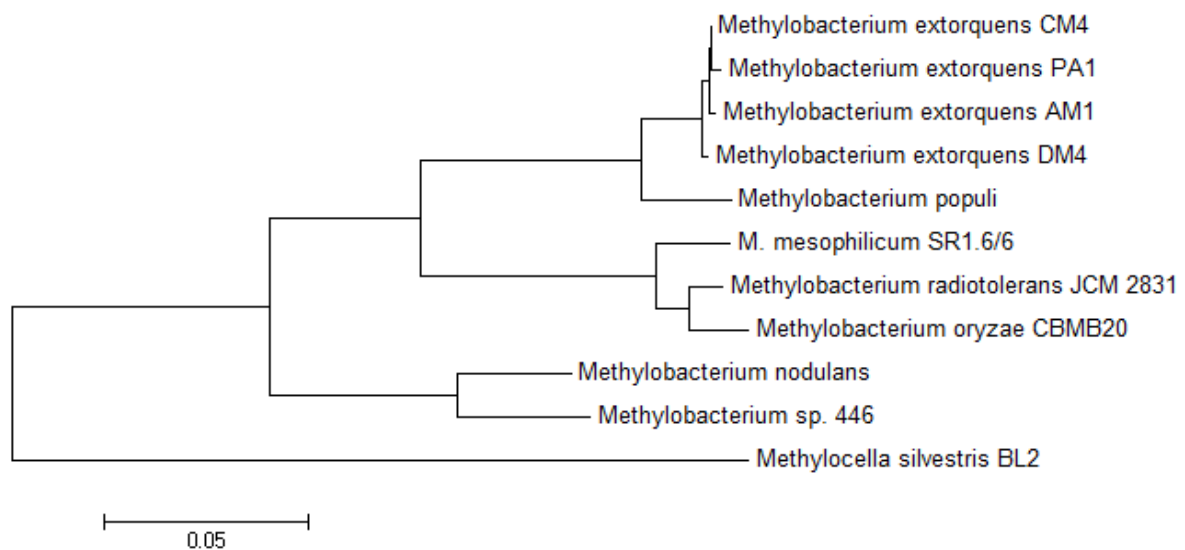


Figura 1.9 - Árvore filogenética de espécies de *Methylobacterium*, sequências de 7 proteínas foram concatenadas e alinhadas por *MUSCLE* com parâmetro *neighbor-joining* utilizando o programa MEGA 6. *Methylocella silvestris* BL2 foi utilizada como grupo externo.

Foi observado que *M. populi* BJ001 é a única linhagem de todas as espécies avaliadas que não possui gene *pqqA*. A espécie *M. nodulans*, das espécies avaliadas, é a única que não possui genes relacionados com fotossíntese, porém faz parte do clado de *M. sp. sp-4* que possui genes de fixação de nitrogênio.

Embora a maioria dos genes relacionados com a interação entre a bactéria e a planta sejam conservados, existem genes exclusivos e genes compartilhados com apenas alguns grupos avaliados, cada qual pode estar relacionado com o seu nicho ecológico, conferindo vantagens adaptativas importantes durante a colonização de cada hospedeiro, sendo que, os benefícios para a planta, em muitos casos, dependem das respostas da planta ao micro-organismo, podendo estar condicionada pelo genótipo da planta.

O genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresenta uma série de mecanismos que podem ser apontados como contribuintes para o sucesso da colonização da planta hospedeira, como produção de biofilme, e também mecanismos que podem contribuir para a proteção das células, como, produção de moléculas de hopanóides, agentes antioxidantes, reconhecimento e adaptação na planta, como, agentes antioxidantes sistema de secreção, sistema quorum sensing, e, ainda fornecer benefícios para a planta hospedeira, aumentando o seu crescimento vegetal, diminuindo os níveis de estresse da planta e controlando a ação de microrganismos patogênicos (Figura 1.10).

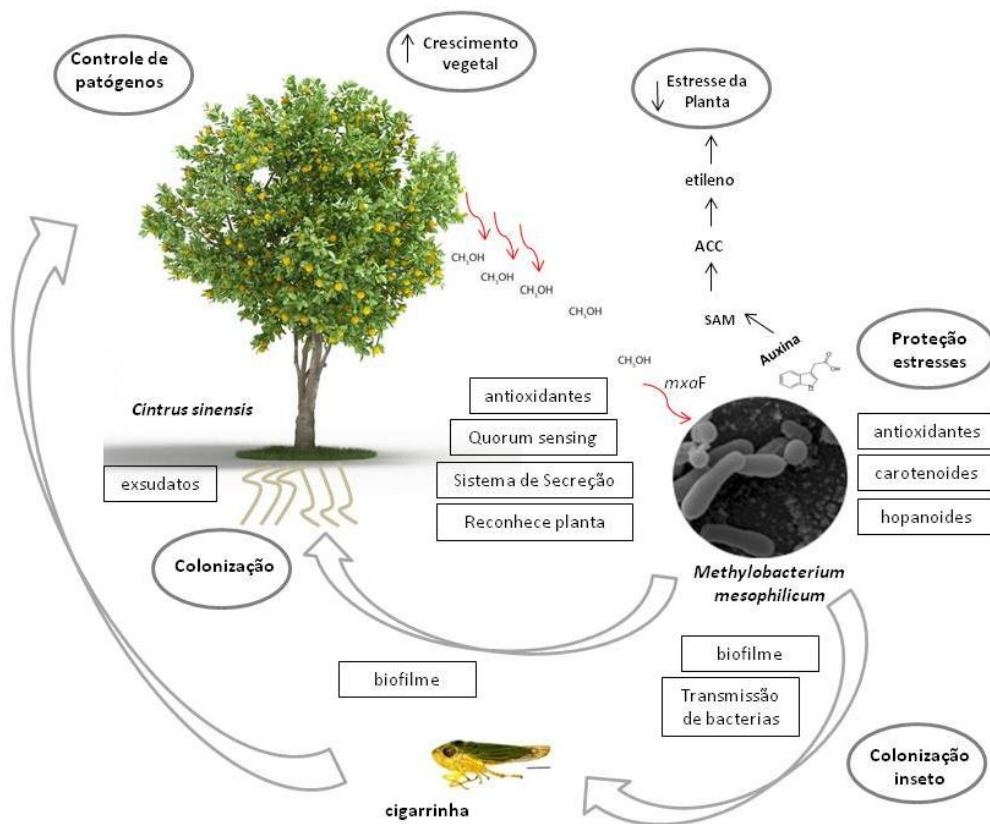


Figura .1.10: Modelo esquemático da interação da linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum* e a planta hospedeira e o inseto, cigarrinha, vetor da doença clorose variegada de citros (CVC) causada por *X. fastidiosa*.

REFERÊNCIAS* do Capítulo 1

ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; GAI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR., 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.

ABANDA-NKPWATT, D.; MUSCH, M.; TSCHERSCH, 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.

ALMEIDA, R. P. P.; PURCELL, A. H. Patterns of *Xylella fastidiosa* Colonization on the Precibarium of Sharpshooter Vectors Relative to Transmission to Plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, p. 884-890, 2006.

ALMEIDA, D. M.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A. A. C.; RAMOS, R. T. J.; ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, A. R.; LIMA, A. O. S.; SÁ, P. H.; BARBOSA, S.; ARAÚJO, W. L.; SILVA, A. Draft Genome Sequence of *Methylobacterium mesophilicum* Strain SR1.6/6 isolated from *Citrus sinensis*. **GenomeA**, 2013.

ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 224-233, 1997.

ANBAZHAGAN D.; MANSOR M.; YAN, G. O. S.; YUSOF, M. Y.; HASSAN, H. Detection of Quorum Sensing Signal Molecules and Identification of an Autoinducer Synthase Gene among Biofilm Forming Clinical Isolates of *Acinetobacter* spp. **Plos One**, v. 7, n. 7: e36696, 2013.

ANDERSEN, P. C.; BRODBECK, B. V.; ODEN, S.; SHRINER, A.; LEITE, B. Influence of xylem fluid chemistry on planktonic growth, biofilm formation and aggregation of *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, p. 210-217, 2007.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.

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.

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.

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.

*De acordo com:

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

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.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLTON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST server: Rapid Annotation using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 8, p. 75, 2008.

BARNHART, M. M.; CHAPMAN, M. Curli biogenesis and function. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 131-147, 2006.

BARRY, S. M. E CHALLIS, G. L. Recent advances in siderophore biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, p. 205-215, 2009.

BEEBY, M.; BOBIK, T. A.; YEATES, T. O. Exploiting genomic patterns to discover new supramolecular protein assemblies. **Protein Science**, v. 18, p. 69-79, 2009.

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

BENDTSEN, J.D.; BINNEWIES, T.T.; HALLIN, P.F.; SICHERITZ- PONTEN, T.; USSERY, D.W.; Genome update: prediction of secreted proteins in 225 bacterial proteomes. **Microbiology**, v. 151, p. 1725–1727, 2005.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 573-580, 1999.

BOYER, F.; FICHANT, G.; BERTHOD, J.; VANDENBROUCK, Y.; ATTREE, I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? **BMC Genomics**, v. 10, p. 104-114, 2009.

BRADLEY, A. S.; PEARSON, A.; SÁENZ, J. P., MARX, C. J. Adenosylhopane: The first intermediate in hopanoid side chain biosynthesis. **Organic Geochemistry**, v. 41, p. 1075–1081, 2010.

BRADBEER, C. The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 3146-3150, 1993.

BYROM, D. Polymer synthesis by micro-organisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.

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

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

CHAN, E. Y. Advances in sequencing technology. **Mutation Research**, v. 573, p. 13-40, 2005.

- CHANPRAME, S.; TODD, J.; WIDHOLM, J. Prevention of pink-pigmented methylotrophic bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) contamination of plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 222–225, 1996.
- CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P.; LINDOW, S. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 243-71, 2008.
- CHISTOSERDOVA, L.; CHEN, S.W.; LAPIDUS, A.; LIDSTROM, M.E. Methylotrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a Genomic Point of View. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2980–2987, 2003.
- CICCARELLI, F. D.; DOERKS, T.; VON MERING, C.; SNEL, B.; BORK, P. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. **Science**, v. 3, p. 1283-1287, 2006.
- COLLINSON, I.; BREYTON, C.; DUONG, F.; TZIATZIOS, C.; SCHUBERT, D.; OR, E.; RAPOPORT, T.; KÜHLBRANDT, W. Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase. **EMBO Journal**, v. 20, p. 2462-2471, 2001.
- COOPER, D. B.; SMITH, V. F.; CRANE, J. M.; ROTH, H. C.; LILLY, A. A.; RANDALL, L. L. SecA the motor of the secretion machine binds diverse partners on one interactive surface. **Journal of Molecular Biology**, v. 38, p. 74-87, 2008.
- CLAESEN, J.; BIBB, M. Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of post-translationally modified peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 16297–16302, 2010.
- DANESE, P. N.; PRATT, L. A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 12, 2000.
- DE, VLEESSCHAUWER D.; CORNELIS, P.; HOFTE, M. Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* I7NSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 19, p. 1406-1419, 2006.
- DEAN, G. E.; MACNAB, R. M.; STADER, J.; MATSUMURA, P.; BURKS, C. Gene Sequence and Predicted Amino Acid Sequence of the *motA* Protein, a Membrane-Associated Protein Required for Flagellar Rotation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 159, p. 991-999, 1984.
- DELEPELAIRE, P. Type I secretion in Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 149–161, 2004.
- DINI-ANDREOTE, F. **Análises genômica e transcriptômica de *Methylobacterium mesophilicum* (SR1.6/6) em interação com a planta hospedeira**. 80p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- DIXON, D.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v. 3, p. 1-10, 2002.
- DORONINA, N. V.; TROTSENKO, Y. A.; KUZNETSOV, B. B.; TOUROVA, T. P.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. *Methylobacterium suomiense* sp. nov. and *Methylobacterium lusitanum* sp. nov., aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 773–776, 2002.

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. **Ecologia de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira**. 2010. 134p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

FERREIRA FILHO, A. S.; QUECINE, M. C.; BOGAS, A. C.; ROSSETTO, P. B.; LIMA, A. O. S.; LACAVA, P. T. AZEVEDO, J. L. ARAUJO, W. L. Endophytic *Methylobacterium extorquens* expresses a heterologous β -1,4-endoglucanase A (EglA) in *Catharanthus roseus* seedlings, a model host plant for *Xylella fastidiosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1475-1481, 2012.

FRANCEZ-CHARLOT, A.; FRUNZKE, J.; REICHEN, C.; EBNETER, J. Z.; GOURION, B.; VORHOLT, J. A. Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 3467–3472, 2009.

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

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

FORSBERG, K. J.; REYES, A.; WANG, B.; SELLECK, E. M.; SOMMER, M. O.; et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science**, v. 337, p. 1107-1111, 2012.

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

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

GHELFI, A.; GAZIOLA, S. A.; CIA, M. C.; CHABREGAS, S. M.; FALCO, M. C.; KUSER-FALCÃO, P. R.; AZEVEDO, R. A. Cloning, expression, molecular modelling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. **Annals of Applied Biology**, v. 159, p. 267-280, 2011.

GIRAUD, C.; BERNARD, C.; RUER, S.; BENTZMANN, S. Biological "glue" and "Velcro": molecular tools for adhesion and biofilm formation in the hairy and gluey bug *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, p. 343-358, 2010.

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 of the United States of America**, v. 103, p. 13186–13191, 2006.

GHYSELS, B.; OCHSNER, U.; MOLLMAN, U.; HEINISCH, L.; VASIL, M.; CORNELIS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* pirA gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, p. 167-174, 2005.

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 Microbiology**, v. 60, p. 425–449, 2006.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Review : making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Funtional Plant Biology**, v. 32, p. 481-494, 2005a.

GRATÃO, P. L.; PRASAD, M. N. V.; CARDOSO, P. F.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Phisiology**, v. 1, p. 53-64, 2005b.

GUZZO, C. R.; SALINAS, R. K. ; ANDRADE, M. O.; FARAH, C. S. PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL Domain: implications for control of TypeIV Pilus biogenesis. **Journal of Molecuar Biology**, v. 393, p. 848–866, 2009.

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

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalknoates by bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 471-476, 1989.

HÖFER, P.; VERMETTE, P.; GROLEAU, D. Introducing a new bioengineered bug: *Methylobacterium extorquens* tuned as a microbial bioplastic factory, **Bioengineered Bugs**, v. 2, p.71-79, 2011.

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

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

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.

JENDROSSEK, D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 74, p. 1186-1196, 2007.

- JOURAND, P.; RENIER, A.; RAPIOR, S.; FARIA, S. M.; PRIN, Y.; GALIANA, A.; GIRAUD.; E.; DREYFUS, B. Role of Methylophony during symbiosis between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 18, p. 1061–1068, 2005.
- KASERER, W. A.; JIANG, X.; XIAO, Q.; SCOTT, D. C.; BAULER, M.; COPELAND, D.; NEWTON, S. M. C.; KLEBBA, P. E. Insight from TonB hybrid Proteins into the mechanism of iron transport through the outer membrane, v. 190, p. 4001-4016, 2008.
- KAYSER M. F., UCURUM Z., VUILLEUMIER S. Dichloromethane metabolism and C₁ utilization genes in *Methylobacterium* strains. **Microbiology**, v. 148, p. 1915-1922. 2002.
- KEITH, K. E.; VALVANO, M. A. Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from *Burkholderia cenocepacia*. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 2451-2460, 2007.
- KHOSRAVI-DARANI, K, MOKHTARI, Z. B.; AMAI, T.; TANAKA, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 1407-1424. 2013.
- KOROTKOVA, N.; LIDSTROM, M. E. Connection between polybetahydroxybutyrate biosynthesis and growth on C1 and C2 compounds in the methyloph *Methylobacterium extorquens* AM1. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 1038–1046, 2001.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- KWAK, M. J.; JEONG, H.; MADHAIYAN, M.; LEE, Y.; SA, T. M.; OH, T. K.; KIM, J. F. Genome Information of *Methylobacterium oryzae*, a plant-probiotic methyloph in the phyllosphere. **Plos One**, v. 9, n. 9, e106704, 2014.
- LACAVAL, 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.
- LACAVAL, 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.
- LACAVAL, P. T.; SILVA-STENICO, M. E.; ARAUJO, W.L, COLNAGHI SIMIONATO, A.V. ; CARRILHO, E.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, J.L. Detection of Siderophores in Endophytic Bacteria *Methylobacterium* spp. Associated with *Xylella Fastidiosa* Subsp. Pauca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 521-528, 2008.
- LAGESEN, K; HALLIN, P.; RODLAND, E. A.; STAERFELDT, H.; ROGNES, T.; USSERY, D. W. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. **Nucleic acids research**, v. 35, p. 3100-8, 2007.
- 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 methylophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 2, p. 402-408, 2006.
- LEO, J. C.; GRIN, I.; LINKE, D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. **Philosophical Transactions Royal Society Biological Sciences**, v. 367, p. 1088–1101, 2012.

- LESK, A. **Introdução a Bioinformática**. 2º ed. Artmed, Porto Alegre, 2008. IINO, T.; KOMEDA, Y.; KUTSUKAKE, K.; MACNAB, R. M.; MATSUMURA, P.; PARKINSON, J. S.; SIMON, M. I.; YAMAGUCHI, S. New unified nomenclature for the flagellar genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiological Reviews**, v. 52, n.4, p. 533-535, 1988.
- LOPER, J. E. & BUYER, J. S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. **Molecular Plant–Microbe Interact**, v. 4, p. 5-13, 1991.
- LÓPEZ-LARA, I. M.; SOHLENKAMP, C.; GEIGER, O. Membrane Lipids in Plant-Associated Bacteria: Their Biosyntheses and Possible Functions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16 n.7, p. 567-579, 2003.
- LOWE T, M.; EDDY, S. R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 955-964, 1997.
- 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.
- MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.
- MALOTT R. J.; STEEN-KINNAIRD B. R.; LEE T. D.; SPEERT D. P. Identification of hopanoid biosynthesis genes involved in polymyxin resistance in *Burkholderia multivorans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 464–471, 2012.
- MARTINS, P. F.; CARVALHO G.; GRATÃO, P. L.; DOURADO, M. N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, R. A. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1186–1195, 2014.
- MARX, C. J.; BRINGEL, F.; CHISTOSERDOVA, L.; MOULIN, L.; M. L. et al., Complete genome sequences of six strains of the genus *Methylobacterium*, **Journal of Bacteriology**, v. 194, p.4746-4748, 2012.
- MASIP, L.; VEERAVALLI, K.; GEORGIU, G. The many faces of glutathione in bacteria. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 753-762, 2006.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase an enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-32, 2006.
- NACHIN, L.; E. L HASSOUNI, M.; LOISEAU, L.; EXPERT, D.; BARRAS, F. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 960-972, 2001.

- NALIN, R.; PUTRA, S. R.; DOMENACH, A. M.; ROHMER, M. GOURBIERE, F. BERRY, A. M. High hopanoid/total lipids ratio in *Frankia* mycelia is not related to the nitrogen status. **Microbiology**, v. 146, p. 3013–3019, 2000.
- NAYAK, D. D.; MARX, C. J. Genetic and phenotypic comparison of facultative methylotrophy between *Methylobacterium extorquens* strains PA1 and AM1. **Plos One**, v. 9, e107887, 2014.
- NEILANDS, J. B.; NAKAMURA, K. Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates. In: WINKELMANN, G. **CRC handbook of microbial iron chelates**. Florida: CRC Press, p. 1-14, 1991.
- NEILANDS, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26723–26726, 1995.
- NIBA, E. T. E.; NAKA, Y.; NAGASE, M.; MORI, H.; KITAKAWA, M. A Genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli*. **DNA Research**, v. 14, p. 237-246, 2007.
- NISHIO, T.; YOSHIKURA, T.; ITOH, H. Detection of *Methylobacterium* species by 16S rRNA gene-targeted PCR. **Applied Environment Microbiology**. v. 63, p. 1594, 1997.
- NUDEL, C.; GONZALEZ, R.; CASTANEDA, N.; MAHLER, G.; ACTIS, L.A. Influence of iron on growth, production of siderophore compounds, membrane proteins, and lipase activity in *Acinetobacter calcoaceticus* BD 413. **Microbiological Research**, v. 155, p.263-269, 2001.
- NYKYRI, J.; MATTINEN, L.; NIEMI, O.; ADHIKARI, S.; KÖIV, V.; SOMERVUO, P.; FANG, X.; AUVINEN, P.; MÄE, A.; PALVA, E. T.; PIRHONEN, M. Role and regulation of the Flp/Tad Pilus in the virulence of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 and *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. **Plos one**, v. 8, p. 1-11, 2013.
- OLCHANHESKI L. R.; DOURADO M. N.; BELTRAME F. L.; ZIELINSKI A. A. F.; DEMIATE I. M.; PILEGGI S. A. V.; AZEVEDO R. A.; SADOWSKY M. J.; PILEGGI M. Mechanisms of Tolerance and High Degradation Capacity of the Herbicide Mesotrione by *Escherichia coli* Strain DH5-a. **Plos One**, v. 9, e99960, 2014.
- OMER, Z. S.; TOMBOLINI, R.; GERHARDSON, B. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, p.319–326, 2004.
- PALACIOS, O. A.; BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria—an overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, p. 415-432, 2014.
- PANDEY, A.; PALNI, L. M. S.; HEBBAR, K. P. Suppression of dampingoff in maize seedlings by *Pseudomonas corrugate*. **Microbiology Research**, v. 156, p. 191-194, 2001.
- PAPONOV, I. A.; TEALE, W. D.; TREBAR, M.; BLILOU, K.; PALME, K. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. **Trends Plant Science**, v. 10, p. 170–177, 2005.
- PASSALACQUA, K. D.; VARADARAJAN, A.; ONDOV, B. D.; OKOU, D. T.; ZWICK, M.Y.; BERGMAN, N. H. Structure and Complexity of a Bacterial Transcriptome. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 3203-3211, 2009.

PATT, T. E.; COLE, G. C.; HANSON, R. S. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 26, p. 226–229, 1976.

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R. CRUZ, L. M. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **Plos One**, v. 7, n. 5: e1002064, 2011.

PETERS L. P.; CARVALHO G.; MARTINS P. F.; DOURADO, M. N.; VILHENA M. B.; PILEGGI M.; AZEVEDO R. A. Differential Responses of the Antioxidant System of Ametryn and Clomazone Tolerant Bacteria. **Plos One**, v. 9, e112271. 2014.

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 157, p. 2795–2807, 2011.

PFEIFFER D.; JENDROSSEK, D. Localization of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granule-Associated Proteins during PHB Granule Formation and Identification of Two New Phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 5909-5921, 2012.

PIRTTILA, A. M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLÄ, 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.

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

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.

PODLESAKOVA, K.; FARDOUX, J.; PATREL, D.; BONALDI, K.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; GIRAUD, E.; SPÍČHAL, L.; NOUWEN, N. Rhizobial synthesized cytokinins contribute to but are not essential for the symbiotic interaction between photosynthetic Bradyrhizobia and *Aeschynomene* Legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n.1, p. 51–78, 2005.

PUGSLEY, A. P. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 50-108, 1993.

RAYMOND, K; MÜLLER, G.; MATZANKE, B. Complexation of iron by siderophores a review of their solution and structural chemistry and biological function. **Topics in Current Chemistry**, v. 123, p. 49–102, 1984.

RAMEY, BRONWYN, E.; KOUTSOUDIS, MARIA; VON BODMAN, SUSANNE B.; AND FUQUA, CLAY, Biofilm Formation in Plant-Microbe Associations. **Plant Science Articles**, v. 7, p. 602-609, 2004.

- RAMPELOTTI-FERREIRA, F. T.; FERREIRA, A.; VENDRAMIM, J. D.; LACAVALA, P. T.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Colonization of rice and *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae by genetically modified endophytic *Methylobacterium mesophilicum*. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 308-310, 2010.
- REHMAN, A.; ANJUM, M. S. Multiple metal tolerance and biosorption of cadmium by *Candida tropicalis* isolated from industrial effluents: glutathione as detoxifying agent. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 174, p. 585-595, 2011.
- REINECKE, F.; STEINBUCHER, A. *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. **Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 16, p. 91-108, 2009.
- REINEKE, G.; HEINZE, B.; SCHIRAWSKI, J.; BUETTNER, H.; KAHMANN, R.; BASSE, C. W. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, p. 339-355, 2008.
- RITZ, D.; BECKWITH, J. Roles of thiol-redox pathways in bacteria. **Annual Review Microbiology**, v. 55, p. 21-48, 2001.
- 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.
- RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, p. 944-945, 2000.
- SANDY, M.; BUTLER, A. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 4580-4595, 2009.
- SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1140-1154, 2002.
- SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A. V.; VANDAMME, P.; AITBARKA, E.; SALLES, J. F. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov. a novel plant-associated bacterium with plant beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 55, p. 1187 - 1192, 2005.
- SCHMIDT, M. A.; BALSANELLI, E.; FAORO, H.; CRUZ, L. M.; WASSEM, R.; BAURA, V. A.; WEISS, V.; YATES, M. G.; MADEIRA, H. M. F.; PEREIRA-FERRARI, L.; FUNGARO, M. H. P.; PAULA, F. M.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E.; OLIVARES, F. L.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A. The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 98, 2012.
- SCHMITT, L.; BENABDELHAK, H.; BLIGHT, M. A.; HOLLAND, I. B.; STUBBS, M. T. Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. **Journal of Molecular Biology**, v. 330, p. 333-342, 2013.

SCRUTTON, N. S.; BERRY, A.; PERHAM, R. N. Purification and characterization of glutathione reductase encoded by a cloned and over-expressed gene in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 245, p. 875-880, 1987.

SHAPIRO, B. J.; FRIEDMAN, J.; CORDERO, O. X.; PREHEIM, S. P.; IMBERLAKE, S. C. et al. Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. **Science**, v. 336, p. 48-55, 2012.

SHARMA, A.; JOHRI, B. N. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS₉ in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. **Microbiological Research**, v. 158, p. 243-248, 2003.

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

SILVA, L.F.; GOMEZ, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; TORRES, B. B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 165-174, 2000.

SILVA-STENICO, M. E.; PACHECO, F. T. H.; RODRIGUES, J. L. M.; CARRILHO, E.; TSAI, S. M. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. **Microbiological Research**, v. 160, p. 429-436, 2005.

SINGH, J. S.; PANDEY, V. C.; SINGH, D. P. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, v. 140, p. 339-353, 2011.

SINGH, P.; KUMAR, V.; AGRAWAL, S. Evaluation of Phytase Producing Bacteria for Their Plant Growth Promoting Activities. **International Journal of Microbiology**, v. 4, 2014.

SKERKER, J. M.; SHAPIRO, L. Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 3223-3234, 2000.

SLATER S., HOUMIEL, K. L.; TRAN, M.; MITSKY, T. A.; TAYLOR, N. B.; PADGETTE, S.R.; GRUYS, K. J. Multiple beta-ketothiolases mediate poly(-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 1979-1987, 1998.

SOTO, G. E.; HULTGREN, S. J. Bacterial Adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 1059-1071, 1999.

SOWA, Y.; BERRY, R. M. Bacterial flagellar motor. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 41, p. 103-132, 2008.

SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Mass production of (polyhydroxybutyric acid) by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 24, p. 370-374, 1986.

SUZUKI, T.; DEGUCHI, H.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S.; GEKKO, K. Control of molecular weight of (poly-hydroxybutyric acid) produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquense*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 487-491, 1988.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P. et al. Methylophilic *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.

TIKHONOVA, E. B.; ZGURSKAYA, H. I. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 32116-32124, 2004.

TINSLEY, C. R.; VOULHOUX, R.; BERETTI, J. L.; TOMMASSEN, J.; NASSIF, X. Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulphide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 27078-27087, 2004.

TOYAMA, H.; ANTHONY, C.; LIDSTROM, M. E. Construction of insertion and deletion mxa 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**, 2009.

TUGGLE, C. K.; FUCHS J. A. Glutathione-reductase is not required for maintenance of reduced glutathione in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 162, p. 448-50, 1985.

THANABALU, T.; KORONAKIS, E.; HUGHES, C.; KORONAKIS, V.; SUBSTRATE-INDUCED assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 6487-6496, 1998.

TRUJILLO, M. E.; BACIGALUPE, R.; PUJIC P.; IGARASHI, Y.; BENITO, P.; RIESCO, R. L.; MEDIGUE C.; NORMAND, P. Genome Features of the Endophytic Actinobacterium *Micromonospora lupini* Strain Lupac 08: On the Process of Adaptation to an Endophytic Life Style? **Plos one**, e108522, v.9, 2014.

UEDA, S.; MATSUMOTO, S.; TAKAGI, A.; YAMANE, T. Synthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from methanol and n-amyl alcohol by methylo-trophic bacteria *Paraccocus denitrificans* and *Methylobacterium extorquens*. **Applied Environment Microbiology**, v. 58, p. 3574-3579, 1992.

UMENO, E. D.; TOBIAS, A. V.; ARNOLD, F. Diversifying Carotenoid Biosynthetic Pathways by Directed Evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 51-78, 2005.

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

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

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.

VEENENDAAL, A. K.; HODGKINSON, J. L.; SCHWARZER, L.; STABAT, D.; ZENK, S. F.; BLOCKER, A. J. The typeIII secretion system need letip complex mediate shost cell sensing and transloconinsertion. *Molecular Microbiology*, v. 63, p. 1719–1730, 2007.

VERGINER, M.; SIEGMUND, B.; CARDINALE, M.; MÜLLER, H.; CHOI, Y.; MÍGUEZ, C. B.; LEITNER, E.; BERG, G. Monitoring the plant epiphyte *Methylobacterium extorquens* DSM 21961 by real-time PCR and its influence on the strawberry flavor. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 74, p. 136-145, 2010.

VUILLEUMIER, M.; PAGNI, S. The elusive roles of bacterial glutathione S- transferases: new lessons from genomes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p.138-146, 2002.

VUILLEUMIER, S.; CHISTOSERDOVA, L.; LEE, M. C.; BRINGEL, F.; LAJUS, A.; ZHOU, Y.; GOURION, B.; BARBE, V.; CHANG, J.; CRUVEILLER, S.; DOSSAT, C.; GILLET, W.; GRUFFAZ, C.; HAUGEN, E.; HOURCADE, E.; LEVY, R.; MANGENOT, S.; MULLER, E.; NADALIG, T.; PAGNI, M.; PENNY, C.; PEYRAUD, R.; ROBINSON, D. G.; ROCHE, D.; ROUY, Z.; SAENAMPECHEK, C.; SALVIGNOL, G.; VALLENET, D.; WU5, Z.; MARX, C. J.; VORHOLT, J. A.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; WEISSENBACH, J.; ME'DIGUE, C.; LIDSTROM, M. E. "*Methylobacterium* genome sequences: A reference blueprint to Investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources." **Plos One**, v. 4, p. e5584, 2009.

WELANDER, P. V.; DOUGHTY, D. M.; WU, C.H.; MEHAY, S. ; SUMMONS, R. E.; NEWMAN, K. Identification and characterization of *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 hopanoid biosynthesis mutants. **Geobiology**, v. 10, p. 163–177, 2012.

WIECZOREK, R.; PRIES, A.; STEINBÜCHEL, A.; MAYER, F. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 2425–2435, 1995.

YAN, Q.; SREEDHARAN, A.; WEI, S.; WANG, J.; PELZ-STELINSKI, K.; FOLIMONOVA, S.; WANG, N. Global gene expression changes in *Candidatus Liberibacter asiaticus* during the transmission in distinct hosts between plant and insect. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, p. 391-404, 2013.

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

YIM, W.; SESHADRI, S.; KIM, K.; LEE, K.; SA, T. Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminas e producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenho use cond itions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 67, p. 95-104, 2013.

ZDOBNOV E. M. e APWEILER, R.. 2001. InterProScan – an integration platform for the signature-recognition methods in **InterPro**. v. 17, p. 847-848.

ZERBINO, D.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, p. 821-829, 2008.

ZÚÑIGA,POUPIN, M. J.; DONOSO, R.; LEDGER, T.; GUILIANI, N.; GUTIÉRREZ, R. A.; GONZÁLEZ, B. Quorum Sensing and Indole-3-Acetic Acid Degradation Play a Role in Colonization and Plant Growth Promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 26, p. 546-553, 2013.

RESUMO do Capítulo 2

NEVES, A. A. C. **Expressão gênica de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com a planta hospedeira *Citrus sinensis***. 2015. 32 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Methylobacterium mesophilicum SR1.6/6 (PPFM), tem sido descrito por colonizar uma variedade de plantas de forma endófitica. Esta linhagem foi isolada de ramos de citros saudável e tem sido o foco de vários estudos, a fim de compreender a interação entre SR1.6/6 e a planta hospedeira. Embora muitos estudos têm sido realizados com *Methylobacterium* spp. durante a interação com a planta hospedeira, ainda há muito a esclarecer e compreender sobre os mecanismos envolvidos durante a colonização da planta hospedeira. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de genes SR1.6/6 durante o início da colonização de *Citrus sinensis* por meio da tecnologia RNAseq. *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi inoculada em plantas de citro axênica e foram mantidos a 28°C por 5 dias sob agitação, três diferentes tratamentos foram avaliados: somente SR1.6/6 (controle); células planctônicas SR1.6/6 (em contato com os exsudatos da plantas) e SR1.6/6 da interação (células aderidas as raízes e células endofíticas). Foi obtido RNA total destes tratamentos, processado e submetido a sequenciamento de grande escala Solid. Os resultados mostraram que no tratamento plactonico muitos genes de estresse oxidativo foram super expressos, enquanto no tratamento interação muitos genes envolvidos com a formação de biofilme e sistema *quorum sensing* foram super expressos. O primeiro passo de qualquer interação entre bactérias e plantas, ocorre um reconhecimento inicial, que desencadeia uma série de mecanismos mediados por sinais moleculares das partes envolvidas. Os genes em resposta ao stress oxidativo pode ser responsável pela protecção de células contra uma explosão oxidativa desencadeada pela planta, e estes podem ser importantes para o crescimento e a adaptação do microrganismo, em seguida, algumas células podem adentrar os tecidos vegetais e, portanto precisar de genes envolvidos na adesão de superfície o que pode ser a chave para estabelecer esta interação. Estudos mais aprofundados devem ser feitos sobre os reguladores, a fim de compreender o seu papel durante a interação planta-bactéria.

Palavras chave: Pink-Pigment Facultative Methylophics (PPFM). Expressão gênica.

ABSTRACT of Chapter 2

NEVES, A. A. C. Gene expression of the interaction of *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 and the host plant *Citrus sinensis*. 2015. 32 f. Ph.D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Methylobacterium mesophilicum SR1.6/6 is aerobic pink-pigmented facultatively methylotrophic bacteria (PPFMs), it has been described to host a range of plants as endophytes. This strain was isolated from healthy citrus plant and it has been the focus of several works in order to understand the interaction between host plants and SR1.6/6. Although many studies have been performed with *Methylobacterium* spp. during interaction with the host plant, much remains to elucidate and understand the mechanisms involved in the bacterium establishment and plant colonization. The aim of this work was to analyze the genes expression of SR1.6/6 after the colonization in *Citrus sinensis* using RNAseq. *M. mesophilicum* SR1.6/6 cell suspension were inoculated in citrus axenic seedling and were kept at 28°C for 5 days under agitation, three different treatments were evaluated: only SR1.6/6 strain (control); planktonic SR1.6/6 strain (influenced by plant exudates) and SR1.6/6 strain during citrus root interaction. RNA of these treatments were obtained and carried to Solid sequencing platform. The results showed that in planktonic treatment many stress oxidative genes were up regulated, while in treatment interaction, genes involved with biofilm formation and quorum sensing system were up. The first step of any interaction between bacteria and plant, occurs involvement and initial recognition, that triggers a series of mechanisms mediated by molecular signals of the parties involved. Genes in response to oxidative stress may be responsible for protecting cells against a burst oxidative triggered by the plant, and these can be important in the growth and adaptation of the microorganism to the host environment and then some cells can enter into plant tissues and for this to happen some genes involved in surface adhesion can be key to establish this interaction. On the other hand regulators genes need to be more studied in order to understand its role during in bacteria-plant interaction.

Keyword: Pink-Pigment Facultative Methylotrophics (PPFM). Gene expression.

Capítulo 2 – Expressão gênica da interação de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com a planta hospedeira *Citrus sinensis*

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Micro-organismos endofíticos são aqueles que em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida coloniza o interior de tecidos vegetais sem causar qualquer dano aparente à planta hospedeira (PETRINI, 1991), ou ainda, micro-organismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro ou formar estruturas externas visíveis. Desta forma, são excluídos os micro-organismos epifíticos e fitopatogênicos (AZEVEDO; ARAUJO, 2007). Entretanto, essas distinções de ordem didática nem sempre correspondem às complexas relações entre os micro-organismos e os seus hospedeiros, dependendo das condições ambientais, um micro-organismo classificado como endofítico pode se comportar como um epifítico ou um patogênico (ANDREWS; HARRIS, 2000; AZEVEDO, 1998).

As bactérias endofíticas possuem a capacidade de colonizar sistemicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto, vasos condutores e, ocasionalmente, o meio intracelular, sem ocasionar qualquer dano ao hospedeiro, diferentemente de bactérias patogênicas (HARDOIM et al., 2008; QUADT-HALLMANN et al., 1996). Por meio desta colonização sistêmica, estas bactérias são capazes de alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de influenciar as populações de outros micro-organismos presentes no interior da planta (ANDREOTE et al., 2006). Embora ainda não sejam conhecidos todos os processos envolvidos nesta relação entre bactéria endofítica e a planta, sabe-se que a atividade destas bactérias podem beneficiar a planta hospedeira, aumentando o crescimento vegetal por meio da produção de fatores de crescimento (p.e., citocinina, auxina) (MEENA et al., 2012; TROTSSENKO et al., 2001) protegendo contra patógenos (p.e., indução de resistência sistêmica ou produção de antibióticos) (LACAVA et al., 2004; HOLLAND et al., 1994), aumentando a atividade fotossintética (CERVANTES-MARTINEZ et al., 2004) e disponibilizando uma maior quantidade de nutrientes (p.e., fixando nitrogênio ou solubilizando fosfato), entre outros (AZEVEDO; ARAÚJO et al., 2007; HALLMANN et al., 1997).

2.1.2 INTERAÇÃO BACTÉRIA - PLANTA

De uma forma generalista, a interação entre bactéria e a planta hospedeira pode ocorrer de forma, patogênica ou associativa. A forma patogênica pode ocorrer de diversas maneiras, geralmente, as espécies bacterianas desenvolvem métodos específicos para colonizarem os tecidos das plantas e utilizarem os nutrientes adquiridos para o seu próprio desenvolvimento, podendo ocasionar danos à planta hospedeira. Na forma associativa, a planta e a bactéria são beneficiadas, a bactéria pelos exsudatos fornecidos pela planta hospedeira e a planta pela proteção contra possíveis agentes patogênicos, ou pela utilização de alguns compostos específicos p.e. fatores de crescimento (citocinina, auxina) (MEENA et al., 2012; TROTSENKO et al., 2001), fósforo (SINGH et al., 2014), ferro (LOACES et al., 2010) fornecidos pela bactéria capazes de estimular ou auxiliar no seu crescimento e desenvolvimento da planta (PÜHLER et al., 2004).

O primeiro passo da interação planta-bactéria, para a bactéria, é o reconhecimento dos exsudatos das plantas. Tais exsudatos são compostos principalmente por açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, bem como flavonóides (LEFEVRE et al., 2013), estes são capazes de atrair micro-organismos específicos e benéficos (HARDOIM et al., 2008), e estabelecer uma interação bactéria-planta. Entretanto, a interação bactéria-planta envolve uma série de outros eventos bioquímicos, como por exemplo, grandes modificações no metabolismo celular, incluindo o acúmulo de metabolitos secundários e mudanças na fisiologia da planta (AFROZ et al., 2013; ANDREOTE et al., 2006; HAHLBROCK; BEDNAREK, 2003). Os mecanismos envolvidos nessa rede de eventos ainda não são muito bem conhecidos, e a julgar pela sua complexidade, estão longe de serem elucidados, entretanto, já existem alguns estudos de transcriptoma (KARUNAKARAN et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2012) e proteoma (GOURION et al., 2006) que visam entender essa interação bactéria-planta com foco em bactéria patogênica ou simbiótica.

Com o aumento da utilização da tecnologia de sequenciamento, muitos genomas bacterianos têm sido sequenciados, auxiliando nas análises de transcriptomas de microrganismos, resultando em uma maior identificação de genes expressos durante a interação com a planta hospedeira. Em *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros, diferentes trabalhos caracterizaram funções gênicas e rotas metabólicas envolvidas em sua virulência e na formação de biofilme (SHI et al., 2007; 2009; DA SILVA -NETO et al., 2008). Bactérias simbiontes também vêm sendo alvos de estudos de transcriptomas, como por exemplo, em *Rhizobium leguminosarum* (KARUNAKARAN et al., 2009) e

Bradyrhizobium japonicum avaliando os níveis de expressão gênica em células de vida livre bem como aquelas em nódulos durante a fixação de nitrogênio (BECKER et al., 2004; BRECHENMACHER et al., 2008; PESSI et al., 2007).

Passalacqua et al. (2009), estudaram o transcriptoma de *Bacillus anthracis* sob diferentes tempos de crescimentos sob diferentes concentrações de CO₂ e O₂, por meio da técnica de sequenciamento Solid. Foi observada uma elevada resolução no perfil de expressão de genes desta bactéria, a qual possibilitou a obtenção de novas sequências transcritas previamente não anotadas no genoma de referência.

Neste mesmo sentido, Fernandez et al. (2012) estudaram o perfil transcricional do fungo *Hemileia vastatrix* por meio da tecnologia 454-GS-FLEX Titanium durante a infecção em *Coffea arabica*. Este fungo é um patógeno da cultura de café e é responsável por limitações econômicas nesta planta. Utilizando qPCR foi observado transcritos durante esta interação, como por exemplo, genes relacionados com a doença denominada ferrugem, genes relacionados com a formação de haustórios, genes envolvidos com fatores de alongamento e metabolismo. Neste trabalho, também foram sugeridos a presença de outros genes relacionados com a ferrugem, genes que ainda não tinham sido depositados em banco de dados.

No início da década de 2000, algumas bactérias em associação com plantas fizeram parte do primeiro grupo de genomas sequenciados, tais como: bactérias simbióticas *Mesorhizobium loti* (KANEKO et al., 2000) e *Sinorhizobium meliloti* (GALIBERT et al., 2001) e a bactéria patogênica *Xylella fastidiosa* (SIMPSOM et al., 2000). O que permitiu que Van Sluyset et al. (2002) comparassem o genoma de sete bactérias colonizadoras de plantas: *Agrobacterium tumefaciens* (GOODNER et al., 2001; WOOD et al., 2001), *M. loti* (KANEKO et al., 2000), *S. meliloti* (GALIBERT et al., 2001), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) (DA SILVA et al., 2002), *X. fastidiosa* (SIMPSOM et al., 2000) e *Ralstonia solanacearum* (SALANOUBAT et al., 2002), e estudassem a estrutura genômica, principalmente quanto a organização de genes associados a interação bactéria-planta, genes envolvidos em sistemas de secreção, degradação de parede celular e respostas a estresse oxidativo. Foi observado que existem combinações diferentes de enzimas degradadoras de parede celular e genes relacionados a estresse oxidativo em todos os genomas estudados, como também foi observado que um total de 19 genes envolvidos em funções de manutenção da célula é comumente encontrado em todos os genomas estudados.

Outro estudo de interação bactéria-planta analisou a alteração da expressão gênica da planta (*Arabidopsis thaliana*) quando inoculada com *P. fluorescens* e foi observado o aumento na expressão de genes envolvidos com metabolismo, transdução de sinais e resposta ao estresse (WANG et al., 2005). Neste contexto, uma análise proteômica analisou a interação entre *Methylobacterium extorquens* (colonizando a filosfera da folha) e *Arabidopsis thaliana* (planta modelo) e observou a superexpressão de proteínas do sistema antioxidante, ressaltando o aumento da expressão do regulador PhyR como um fator importante na colonização da filosfera da folha (GOURION et al., 2006).

Desta forma, estudos de interação tem demonstrado que a presença de micro-organismos no interior de tecidos vegetais (colonizando endofiticamente) pode aumentar a aptidão da planta, como descrito anteriormente. E apesar de serem descritos um grande número de micro-organismo com potencial a serem fitopatogênicos, a maioria dessas interações permanecem assintomáticas, devido a um elaborado sistema de defesa da planta (LIPKA; PANSTRUGA, 2005) e equilíbrio da comunidade microbiana (ANDREOTE et al., 2006). Alguns trabalhos mostram que durante a interação bactéria-planta, ocorre uma mudança no perfil transcricional de ambos os organismos envolvidos, ocasionando mudanças fisiológicas na bactéria e no hospedeiro, sendo que, muitas destas mudanças devem estar associadas à manutenção e estabilidade da interação.

2.2. OBJETIVOS

Estudar a interação em SR1.6/6 e a planta hospedeira *C. sinensis*

2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Definir, esquematizar e executar o modelo experimental para o estudo da interação SR1.6/6 e o seu hospedeiro original *C. sinensis*;
- ii) Avaliar a expressão genica de alguns genes já descrito por estarem envolvidos na interação entre bactéria-planta, como ACC-deaminase, *patatin*, *crtI* e genes envolvidos com a biossíntese de hopanóides: *hpnA*, *hpnC*, *hpnD*, *hpnE*, *hpnF*, *hnpB*, *hpnL*, *hpnI*, *hpnJ*, *hpnH*, *hpnN* e *hpnK*.
- iii) Preparar material para o RNAseq
- iv) Analisar o transcriptoma da interação SR1.6/6 – *C. sinensis*.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 ISOLADO DE *M. mesophilicum* E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foi utilizada a linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum*, previamente isolada de *C. sinensis* (ARAÚJO et al., 2002). Para o estudo de interação bactéria-planta esta linhagem foi cultivada em meio SPW modificado (4 g.L⁻¹ de peptona de soja; 1g.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 até 120 h. Para a curva de crescimento esta linhagem foi cultivada em meio *Nutrient Broth* (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e meio mínimo *Hypho* (PEEL; QUAYLE, 1961) contendo 100 mL de solução fosfato (25,3 g de K₂HPO₄, 22,5 g Na₂HPO₄ em 1 L de água destilada) 100 mL de solução sulfato (5 g de (NH₄)₂SO₄, 2 g of MgSO₄ 7 H₂O em 1 L de água destilada) 799 mL de água destilada, 1 mL de metais traço (500 ml de DH₂O; 5 g de EDTA; 2,2 g de ZnSO₄7H₂O; 0,733 g de CaCl₂2H₂O; 0,506 g de MnCl₂4H₂O; 0,499 g de FeSO₄7H₂O; 0,110 g de (NH₄)₂MoO₇ x 4H₂O; 0,157 g de CuSO₄5H₂O; 0,161 g de CoCl₂6H₂O), suplementado com 15 mM de metanol como fonte de carbono (AGASHE et al., 2013; PEEL; QUAYLE, 1961).

2.3.2 CRESCIMENTO AXÊNICO DE PLÂNTULAS (*in vitro*)

As sementes de *Citrus sinensis* (Var. pineapple) foram cedidas gentilmente pela Dra. Alessandra Alves de Souza do Centro de Citricultura Sylvio Moreira em Cordeirópolis. A desinfecção superficial das sementes foi realizada por imersão das sementes em solução de hipoclorito 2% por 15 minutos, seguida de lavagem abundante com água destilada autoclavada. Estas sementes foram depositadas em papel filtro previamente autoclavado para a remoção da umidade e posteriormente semeadas em frascos contendo meio MS (MURASHIGE SKOOG, 1962). O desenvolvimento das plântulas foi realizado em condições axênicas em ambiente escuro por 15 dias, após o brotamento e pequena estiolação as plantas foram colocadas em fotoperíodo de 12 h por mais 15 dias. Após este período de crescimento, as plântulas foram transplantadas para meio MS líquido para posterior inoculação de *M. mesophilicum* SR1.6/6.

2.3.3 SELEÇÃO E PREPARO DAS PLANTAS

As plantas com aproximadamente 12 cm de altura foram transplantadas para frascos contendo 20 mL de água destilada autoclavada (2 plantas por frasco), totalizando 32 plantas para cada tratamento, e mantidas por um período de 72 h a 28 °C em câmara de crescimento com luz. Tal procedimento foi realizado para permitir que a planta pudesse exsudar, antes da inoculação da bactéria *M. mesophilicum* (SR1.6/6).

2.3.4 INOCULAÇÃO DE *M. mesophilicum* (SR1.6/6)

Para inoculação, a bactéria foi cultivada em meio SPW modificado por 72 h a 28 °C em agitador orbital (150 rpm). Após o cultivo, alíquotas de 2 mL da suspensão celular ($DO_{600nm}=2,0$) foram adicionados em cada frasco contendo as plantas transplantadas em 20 mL de água destilada. Estes frascos foram mantidos a 28 °C por 120 h, sendo ao longo do período realizadas as amostragens para análises de microscopia eletrônica. Como controle foram utilizados frascos contendo somente as plantas com adição de 2 mL de meio de cultura SPW (concentração final de 10%) para o estudo da expressão dos genes da planta (sem bactéria) e frascos com adição somente do inóculo da bactéria (sem planta) para estudo da expressão dos genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6.

2.3.5 DELINEAMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO *M. mesophilicum* (SR1.6/6) - *Citrus sinensis*

Foi desenvolvido um modelo experimental para o estudo da interação entre SR1.6/6 e a planta hospedeira, foi definido a quantidade de plantas necessárias para o estudo, bem como, o número de réplicas biológicas a serem realizadas (Figura 2.1). O tempo de interação entre a bactéria e a planta hospedeira foi estipulado por acompanhamento da colonização de SR1.6/6 na raiz e parte aérea de citros através de microscopia eletrônica e quantificação de SR1.6/6 por qPCR. As condições de cultivo da bactéria e da planta hospedeira será descrita mais adiante no texto.

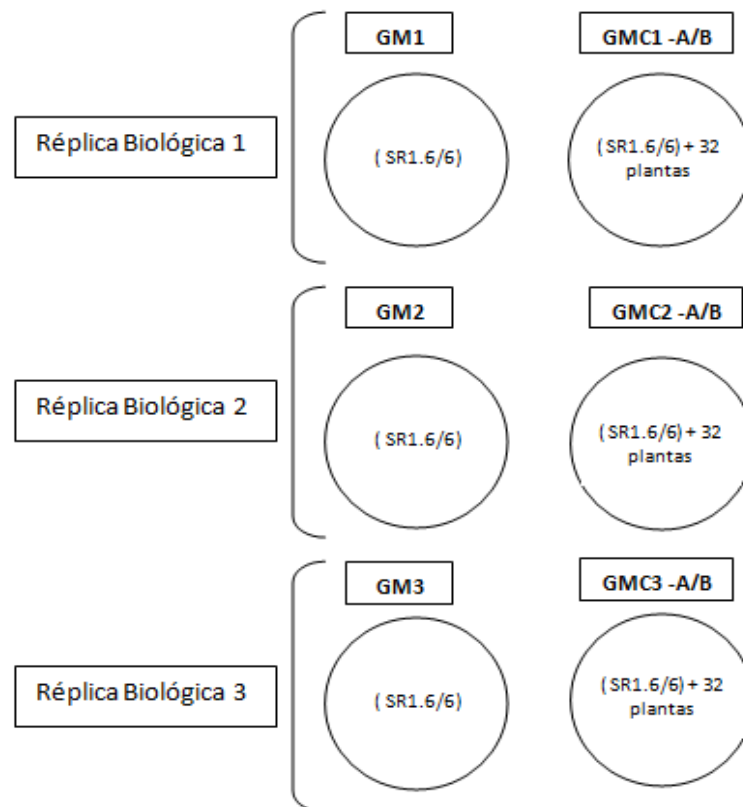


Figura 2.0 - Delineamento experimental para o estudo da interação entre SR1.6/6 e a planta hospedeira. GM1, GM2, GM3: Grupo 1, 2, 3 *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 ; GMC1, GMC2, GMC3: Grupo 1, 2, 3 *M. mesophilicum* SR1.6/6 + Citros.

2.3.6 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DA COLONIZAÇÃO DE SR1.6/6 NA PLANTA HOSPEDEIRA

Na quantificação de SR1.6/6 durante a colonização de citros por qPCR, foi utilizada uma curva padrão, realizada com diluições seriadas 1×10^7 até 1×10^1 do DNA genômico de SR1.6/6. O número de cópias do genoma, foi calculado por meio da seguinte equação:

$$\frac{274 \times 10^{-9} \times 6,022 \times 10^{23}}{6,21 \times 10^6 \text{ pb} \times 649}$$

Onde 274×10^{-9} corresponde à concentração de DNA genômico de SR1.6/6 em g/mL; $6,022 \times 10^{23}$ corresponde ao número de avogadro, ou seja, o número de moléculas existentes em 1 mol; $6,21 \times 10^6$ corresponde ao tamanho do genoma de SR1.6/6 (pb) e 649 corresponde ao peso molecular médio de 1pb de DNA.

A reação de amplificação por qPCR foi conduzida em termociclador *StepOnePlus* (Life Technologies, NY, EUA) programado para uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. Na reação de qPCR a especificidade dos *primers* foi avaliada por meio de uma curva de desnaturação com o gradiente de 60 a 95 °C variando 1 °C a cada 30 segundos. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 20 µL, contendo 2 µL de cDNA (50 ng), 0,1 µL de cada *primer* (10 µM) específicos para *M. mesophilicum*: MMC1 - TACGTGGAGAGATTCACGGTC e MMC2 - GTACAAGGCCCGGGAACGTAC (390pb) (Lacava et al., 2006) e 10 µL da solução do kit *SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies, NY, EUA).

2.3.7 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO BACTÉRIA-PLANTA

A síntese do cDNA foi realizada com 1 µg do RNA utilizando a *SuperScriptFirst-StrandSynthesis System for RT-PCR* (Life Technologies, NY, EUA) com primers randômicos, de acordo com as recomendações do fabricante.

A reação de amplificação por qPCR foi conduzida em termociclador *Step One Plus* (Life Technologies, NY, EUA) programado para uma desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 62°C. Na reação de qPCR a especificidade dos primers foi avaliada por meio de uma curva de desnaturação com o gradiente de 60°C a 96°C variando 1°C a cada 30 segundos. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 mL, contendo 2 µL de cDNA (50 ng), 10 mM de cada primer e 12,5 mL da solução do *kitPlatinum SYBR Green qPCR* (Life Technologies, NY, EUA).

A quantificação da expressão gênica por meio de qPCR foi baseada na expressão de um gene alvo (Tabela 2.1) em relação a um gene de referência *zwf* (gene com expressão constitutiva) pelo modelo matemático de *Pfaffl* que calcula a razão da expressão relativa de um gene alvo baseado na eficiência da reação de qPCR (E) e no ponto em que a fluorescência ultrapassa satisfatoriamente a fluorescência de background (Ct) de uma amostra desconhecida vs. o controle, e é expresso em relação a um gene referência, de acordo com a seguinte equação (PFAFFL, 2001).

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

Tabela 2.1 - Primers utilizados para a quantificação da expressão genica durante a interação *M. mesophilicum* *C. cinensis*.

Primer	Gene	Sequência 5' - 3'	Fragmento	Referencia
HpnA F	<i>hpnA</i>	GTTGTAGAAGGCCAGGATCG	242pb	Este estudo
HpnA R		CGCTACCGGATGTTCTTCTC		
HpnB F	<i>hpnB</i>	TGATCGACTTCTGCTCCTC	212pb	Este estudo
HpnB R		GACGAGGTCGGTCTGTATC		
HpnC F	<i>hpnC</i>	ATCTTCTCCTACGGGGTGGT	162pb	Este estudo
HpnC R		CTCACCGTGGAAAAGACCTC		
HpnD F	<i>hpnD</i>	ATGACGGATCGCTCGAC	170pb	Este estudo
HpnD R		CTCCAGCTCACCAACATCCT		
HpnE F	<i>hpnE</i>	ACGACGACTTCTGCAGATT	150pb	Este estudo
HpnE R		GATCTGCACGCCGAGATAAC		
hpnF F	<i>hpnF</i>	ATGAGAGAGGCCGTAAGCAA	230pb	Este estudo
hpnF R		GGAAATGGTGGAACAGGATG		
HpnH F	<i>hpnH</i>	TTACCCGCTTGTGATGATGA	180pb	Este estudo
HpnH R		ACTTCTTCTGGGCGATGATG		
HpnI F	<i>hpnI</i>	ACCGTGCTCAAGCCTCTCT	195pb	Este estudo
HpnI R		CCATGTTGATCAGGTTTCGAG		
HpnJ F	<i>hpnJ</i>	ACCGAACTCTACACGCATCC	159pb	Este estudo
HpnJ R		ACGCAGGAAGTCGGAGAAG		
HpnK F	<i>hpnK</i>	ACCGAACTCTACACGCATCC	159pb	Este estudo
HpnK R		ACGCAGGAAGTCGGAGAAG		
HpnL F	<i>hpnL</i>	TCTACCTGATCCAGCGGAAG	217pb	Este estudo
HpnL R		AAGCGCAGGCAGACATAGAC		
HpnN F	<i>hpnN</i>	TACTCGAACTGGTCGCTGAA	241pb	Este estudo
HpnN R		GGCTGCGGTAGTAGATGACC		
patatinF	<i>Patatin</i>	CTTCAACGCCAACCTGATG	250pb	Dourado (2010)
patatinR		CCGATCCGCTCGTAGTTCT		
PhyF	<i>crtI</i>	AATACTTCAAGCCGGTGCTG	186pb	Dourado (2010)
PhyR		GACATGCCGAGGTACTIONTGGT		
ACC Met1 F	<i>acdS</i>	GACCGGGTCGGCAACATC	200pb	Dourado (2010)
ACC Met1 R		AGCCCCCGTACTTGTGC		
ZwfrF	<i>Zwf</i>	AGCAGCTGGAACATGTGGTT	231pb	Dourado (2010)
ZwfrR		CGACGAGAGCCAGTTCTACC		

2.3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA COLONIZAÇÃO DE SR1.6/6 E A PLANTA HOSPEDEIRA

Foram coletadas amostras de raízes de citros com 24, 72 e 120 h após a inoculação da bactéria. As amostras foram imediatamente fixadas em solução *Karnovsky* modificada (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5%; em tampão cacodilato de sódio 0.05 M - pH 7,2 e CaCl₂ 0,001 M), e armazenadas a 4° C. A desidratação ocorreu por imersão sucessivas em acetona (30, 50, 70, 90 e 100% - 30 min cada). Após a desidratação as raízes foram secas ao ponto crítico (CPD 050 - Balzers), metalizadas com ouro (MED 010 - Balzers) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura de pressão variável LEO 435-VP (Cambridge Instruments-England) no Núcleo de Apoio a Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA-ESALQ/USP) pela pesquisadora Mônica Lanzoni Rossi (Centro de Energia Nuclear na Agricultura).

2.3.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ANALISE POR RNAseq

Os tratamentos avaliados neste trabalho pelo RNAseq foram: GM (controle apenas SR1.6/6); GMC-A (SR1.6.6 no meio planctônico interagindo com raízes de *C. sinensis*); GMC-BB (SR1.6/6 colonizando a raiz de *C. sinensis* endofítica e epifiticamente); GMC-BP (raiz de *C. sinensis* na presença de SR1.6/6); GC (somente raízes de *C. sinensis* sem inóculo de SR1.6/6), todos em triplicatas biológicas (Figura 2.0).

Os frascos GM, GMC-A/B(B/P) após o período de produção de exsudados e inoculação de SR1.6/6 foram mantidos a 28 °C em agitador orbital por 120h, o mesmo foi feito para os frascos GC (sem o inóculo bacteriano). Após este período as células bacterianas em suspensão do tratamento GM e GMC - A foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm a 4 °C e armazenadas em 4 mL de RNA later (Life Technologies, NY, EUA) overnight a 4 °C e mantidas em freezer -80 °C para posterior extração de RNA. As raízes de plântulas do tratamento GMC-BP e GC foram imersas em solução de RNA later (Life Technologies, NY, EUA) overnight a 4 °C e mantidas em freezer -80 °C para posterior extração de RNA.

2.3.10. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE *M. mesophilicum* SR1.6/6 E *C. sinensis*

A extração de RNA total das células bacterianas foi realizada utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, EUA). Ambas as amostras foram lisadas por meio de maceração com nitrogênio líquido, e então, a extração foi conduzida de acordo com as informações do fabricante. A concentração e qualidade do RNA obtido foram avaliadas em Qubit RNA Assay Kit (Life Technologies, NY, EUA) e em eletroforese com gel de agarose 1%.

2.3.11 PROCESSAMENTO DO RNA

2.3.11.1 Enriquecimento de RNA mensageiro (mRNA)

O enriquecimento de mRNA do RNA total extraído das amostras (GM, GMC-A, GMC-B(B/P) e GC) foi feito por meio de depleção de rRNA, pelo tempo de retenção, através de Cromatografia Líquida de alta Pressão (DHPLC - Denaturing High Pressure Liquid Chromatography) (CASTRO et al., 2013) (Transgenomic, NE, EUA). As amostras de mRNA foram quantificadas por meio do Qubit RNA Assay Kit (Life Technologies, NY, EUA).

2.3.11.2 Preparo da biblioteca de cDNA para o transcriptoma

A biblioteca de cDNA, foi construída utilizando o protocolo *SOLiD Total RNA-Seq Kit* (Life Technologies, NY, EUA). Resumidamente, após a remoção dos RNAs ribossomais, cerca de 200 ng do RNA resultante foi fragmentado com a RNase III através de incubação em um termociclador a 37 °C por 10 minutos e interrompida pela adição de 90 µl de água sem nuclease. Após a fragmentação o RNA foi concentrado e purificado por meio do *kit Ribo Minus Concentration Module* (Life Technologies, NY, EUA), e conduzido para o processo de hibridização com adaptadores e posterior preparo de amplificação da biblioteca de cDNA, produzidos por transcrição reversa, a partir de adaptadores P1 ligados à extremidade das moléculas de RNA, conforme protocolo *SOLiD™ Total RNA-SeqKit* (Life Technologies, NY, EUA). A amplificação foi realizada em um termociclador através de 15 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, sucedidos por incubação a 72 °C por 7 minutos. Então, o material amplificado foi purificado com o *kit Pure Link™ PCR Micro* (Life Technologies, NY, EUA) e o material foi quantificado em *Qubit® 2.0 Fluorometer-Invitrogen* (Life Technologies, NY, EUA) e confirmado através de eletroforese de agarose 2%. As amostras foram então ajustadas para uma concentração de 50 pg.mL⁻¹, sugerida para a PCR em emulsão.

2.3.11.3 Preparo das microesferas para sequenciamento

As fases oleosa e aquosa são preparadas separadamente, para posterior emulsão com a utilização do sistema *SOLiD EZ bead Emulsifier* (Life Technologies, NY, EUA), onde gera microgotículas de fase aquosa no interior da emulsão (micro-reatores). Após 10 minutos de emulsificação a reação foi depositada em saco apropriado para a ciclagem em *SOLiD EZ bead Amplifier* (Life Technologies, NY, EUA). Ao término da reação de emulsão foi feita uma reação de enriquecimento em sistema *SOLiD EZ bead Enricher* (Life Technologies, NY,

EUA), onde apenas as microesferas com fragmentos inseridos são capturadas. Em seguida, as esferas enriquecidas passam por uma reação de modificação da extremidade 3' com terminal transferase, para permitir adesão a lâmina de sequenciamento. As microesferas foram então depositadas para o sequenciamento conforme descrição do fabricante, produzindo leituras de até 100 nucleotídeos.

2.3.11.4 Sequenciamento do RNA em plataforma SOLiD

O sequenciamento do RNA das amostras GM, GMC-A, GMC-B(B/P) e GC foi feito por meio da técnica *SOLiD* (Life Technologies, NY, EUA) através de uma parceria com a Rede Paraense de Genômica e Proteômica, especificamente com o Laboratório de Polimorfismo do DNA - LPDNA, sob coordenação do Prof. Artur Luiz da Costa da Silva, utilizando os protocolos da (Life Technologies, NY, EUA).

2.3.11.5 Análise das sequências transcritômicas

Os arquivos obtidos tipo SAM obtidos pelo alinhamento foram convertidos ao formato BAM, ordenados e indexados utilizando o pacote samtools. Em seguida o arquivo SAM foi utilizado o pacote cuffdiff (TRAPNELL, 2012) para realizar os testes estatísticos dos transcritos entre os tratamentos utilizando como referência o arquivo em formato gtf. A partir dos dados obtidos foram criados os gráficos e a tabela de expressão relativa utilizando o do pacote *Cumme R bund library* que roda no software R (TRAPNELL, 2012).

2.3.11.6 Mapeamento do transcriptoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6

Os dados provenientes do sequenciamento SOLiD 5500xl em formato xsq foram convertidos via pacote XQSTOOLS para *color space* e seu correspondente arquivo de qualidade. Em seguida, as bases e sequências com pontuação Phred inferior a 20 foram excluídas. Além disso, as sequências correspondentes à porção F3 foi reduzida na sua extremidade 3' de 75 bases para 60 bases a fim de remover parte com qualidade inferior. Utilizando o Bowtie (LANGMEAD et al., 2009) e sequências de rRNA e tRNA como referência foram subtraídas as sequências que apresentaram alinhamento com as mesmas. As sequências resultantes que não apresentaram similaridade com rRNA e tRNA foram utilizadas para o mapeamento com o programa *Bowtie* novamente, entretanto, utilizando como referência o Genoma de *M. mesophilicum* SR1.6/6.

2.4. RESULTADOS

2.4.1 ISOLADO DE *M. mesophilicum* E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum*, é uma bactéria de crescimento lento, foi realizada uma curva de crescimento em meio rico *Nutrient Broth* (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e meio mínimo *Hypho* (PEEL; QUAYLE, 1961) suplementado com 15 mM de metanol como fonte de carbono, e foi observado que esta linhagem tanto em meio rico (Figura 2.1) quanto em meio mínimo (Figura 2.2) entra em fase exponencial de crescimento em 16 h, atingindo a fase estacionária entre 44 e 48 h.

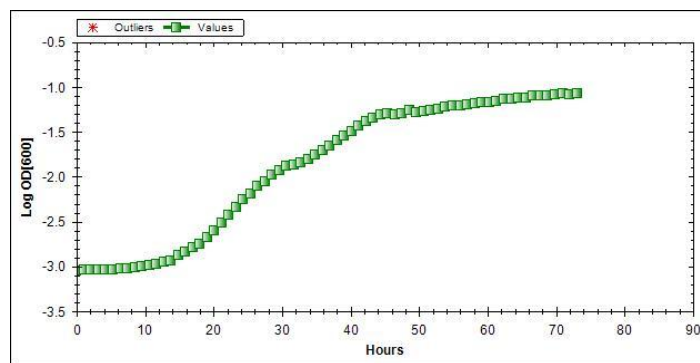


Figura 2.1: Curva de crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 em meio *Nutrient Broth* Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

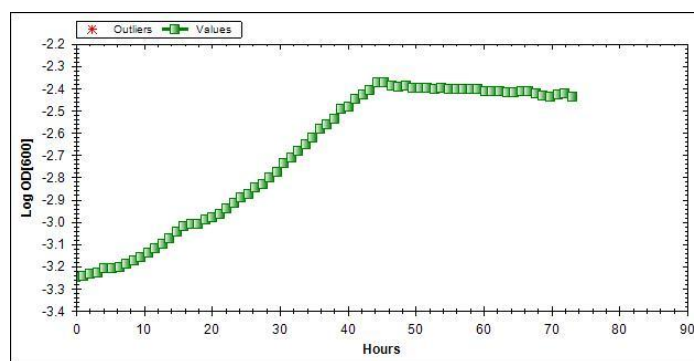


Figura 2.2: Curva de crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 em meio mínimo (HYPHO - PEEL e QUAYLE, 1961).

2.4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.4.2.1 PCR em tempo real da colonização de SR1.6/6 e a planta hospedeira

O experimento foi conduzido de acordo com o delineamento experimental esquematizado na Figura 2.0. O tempo de interação bactéria-planta foi estipulado por meio de

acompanhamento da colonização da bactéria pela raiz da planta através de microscopia eletrônica e qPCR. Foi observado que após o inóculo de SR1.6/6 em frascos contendo citros, a colonização ocorreu de forma eficiente, sendo quantificada via qPCR de raízes e parte aérea da planta, após 1, 3 e 5 dias de interação (Figura 2.3, 2.4), indicando que esta linhagem SR1.6/6 é capaz de colonizar citros *in vitro* nas condições avaliadas.



Figura 2.3 - Tratamentos GM (SR1.6/6) somente a bactérias no meio de cultura, GMC-A (SR1.6/6 + citros) bactérias influenciadas pelos exsudados da planta e GMC-B (SR1.6/6 + citros) bactérias aderidas às raízes e bactérias do interior das raízes.

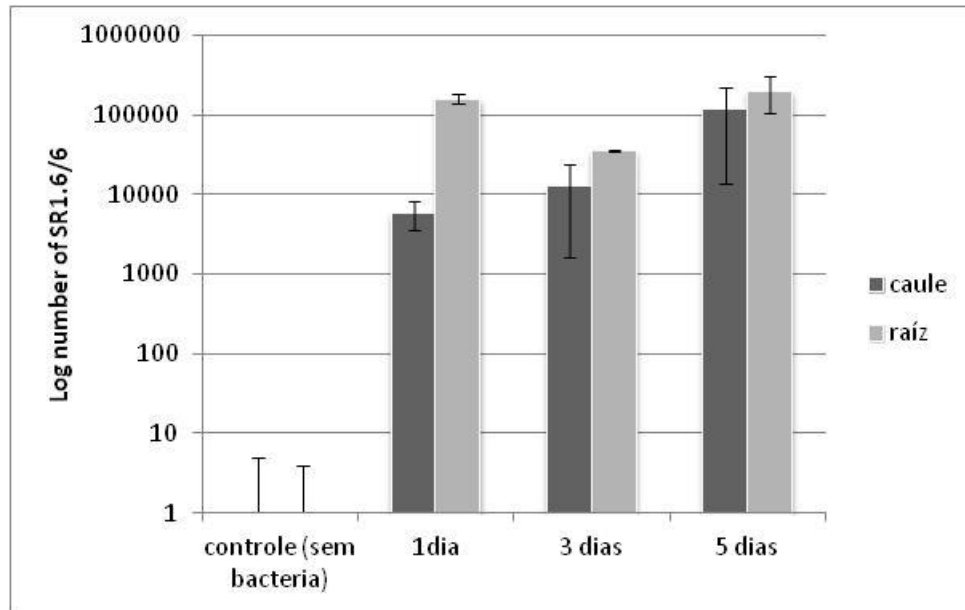


Figura 2.4 - Monitoramento por qPCR de SR1.6/6 em colonização de raízes e caule de *C. sinensis*, após 1, 3 e 5 dias de interação.

2.4.2.2 Microscopia eletrônica da colonização de SR1.6/6 e a planta hospedeira

Foi observado que a formação de biofilme ocorre após 3 dias de interação (Figura 2.5) e posteriormente ocorre um aumento do número de células e a maturação do biofilme. Dessa forma, o objetivo do trabalho além de avaliar a expressão gênica de células planctônicas influenciadas pelos exsudatos da planta, foi também avaliar a expressão genica de *M. mesophilicum* SR1.6/6 durante a interação bactéria-planta.

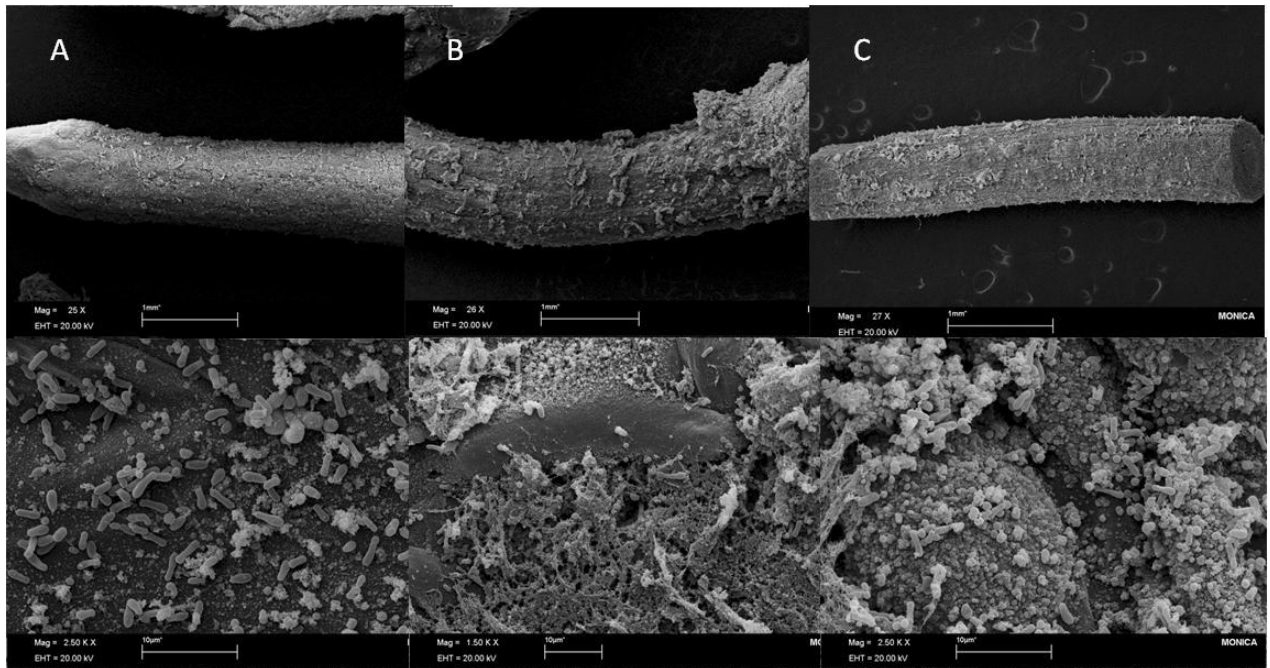


Figura 2.5 - *Methylobacterium mesophilicum* (SR1.6/6) na superfície de raiz de *Citrussinensis*. (A) 24 h após a inoculação, (B) 72 h após a inoculação e (C) 120 h após a inoculação.

2.4.2 EXTRAÇÃO E PROCESSAMENTO DO RNA

Foram obtidos RNA de boa qualidade de todas as amostras avaliadas, analisadas por gel de agarose 1%. A presença das bandas referentes ao RNA 23S e 16S no gel de agarose mostrou que o RNA estava íntegro. Foram realizadas 4 corridas contendo 15 µg de RNA total, recuperando cerca de 200 ng de mRNA quantificadas pelo *Qubit*. As amostras apresentaram perfis semelhantes e compatíveis com o descrito para esta metodologia de depleção utilizando DHPLC (Figura 2.6). O mRNA de cada amostra foi coetado entre o período de 12 a 16 minutos (Figura 2.7) e submetido a uma nova coleta para visualização do padrão de mRNA descrito na literatura apresentando somente mRNA, eliminando desta forma, o rRNA (Figura 2.8).

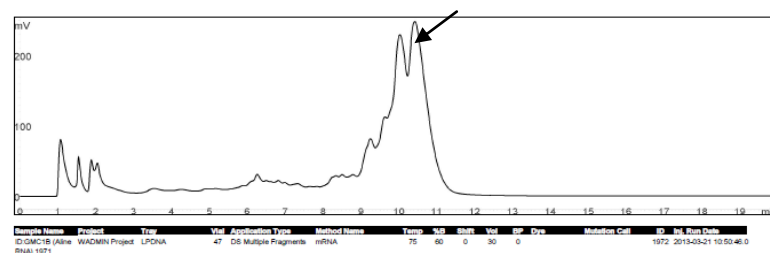


Figura 2.6 - Padrão RNA ribossomal evidenciado pela seta, obtido por DHPLC - *Equipamento Transgenomic*.

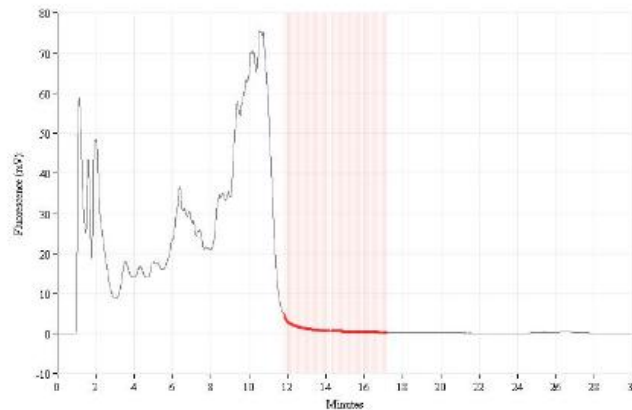


Figura 2.7 - A área evidenciada representa o tempo de coleta para a amostra e mRNA por meio de DHPLC - Equipamento Transgenomic, NE, EUA).

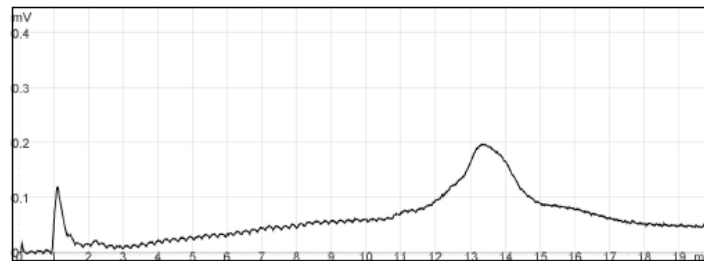


Figura 2.8 - Padrão RNA mensageiro, após a depleção de RNA ribossomal por meio de DHPLC - Equipamento Transgenomic, NE, EUA).

Após a depleção de rRNA, todas as amostras das triplicatas biológicas foram submetidas a construção das bibliotecas no SOLiDTM - *SOLiD Total RNA-Seq Kit Protocol* (Life Technologies, NY, EUA) para o sequenciamento e posterior análise dos dados do RNAseq da interação bactéria-planta.

2.4.3 PCR QUANTITATIVO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO BACTÉRIA-PLANTA

A análise de PCR quantitativo em tempo real permitiu estudar a expressão de genes associados com a interação bactéria-planta: *crtI*, *acdS*, *patatin* em duas condições: 1) planctônico - células bacterianas em solução em contato com os exsudatos da raiz da planta hospedeira e 2) interação - células bacterianas em contato com a raiz da planta hospedeira (Figura 2.9). A especificidade da reação foi avaliada através da visualização das curvas de desnaturação, apresentando picos únicos.

Foi observado que o gene *crtI* foi reprimido durante a interação. Já o gene *acdS* codificador de ACC-deaminase e o gene *patatin* foram induzidos durante a interação (Figura 2.10).

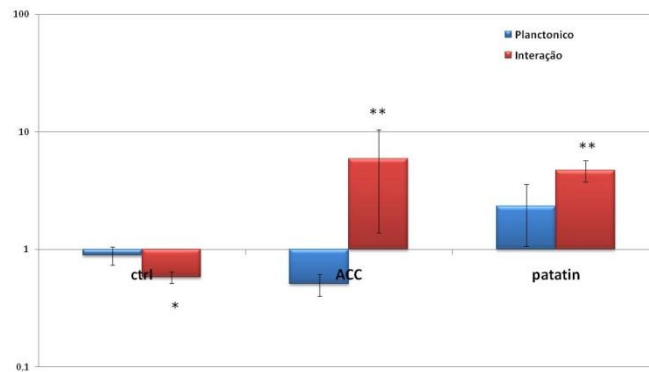


Figura 2.9 - Expressão gênica dos genes *crtI*, *acdS*, *patatin*, durante a interação com os exsudatos e com a planta hospedeira comparado com o controle SR1.6/6 em água suplementada com 10% de meio SPW modificado. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *zwfE* as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,01$); **diferença significativa no teste T ($p < 0,05$).

Foram analisados também a expressão gênica de genes envolvidos na biossíntese de hopanóides (*hpnA*, *hpnC*, *hpnD*, *hpnE*, *hpnF*, *hpnB*, *hpnL*, *hpnI*, *hpnJ*, *hpnH*, *hpnN* e *hpnK*) por meio de PCR quantitativo avaliando os mesmos dois tratamentos acima (planctônico e interação) e foi observado uma diferença na expressão dependendo do tratamento avaliado.

Durante a interação de SR1.6/6 e *C. sinensis* foi observado que a maioria dos genes avaliados foram induzidos na presença de citros, exceto os genes *hpnF* e *hpnH* que foram significativamente reprimidos. Sendo que o gene *hpnF* foi mais reprimido no tratamento interação do que no tratamento planctônico, o gene *hpnB* foi induzido de forma significativa no tratamento planctônico, o gene *hpnH* foi mais reprimido no tratamento planctônico do que no tratamento interação (biofilme + endofítico) e o gene *hpnK* foi induzido de forma significativa no tratamento interação (biofilme + endofítico) (Figura 2.10).

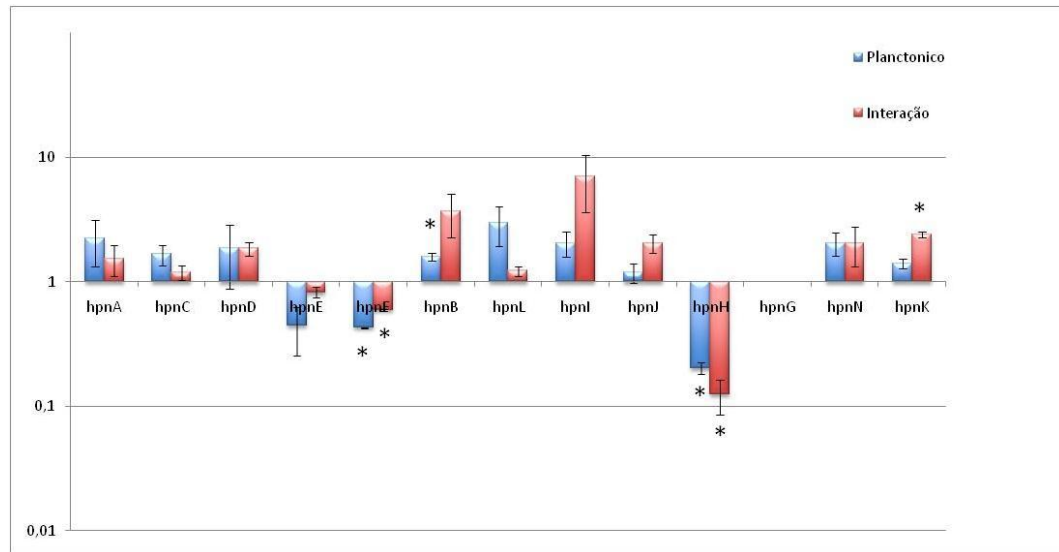


Figura 2.10 - Expressão gênica dos genes envolvidos na biossíntese de hopanóides, comparado com o controle SR1.6/6 em água suplementada com 10% de meio SPW modificado. Os valores apresentam médias de medidas de expressão gênica relativa ao gene normalizador *zwfE* as barras indicam o desvio padrão das três repetições biológicas realizadas e a escala do gráfico é logarítmica - *diferença significativa no teste T ($p < 0,01$).

2.4.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS TRANSCRIPTÔMICAS

Foi realizado o sequenciamento *paired-end* (F3 e F5) de triplicatas para cada tratamento, sendo obtido um número bastante expressivo para cada amostra variando de 36229441 a 154439628 de leituras para todos os tratamentos (Tabela 2.2). Visando aplicar a mesma metodologia para todas as condições, foi realizada a trimagem das extremidades 3' em 15 bases, que ao final ficaram leituras de F3 (60pb) e F5 (35pb).

Para todas as amostras foi aplicado um filtro PHRED 20 seguido de filtro para retirada de RNA ribossômicos, pois, embora tenha sido feito o enriquecimento ainda assim é esperado sequenciar alguns RNA ribossômicos. Após estes filtros, a leituras foram mapeadas contra o genoma de referência (SR1.6/6), entretanto, foi observado que para algumas amostras poucas leituras foram mapeadas, variando de 10 a 95% (Tabela 2.2). Esta diferença entre a porcentagem dos mapeados provavelmente deve-se ao fato da diferença no número das leituras e de leituras de boa qualidade das amostras avaliadas, além do que especialmente para o tratamento GMC-B(B/P), a metodologia utilizada para a extração de RNA, de certa forma, favorecia a extração de RNA de raízes de plantas, devido a pequena quantidade de células bacterianas deste tratamento, além do mais, neste processamento, em uma mesma linha da placa (*flowchip*) de sequenciamento havia mRNA de planta e de bactéria, obtidos por maceração da raiz da planta em contato com a bactéria, desta forma, uma melhor metodologia para analisar estes dados deverá ser estudada. Porém, mesmo com o baixo número de leituras

mapeadas para algumas amostras, foi possível avaliar os genes diferencialmente expressos entre os tratamentos avaliados, devido ao elevado número de leituras obtidas (Anexo B).

Os três tratamentos avaliados (GM, GMC-A e GMC-B) foram obtidos de triplicatas biológicas, a fim de tornar a análise mais robusta, onde para cada gene ser considerado realmente diferencialmente expresso o mesmo deve apresentar o mesmo padrão nas triplicatas, neste contexto foi observado que o tratamento mais homogêneo foi o tratamento GMC-A, ou seja, as replicas apresentaram um padrão de expressão gênica bastante semelhante (Figura 2.11).

Tabela 2.2 - Dados do sequenciamento dos transcritos das amostras GM (controle), GMC - A (plactônico), GMC-B (biofilme + endofítico).

Amostras	TOTAL Leituras	PHRED 20	Mapeados	% Mapeados
GM1 F3	36634017	18488394	1610958	8,713347411
GM1 F5	36634017	34578578	4683240	13,54376111
GM2 F3	48646042	24079150	1692198	7,027648401
GM2 F5	48646042	46239558	4294732	9,288004007
GM3 F3	39218490	18984615	1173693	6,182337646
GM3 F5	39218490	36854065	4596035	12,47090382
GMC1-A F3	42092771	24221281	2605106	10,7554427
GMC1-A F5	42092771	38791304	5625601	14,50222194
GMC2-A F3	42424432	23542184	1635566	6,947384321
GMC2-A F5	42424432	40030512	4347116	10,85950637
GMC3-A F3	43926584	24615142	1128821	4,585880512
GMC3-A F5	43926584	41667174	3012622	7,230204765
GMC1-B F3	154439628	135183878	14476	0,009373242
GMC1-B F5	154439628	145507048	104133	0,067426347
GMC2-B F3	118638961	95862484	13219	0,011142208
GMC2-B F5	118638961	112087073	66800	0,056305281
GMC3-B F3	36229441	121736607	27466	0,075811272
GMC3-B F5	36229441	130484912	120994	0,333965959

Foram obtidos no tratamento plactônico (GMCA) em relação ao controle (GM), 55 genes diferencialmente expressos e no tratamento biofilme + interação (GMC-B) em relação ao controle (GM), 130 genes diferencialmente expressos (Tabela 2.3; 2.4). Na análise (GMC-A) em relação a (GMC-B) foram obtidos 75 genes diferencialmente expressos. Dentre estes valores apresentados, foram evidenciados alguns genes super expressos e reprimidos nos tratamentos avaliados, como por exemplo, foi observado a super expressão de genes

envolvidos com a resposta a estresse oxidativo no tratamento GMC-A, tioredoxina (MmSR116_5376), cisteína síntase (MmSR116_4485), gene codificador de uma proteína da família CsbD (MmSR116_2413), gene codificador de proteína WrbA (MmSR116_5130), gene codificador do sistema tol-pac associado com acil-CoAtioesterase (MmSR116_4119) e no tratamento GMC-B, apenas o gene tioredoxina (MmSR116_5486) em relação ao controle.

Foi observado também a super expressão de genes associados com a formação de biofilme em GMC-A, gene codificador de polissacarídeo de acetilase (MmSR116_1618) e em GMC-B, gene codificador de luciferase monooxigenase (MmSR116_4453), lipoproteína CpaD YjbE (MmSR116_1115), e observado a repressão de um gene contendo domínio peptidoglicano em GMC-A e outro gene codificador de proteína PilZ do tipo IV em GMC-B, todos eles em relação ao controle.

Tabela 2.3 - Genes diferencialmente expressos nos tratamentos GMC-A (planctônico) e GMC-B (interação) comparados com o tratamento controle GM (sem inóculo da bactéria).

Tratamento	Genes induzidos	Genes reprimidos
GMC-A	49	6
GMC-B	54	76

Tabela 2.4 - Genes diferencialmente expressos em comparação aos tratamentos GMC-A (planctônico) e GMC-B (interação).

Tratamento	Genes induzidos	Genes reprimidos
GMC-A	74	1
GMC-B	1	74

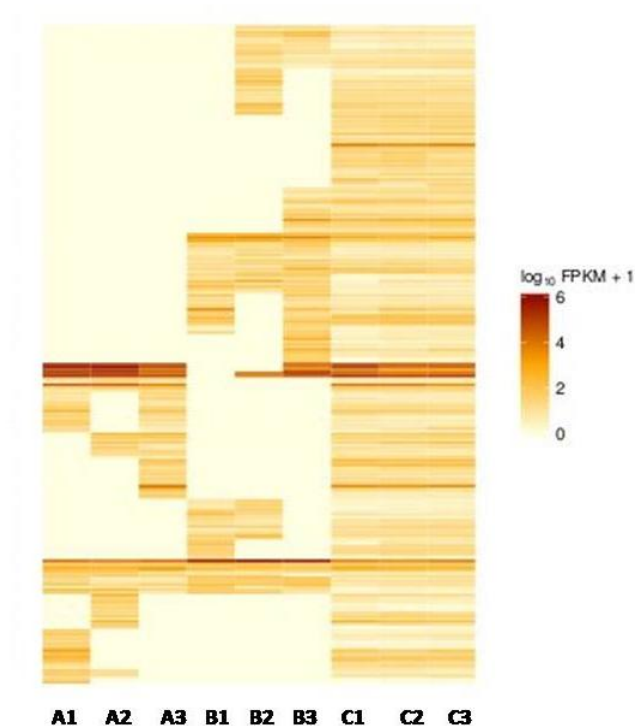


Figura 2.11 - Gráfico *heatmap* dos tratamentos GM (A1, A2, A3); GMC-B (B1, B2, B3); GMC-A (C1, C2, C3) mostrando que a triplicata GMC-A foi o tratamento mais homogêneo entre as triplicatas.

2.5 DISCUSSÃO

A linhagem SR1.6/6 de *M. mesophilicum* foi isolada como endofítica de ramos de planta sadia de citros e foi sugerido que esta linhagem pode interagir com *Xylella fastidiosa* (ARAÚJO et al., 2001; LACAVA et al., 2004). Foi sugerido que a presença da bactéria endofítica *M. mesophilicum* em tecidos internos de plantas assintomáticas de citros (que apresentam *X. fastidiosa*) poderia estimular a produção de compostos ou elicitar, de alguma forma, um aumento na resistência destas plantas à *X. fastidiosa* ou reduzir o crescimento deste fitopatógeno vascular (LACAVA et al., 2004; 2006), desta forma, este endófito poderia limitar o estabelecimento de *X. fastidiosa* em plantas assintomáticas (ARAÚJO et al., 2001).

Posteriormente foi observada a colonização desta linhagem em diversas espécies de plantas, sendo que, o sucesso da colonização é dependente da espécie da planta e de seu estágio de desenvolvimento (ANDREOTE et al., 2010; DOURADO et al., 2013). Porém, pouco se conhece sobre os mecanismos deste endófito na colonização da planta hospedeira sem ocasionar danos aparentes. De uma forma geral, muitos estudos têm sido realizados acerca dos micro-organismos endofíticos, quanto a sua diversidade e a sua especificidade em

colonizar a planta hospedeira, para mmelhor entender e avaliar esta associação entre bactéria e planta.

A interação entre micro-organismos e plantas hospedeira, seja ela benéfica ou patogênica, envolve uma série de eventos bioquímicos, que podem alterar, por exemplo, o metabolismo celular dos envolvidos nesta interação (AFROZ et al., 2013; HAHLBROCK; BEDNAREK, 2003). Apesar de serem descritos um grande número de micro-organismos potencialmente fitopatogênicos, a maioria dessas interações são assintomáticas, devido a um elaborado sistema de defesa da planta (LIPKA; PANSTRUGA, 2005) e equilíbrio da comunidade microbiana (ANDREOTE et al., 2006).

No presente trabalho, para avaliar o modelo de interação antes de realizar o sequenciamento em larga escala dos transcritos, foi realizado um estudo de expressão gênica por qPCR de alguns gene descritos na literatura por estarem envolvidos em alguns processos de interação bactéria-planta, e foi observado que o gene *crtI* foi reprimido de forma significativa no tratamento interação (biofilme + endofíticos). O gene *crtI*, codifica a enzima fitoeno desidrogenase que catalisa uma série de reações de desnaturação do fitoeno resultando na síntese direta do licopeno, que são carotenóides e que resultam na proteção da célula contra danos oxidativos, diferentes tipos de radiações e dissecação (XU et al., 2007), portanto, nesta condição avaliada, a bactéria SR1.6/6 não ativa seu sistema de defesa por este gene *crtI*, asism como Dourado et al (2013) também observou durante a interação entre SR1.6/6 e eucalipto e arroz.

Foi observado também que o gene *acdS*, codificador de 1-aminociclopropano-1-carboxilate (ACC-deaminase) foi induzido de forma significativa no tratamento interação em relação ao tratamento controle. A ação de ACC-deaminase pode diminuir os níveis de etileno diminuindo a resposta a estresse da planta, facilitando o estabelecimento da interação (GLICK et al., 1998; 2013; HARDOIM et al., 2008) e conseqüentemente promovendo o crescimento do vegetal (KAWK et al., 2014). O gene *patatin* (MmSR166_3177) foi significamente induzido também no tratamento interação. Os genes da família patatin codificam fosfolípases responsáveis pela hidrólise de fosfolipídios, que são utilizadas por bactérias patogênicas na colonização eficaz do hospedeiro, onde os fosfolipídios da membrana são hidrolisados, resultando na perda da integridade da membrana e citotoxicidade (BANERJI et al., 2008), porém, recentemente genes da família patatin foram associados como parte do sistema de secreção do tipo vd, normalmente associado com as interações (LEO et al., 2012). Desta

forma, é necessário um melhor estudo a cerca deste gene para entender a relação do gene *patatin* na interação SR1.6/6 e a planta hospedeira.

A expressão de genes envolvidos com a biossíntese de hopanóides também foi avaliada durante a interação de *M. mesophilicum* SR1.6/6 com citros. A produção de moléculas de hopanóides depende da ciclagem de esqualeno (ROHMER et al., 1984) que tem como resultado um triterpenóide pentacíclico modificado por insaturações, metilações e/ou adição de cadeias laterais, estas moléculas compõem a membrana celular de algumas bactérias incluindo *Methylobacterium* spp. (BRADLEY et al., 2010), e conferem rigidez e estabilização da membrana, além de regular a sua fluidez e permeabilidade (WELANDER et al., 2009), a ausência de hopanóides não influencia no crescimento da bactéria (SEIPKE; LORIA, 2009; WELANDER et al., 2009). Entretanto, pode afetar a tolerância ao estresse em ambientes extremamente ácidos (JONES et al., 2012), tolerância a compostos tóxicos como o diclorometano (DCM) (MULLER et al., 2011); afetar a resistência a antibióticos (MALOTT et al., 2012) e a motilidade bacteriana (SCHMERK et al., 2011). Estruturas de hopanóides podem ser de duas classes: hopanóides simples com esqueleto C30 (p.e. diplopteno) e hopanóides composto (p.e. com adição de grupo amino e/ou grupos hidroxil, como bacteriohopanotetrol).

Os hopanóides podem estar envolvidos no processo de interação entre bactéria-planta (LÓPES-LARA et al., 2003), hipótese também sugerida na ecologia de *Frankia* sp. onde foi observada diferença na expressão de genes de hopanóides em diferentes ambientes (NALIN et al., 2000). Neste sentido, Dini-Andreote (2011) iniciou um estudo do padrão de expressão de genes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 durante a interação com soja e foi observado que a bactéria SR1.6/6 quando em biofilme sobre as raízes da planta aumenta a expressão do gene *hpnH*, que codifica uma proteína com radical SAM, envolvida com a adição de adenosinas no esqueleto de hopano, convertendo diplopteno à hopano adenosil (SCHMERK et al., 2015). O gene *hpnH* juntamente com o gene *hpnG* são essenciais para a produção de moléculas de hopanóides C35, incluindo a produção de bacteriohopanotetrol (BHT), BHT glucosamina e BHT ciclitol (SHUMERK, et al., 2015). Desta forma, a deleção do gene *hpnH* em *Burkholderia cenocepacia* (SHUMERK, et al., 2015), em *M. extorquens* (BRADLEY et al., 2010) e em *R. palustris* (WELANDER et al., 2012) resultou na produção de hopanóides C30.

Na presença de citros, o gene *hpnH* foi reprimido, mas o gene *hpnK* envolvido com a deacetilação de BHT acetil glicosamina resultando em BHT glicosamina e o gene *hpnJ* envolvido na conversão de BHT glicosamina à BHT ciclitol, foram induzidos no tratamento

interação. A deleção dos genes (*hpnI*, *hpnJ* e *hpnK*) em *Burkholderia cenocepacia* não afetou a taxa de crescimento na presença de detergente, porém a ausência destes genes resultou em sensibilidade a pH ácido e ao antibiótico polimixina B (SHUMERK, et al., 2015).

M. mesophilicum SR1.6/6 quando em associação com citros parece acumular esqualeno, uma vez que o gene de ciclagem (*hpnF*) foi reprimido, porém pode ser sugerido que esta bactéria modifica moléculas de hopanóides vindo da planta, por exemplo, já que o *hpnK* foi induzido. A utilização destas moléculas durante esta interação continua sendo desconhecida e, desta forma, estudos de mutantes com nocautes em genes envolvidos com a biossíntese de hopanóides devem ser realizados.

Após esta análise inicial de expressão de genes, foi realizado conforme o delineamento experimental uma análise utilizando o sequenciamento em larga escala (RNAseq), onde foi possível avaliar a expressão de todo o genoma de SR1.6/6 em associação com *C. sinensis*.

Desta forma, foram comparados os tratamentos (GM x GMC-A); (GM x GMC-B) e (GMC-A x GMC-B). Era esperado encontrar a expressão de genes já descritos por estarem envolvidos durante o processo de interação bactéria e planta, conforme descrito no capítulo 1, porém, neste trabalho, a maior ênfase foi dada aos genes que tiveram expressão diferencial significativamente diferente entre os tratamentos. Pois, o tratamento controle adotado neste modelo experimental pode também ser considerado um ambiente de estresse para a bactéria e para a planta, sendo então necessário o auxílio de genes envolvidos com a adaptação ao ambiente em ambos os tratamentos, desta forma, neste trabalho o objetivo foi entender a resposta da bactéria na presença da planta no início da colonização neste modelo experimental. Desta forma, os genes diferencialmente expressos entre os tratamentos avaliados demonstram que a presença da planta foi o fator limitante para a expressão significativamente diferente entre os tratamentos.

Durante o início de qualquer interação entre planta, bactéria e ambiente ocorre um envolvimento e reconhecimento inicial desencadeando uma série de mecanismos mediados por sinais moleculares das partes envolvidas. Exsudatos radiculares influenciam o reconhecimento, a formação de biofilme e a colonização por *Methylobacterium* pp. (ROSSETO et al., 2011). Foi observada a indução de genes de respostas a estresse oxidativo, uma forma de proteger as células contra o “burst” oxidativo desencadeado pela planta, que é uma das estratégias iniciais de defesa contra patógenos (WOJTASZEK, 1997).

Neste contexto, foram encontrados diferencialmente super expressos no tratamento planctônico (GMC-A) quando comparado com o controle (GM) genes tioredoxina

(MmSR116_5376) e cisteína sintase (MmSR116_4485). Em muitos organismos, moléculas de glutatona e tioredoxina que contêm cisteína tem a função de manutenção intracelular, reduzindo e protegendo as células contra estresse oxidativo (CARMEL-HAREL; STORZ, 2000). Foi observado também a super expressão de um gene codificador de uma proteína da família CsbD (MmSR116_2413) e de uma Flavoproteína WrbA (MmSR116_5130) também envolvido com a resposta a estresse oxidativo (AKBAR et al., 1999; ANDRADE et al., 2007). No tratamento GMC-B foi observado a expressão diferencial de menos genes relacionado a estresse oxidativo, apresentando somente a super expressão do gene tioredoxina (MmSR116_5486). Estes resultados sugerem que o ambiente planctônico pode ser considerado mais agressivo para a célula de SR1.6/6 sendo necessário a expressão de mais genes de resposta a estresse oxidativo permitindo a adaptação neste ambiente. Ainda neste sentido, foi observado no tratamento GMC-A a super expressão do gene codificador de um sistema *tol-pal* associado com acil-CoA tioesterase, (MmSR116_4119), que pode estar envolvido com expulsão de compostos tóxicos da célula (VALDÉS et al., 2008).

Bactérias Gram-negativas possuem um mecanismo de comunicação denominado sistema *quorum sensing*, o qual é responsável pela regulação de inúmeras características fenotípicas durante a interação com plantas, como por exemplo, a formação de biofilme (LIU et al., 2011). Durante a interação entre SR1.6/6 e *C. sinensis* foi observada a super expressão do gene codificador de luciferase monooxigenase (MmSR116_4453) no tratamento GMC-B. A luciferase faz parte do complexo *quorum sensing*, e pode auxiliar na formação de biofilme, principalmente durante a colonização da superfície da planta pela bactéria. A formação de biofilme depende também de adesinas, pilus e EPS (exopolissacarídeo), auxiliando a fixação das células sobre a superfície em especial servindo como base para a colonização endofítica (ANDREOTE et al., 2006). Kwak et al. 2014 relataram a presença de genes envolvidos na biossíntese de pilus de tipo IV e adesinas em *M. oryzae* CBMB20, e sugeriu que os produtos desses genes, envolvidos na adesão a superfície e formação de biofilme, está diretamente envolvido com a colonização de tecidos vegetais por *Methylobacterium* spp.

Foi observado por meio de microscopia eletrônica e qPCR que esta linhagem durante a colonização das raízes de citros forma biofilme com 3 dias de interação e posteriormente ocorre um aumento do número de células e a maturação deste biofilme. Esta linhagem tem o crescimento lento, apresentando uma curva exponencial de crescimento em meio rico e meio mínimo entre o período de 24-48 h (Figura 2.2 e 2.3), o que não parece interferir na colonização de citros, pois, este é o gênero mais abundante em associação com esta planta

(ARAÚJO et al., 2002). Rosetto et al (2011), verificou que a colonização desta linhagem em cana-de-açúcar forma biofilme após 2 dias de interação, entretanto, após estabelecida a colonização, esta linhagem se propaga de forma mais rápida dentro da planta e continua a formar biofilme por até 6 dias após a interação. Neste trabalho, foi observado a super expressão de uma quantidade maior de genes envolvidos com a formação de biofilme no tratamento GMC-B (células do biofilme e endofíticas), como: lipoproteína CpaD (MmSR116_5676) envolvido na biogênese de pilus e a proteína YjbE (MmSR116_1115) envolvido com a produção de EPS. No tratamento GMC-A e GMC-B foi super expresso o gene codificador de polissacarídeo de acetilase (MmSR116_1618) descrito em *Stenotrophomona smaltophilia* por estar envolvido com a formação de biofilme (ALAVI et al., 2013). Porém foi também observado repressão de alguns genes também envolvidos com a formação de biofilme em ambos os tratamentos como: um gene contendo domínio peptideoglicano (MmSR116_0967) no tratamento GMC-A e um gene codificador de PilZ pertencente ao sistema tipo IV (MmSR116_3545) no tratamento GMC-B, gene envolvido na biogênese de pilus, que pode influenciar a motilidade bacteriana. Era esperado que houvesse a super expressão de genes envolvidos com a formação de biofilme nos tratamentos avaliados, pois o biofilme seria a base da colonização das raízes, entretanto, é necessário um estudo mais aprofundado a respeito desses genes para melhor entender a importância de cada um deles, uma vez que foi observada a repressão de genes envolvidos com a formação de pilus, estrutura também importante durante a colonização. Foi observado também que alguns genes reguladores foram super expressos e outros reprimidos em ambos os tratamentos avaliados, sendo necessário um estudo mais aprofundado do papel destes reguladores durante a interação.

Foram também realizadas análises de expressão diferencial comparando os dois tratamentos envolvendo a presença da planta (GMC-A – GMC-B) e foi observado uma maior expressão genica no tratamento GMC-A em relação ao tratamento GMC-B, como por exemplo, genes envolvidos com o sistema de secreção (MmSR116_1031), reguladores transcricionais, MmSR116_1262, MmSR116_0293, MmSR116_2645, MmSR116_3069, MmSR116_3925, genes envolvidos na biossíntese de auxina: nitrila hidratase subunidade alfa (MmSR116_5790) e beta (MmSR116_5791). Nesta análise somente um gene apresentou expressão maior no tratamento GMC-B, este gene foi o esqualenohopanociclase, este gene é descrito como o precursor da biossíntese de hopanóides, porém este gene foi reprimido nas análises inicial de qPCR. Através deste resultado, pode ser sugerido que as células em contato

com os exsudatos da planta respondem inicialmente à um ambiente adverso, para que então ocorra a adaptação das células permitindo a colonização do interior da raiz, podendo colonizar sistematicamente o hospedeiro, como monitorado por qPCR, onde no quinto dia de colonização foi observado uma quantidade maior de células nas raízes e caule de citros.

Desta forma, embora estudos tenham sido realizados a fim de entender as estratégias de colonização da planta hospedeira por *Methylobacterium* spp. que resultam na promoção de crescimento vegetal, muito ainda falta para elucidar e entender os mecanismos fisiológicos envolvidos durante o estabelecimento, colonização inicial e tardia da planta hospedeira. Para um melhor entendimento pode ser interessante o monitoramento da expressão de genes, especialmente aqueles envolvidos com a produção de ACC desaminase e *patatin*, bem como os genes envolvidos com a produção de hopanóides, a fim de entender as funções desses genes não somente no estabelecimento e colonização inicial da planta hospedeira, mas também o padrão gênico desses genes após períodos maiores de interação.

REFERÊNCIAS* do Capítulo 2

- AFROZ A., ZAHUR M., ZEESHAN N., KOMATSU S. Plant-bacterium interactions analyzed by proteomics. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 21, 2013.
- AGASHE, A.; Martinez-Gomez, C.; Drummond, A.; Marx, C.J. Good Codons, Bad Transcript: Large Reductions in Gene Expression and Fitness Arising from Synonymous Mutations in a Key Enzyme. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 549–560, 2013.
- AKBAR, S.; LEE, S. Y.; PRICE, C. W. Two genes from *Bacillus subtilis* under the sole control of the general stress transcription factor sigmaB. **Microbiology**, v. 145, p. 1069-1078, 1999.
- ALAVI, P.; LLER, H. M.; CARDINALE, M.; ZACHOW, C.; SANCHEZ, M. B.; MARTINEZ, J. L. BERG, G. The DSF Quorum Sensing System Controls the Positive Influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on Plants. **Plos One**, v. 8, p. e67103.
- ANDRADE, S. L.; PATRIDGE, E. V.; FERRY, J. G. EINSLE, O. Crystal structure of the NADH:quinone oxidoreductase WrbA from *Escherichia coli*. **Journal Bacteriology**, v. 189, p. 9101-9107, 2007.
- ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; GAI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D.; AZEVEDO, J. L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 419-426, 2006.
- ANDREOTE, F. D.; CARNEIRO, R. T.; SALLES, J. F.; MARCON, J.; LABATE, C. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Culture-Independent Assessment of Rhizobiales-Related Alphaproteobacteria and the Diversity of *Methylobacterium* in the Rhizosphere and Rhizoplane of Transgenic Eucalyptus. **Microbial Ecology**, v. 57, p. 82-93, 2009.
- ANDREOTE, F. D.; ROCHA, U. N.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; VAN OVERBEEK, L. S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 389–399, 2010.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 145-180, 2000.
- ARAÚJO, W. L.; SARIDAKIS, H. O.; BARROSO, P. A. V.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001.
- ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; VAN ELSAS, J. D.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S.K. (Eds.) **Fungi: multifaceted microbes**, New Delhi: CRC Press, 2007. p. 189-207.

*De acordo com:

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

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

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

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

BRADLEY A.S.; PEARSON A.; SÁENZ J.P.; MARX C.J. Adenosylhopane: The first intermediate in hopanoid side chain biosynthesis. **Organic Geochemistry**, v. 41, p. 1075–1081, 2010.

BRECHENMACHER, L.; KIM, M. Y.; BENITEZ, M.; L. I, M.; JOSHI, T.; CALLA, B.; LEE, M. P.; LIBAULT, M.; VODKIN, L. O.; XU, D. et al. Transcription profiling of soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 631–645, 2008.

CARMEL-HAREL, O.; STORZ G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 54, p. 439-461, 2000.

CERVANTES-MARTINEZ, J.; LOPEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ-GARAY, B. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, v. 166, p. 889-892, 2004. DA SILVA et al., 2002

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

DINI-ANDREOTE, F. **Análises genômica e transcriptômica de *Methylobacterium mesophilicum* (SR1.6/6) em interação com a planta hospedeira**. 80p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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, n.4, p. 95-104, 2013.

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.

GALIBERT, F.; FINAN, T. M.; LONG, S. R.; PUHLER, A.; ABOLA, P.; AMPE, F.; BARLOY-HUBLER, F.; BARNETT, M. J.; BECKER, A.; BOISTARD, P.; BOTHE, G.; BOUTRY, M.; BOWSER, L.; BUHRMESTER, J.; CADIEU, E.; CAPELA, D.; CHAIN P.; COWIE, A.; DAVIS, R. W.; DREANO, S.; FEDERSPIEL, N. A.; FISHER, R. F.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; GOLDING, B.; GOUZY, J.; GURJAL, M.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; HONG, A.; HUIZAR, L.; HYMAN, R. W.; JONES, T.; KAHN, D.; KAHN, M. L.; KALMAN, S.; KEATING, D. H.; KISS, E.; KOMP, C.; LELAURE, V.; MASUY, D.; PALM, C.; PECK, M. C.; POHL, T. M.; PORTETELLE,

D.; PURNELLE, B.; RAMSPERGER, U.; SURZYCKI, R.; THEBAULT, P.; VANDENBOL, M.; VORHOLTER, F. J.; WEIDNER, S.; WELLS, D. H.; WONG, K.; YE, K. C.; BATUT, J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*, **Science**, v. 293, p. 668-672, 2001.

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

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, Article ID 963401, 2012.

GOODNER, B.; HINKLE, G.; GATTUNG, S.; MILLER, N.; BLANCHARD, M.; QUOROLLO, B.; GOLDMAN, B.S.; CAO, Y.; ASKENAZI, M.; HALLING, C.; SLATER, S. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v. 294, p. 2323-2328, 2001.

HAHLBROCK, K.; BEDNAREK, P. Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 14569–14576, 2003.

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

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

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

JONES D.S., ALBRECHT H.L., DAWSON K.S., SCHAPERDOTH I., FREEMAN K.H., PI Y., PEARSON A., MACALADY J.L. Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. **The ISME Journal**, v. 6, p. 158–170, 2012.

KANEKO T.; NAKAMURA Y.; SATO S.; ASAMIZU E.; KATO T.; SASAMOTO S.; WATANABE A.; IDESAWA K.; ISHIKAWA A.; KAWASHIMA K. et al. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v. 7, p. 331-338, 2000.

KWAK, M. J.; JEONG, H.; MADHAIYAN, M.; LEE, Y.; SA, T. M.; OH, T. K.; KIM, J. F. Genome Information of *Methylobacterium oryzae*, a plant-probiotic methylotroph in the phyllosphere. **Plos One**, v. 9, n.9, e106704, 2014.

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.

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, A.; POP, M.; SALZBERG, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, p. 1-10, 2009.

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

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.

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

LIU, X.; JIA, J.; POPAT, R.; ORTORI, C. A.; LI, J.; DIGGLE, S. P.; GAO, K. CAMARA, M. Characterisation of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. **BMC Microbiology**, p. 11-26, 2011.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; FER NÁNDEZ SCA VINO, A. Dynamic s, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbiology Ecology**, v. 61, p. 606– 618, 2010.

MALOTT R. J.; STEEN-KINNAIRD B. R.; LEE T. D.; SPEERT D. P. Identification of hopanoid biosynthesis genes involved in polymyxin resistance in *Burkholderia multivorans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 464–471, 2012.

MULLER E. E. L.; HOURCADE E.; LOUHICHI-JELAIL Y.; HAMMANN P.; VUILLEUMIER S.; BRINGEL F. Functional genomics of dichloromethane utilization in *Methylobacterium extorquens* DM4. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 2518–2535, 2011.

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

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

PASSALACQUA, K. D.; VARADARAJAN, A.; Ondov, B. D.; Okou, D. T.; Zwick, M.Y.; Bergman, N. H. Structure and Complexity of a Bacterial Transcriptome. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 3203-3211, 2009.

PEEL, D.; QUAYLE, J. R. Microbial growth on C1 compounds. 1. Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM1. *Biochemical Journal*, v. 81, p. 465-470, 1961.

PESSI, G.; AHRENS, C. H.; REHRAUER, H.; LINDEMANN, A.; HAUSER, F.; FISCHER, H.M.; HENNECKE, H. Genome-Wide Transcript Analysis of *Bradyrhizobium japonicum* Bacteroids in Soybean Root Nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 11, p. 1353-1363, 2007.

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

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

PÜHLER, A.; ARLAT, M.; BECKER, A.; GÖTTFERT, M.; MORRISSEY, J. P.; O'GARA, F. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 137 – 147, 2004.

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

ROHMER, M., BOUVIER-NAVE, P., OURISSON, G. Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 1137-1150, 1984.

ROSSETTO, P. B. **Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas**. Tese (DOUTORADO). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SALANOUBAT, M. S.; GENIN, F.; ARTIGUENAVE, J.; GOUZY, S.; MANGENOT, M.; ARLAT, A.; BILLAULT, P.; BROTTIER, J. C.; CAMUS, L.; CATTOLICO, M.; CHANDLER, VALDÉS, J.; PEDROSO, I.; QUATRINI, R.; DODSON, R. J.; TETTELIN, H.; BLAKE, R.; EISEN, J. A.; HOLMES, D. F. Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: from genome sequence to industrial applications. **BMC Genomics**, v. 9, p. 597-613, 2008.

VAN SLUYS, M. A.; MONTERO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; MENCK, C. F. M.; DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P.; SIMPSON, A. J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 169-189, 2002.

SCHMERK, C. L.; WELANDER, P. V.; HAMAD, M. A.; BAIN, K. L.; BERNARDS, M. A.; SUMMONS, R. E.; VALVANO, M. A. Elucidation of *Burkholderia cenocepacia* hopanoid biosynthesis pathway uncovers functions for conserved proteins in hopanoid-producing bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 17, p. 735-750, 2015.

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

WELANDER P. V, HUNTER R. C., ZHANG L., SESSIONS A. L., SUMMONS R. E., NEWMAN D. K. Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 6145-6156, 2009.

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

RESUMO do Capítulo 3

NEVES, A. A. C. **Mutações em *Methylobacterium* spp.** 2015. 09 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a obtenção de organismos com características novas ou não encontradas na natureza, através da transferência, mutações e deleções genéticas, permitindo uma nova alternativa para o melhoramento genético de espécies de valor biotecnológico, e a realização de estudos para melhoria de processos biológicos de interesse. Neste sentido, foi aplicada a metodologia utilizada para inserção do gene *dcmA* em *Methylobacterium* spp. para obtenção de mutantes defectivos para genes envolvidos na produção de hopanóides, que são moléculas responsáveis por estabilizar e proteger as células bacterianas, e possivelmente estar associada A interação bactéria-planta. Desta forma, foram construídos 2 plasmídeos para a deleção do gene *hpnE* e *hpnF*. Para posterior conjugação com *M. mesophilicum* SR1.6/6.

Palavras chave: Engenharia genética. Endofítico. *Gibson Assembly*.

ABSTRACT of Chapter 3

NEVES, A. A. C. **Mutations in *Methylobacterium* spp.** 2015. 09 f. Ph.D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The recombinant DNA technology allows the achievement of organisms with new features acquired by transfer, mutations and genetic deletions, allowing a new alternative for the genetic improvement of species of biotechnological value, and studies to improve biological process of interest. In this regard, the methodology was applied for insertion of the gene in *Methylobacterium* spp DCMA. to obtain mutants defective in genes involved in the production of hopanoid, which are molecules responsible for stabilizing and protecting the bacterial cells, and possibly be associated with bacteria-plant interactions. Therefore, two plasmids were constructed for the deletion of hpnE and hpnF gene. For further conjunction with *M. mesophilicum* SR1.6/6.

Keywords: Genetic engineering. Endophytes. *Gibson Assembly*.

CAPÍTULO 3 – Mutações em *Methylobacterium* spp.

3.1 INTRODUÇÃO

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a obtenção de organismos com características novas ou não encontradas na natureza, através da transferência, mutações e deleções genéticas, permitindo uma nova alternativa para o melhoramento genético de espécies de valor biotecnológico, e a realização de estudos para melhoria de processos biológicos de interesse.

A transferência genética pode também ocorrer de forma natural, os rearranjos genômicos e a transferência horizontal de genes são mais frequentemente associados com os elementos de transposição e estes rearranjos representam o principal mecanismo da evolução de *Methylobacterium* (VUILLEUMIER et al. 2009). Neste sentido, tem sido observado que frequentemente microrganismos adquirem material genético de organismos que são evolutivamente distantes (LEE et al., 2010), mas ecologicamente próximos (GOGARTEN et al., 2002; SMILLIE et al., 2011). Estes genes obtidos de transferência horizontal desempenham importantes papéis em processos biológicos, que vão desde genes que conferem resistência a antibióticos, a genes que modificam o papel ecológico do microrganismo (FORSBERG et al., 2012; SHAPIRO et al., 2012). Por exemplo, quando um novo nicho ecológico se abre através da introdução de um composto xenobiótico, a transferência horizontal de genes (HGT) pode acelerar a montagem e disseminação de uma via catabólica correspondente (SPRINGAEL et al., 2004). Esta nova habilidade, no entanto, pode ser custosa para o receptor, até que seja cuidadosamente integrado no metabolismo e redes de regulações existentes (KIM et al., 2012; YADID et al., 2013).

Durante o estágio sanduíche da aluna em paceria com o Dr. Christopher James Marx, na Universidade de Harvard, foi realizado um treinamento para a construção de mutantes em *Methylobacterium*, que resultou na publicação de um artigo em anexo (MICHENER et al., 2014 – ANEXO C). O objetivo deste trabalho foi estudar novas habilidades fisiológicas de *Methylobacterium* spp. após a transferência horizontal de genes, mais especificamente, a introdução do gene *dcmA* em outras espécies de *Methylobacterium*. Este gene foi adquirido por transferência horizontal (SCHMID-APPERT et al., 1997; VUILLEUMIER et al., 2009) e codifica para a enzima DCM dealogenase, cuja o seu produto é o formaldeído, composto constituinte central do metabolismo metilotrófico, este gene, portanto, é responsável pela capacidade da linhagem DM4 de *Methylobacterium extorquens* em crescer em meio contendo diclorometano (DCM), um contaminante ambiental.

A técnica utilizada neste trabalho foi também aplicada para a obtenção de mutantes defectivos para genes de hopanóides em *M. mesophilicum* SR1.6/6 para posterior estudo da colonização de plantas hospedeira, devido ao potencial envolvimento dessas moléculas na participação da interação bactéria-planta, desta forma, foram escolhidos o gene *hpnF* (envolvido com a ciclagem) e *hpnE* (envolvido com a síntese) para nocaute. Neste capítulo será discutido somente a metodologia e os resultados obtidos para *M. mesophilicum* SR1.6/6.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 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) e sequenciada (ALMEIDA et al., 2013 – ANEXO A). Esta bactéria foi cultivada em meio mínimo *Hypho* (PEEL; QUAYLE, 1961) contendo 100 mL de solução fosfato (25,3 g de K_2HPO_4 , 22,5 g Na_2HPO_4 em 1 L de água destilada) 100 mL de solução sulfato (5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2 g of $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ em 1 L de água destilada) 799 mL de água destilada, 1 mL de metais traço (500 ml de DH_2O ; 5 g de EDTA; 2,2 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,733 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,506 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,499 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,110 g de $(NH_4)_2MO_7O_2 \cdot 4H_2O$; 0,157 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,161 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$) suplementado com 15 mM de metanol como fonte de carbono (AGASHE et al., 2013; PEEL; QUAYLE, 1961) a 30 °C por até 72 h.

3.2.2 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA NOCAUTE DE GENES DE HOPANÓIDE EM SR1.6/6

Os plasmídeos para a deleção de cada gene de hopanóide foi construído por meio de combinações de PCR, a montante e a jusante de cada gene alvo por meio de *tail PCR* exemplificado na figura 3.1, os primers específicos foram desenhados com auxílio do software *Geneious* para a visualização das sequências e dos mapas dos plasmídeos, para o desenho dos primers foi utilizado a ferramenta *primer 3* agregada ao software *Neb* - (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator>) para avaliar a temperatura de pareamento e *Nupack* para avaliar estruturas secundárias (<http://nupack.org/partition/new>). Os produtos de PCR foram combinados por meio da técnica *Gibson Assembly* (<https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/gibson-assembly-cloning>) (Tabela 3.1, 3.2). Para tal foi preparado uma reação contendo 2 µl (200ng) de vetor digerido com enzimas *XbaI* and *SacI*, 1 ul do inserto (tamanho do inserto/ tamanho

em pares de bases do vetor = ng do fragmento (1:1) e 2 ul de H₂O totalizando 5 µl de volume final. Esta reação foi submetida ao ciclo de 1hora a 50 °C em termociclador, seguidos de *Clean up* (Qiagen). Os reagentes utilizados para a técnica Gibson Assembly estão nas tabelas 3.1 e 3.2.



Figura 3.1 - Para a construção da região US (a montante) e a região DS (a jusante) foram combinados primers 1-)US FWD + shc DS REV = fragmento US e 2-)DS FWD + shc DS REV = fragmento DS, a fim de obter a homologia para a recombinação e por fim deleção do gene.

Tabela 3.1 - Componentes do tampão 5X Isothermal reaction buffer (5X IRB)

Componente	Volume (mL)
1 M tric-HCl (pH = 7.5)	3
2 M MgCl ₂	0.150
100 mM Dntp	0.240 of each
100 mM NAD	0.300
PEG-8000	1.5g
dH ₂ O	To 6 mL
Total Volume	6 mL

Tabela 3.2 - Reagentes para a reação Gibson Assembly para 8 amostras

Componente	Volume (uL)
5X IRB	32
Taq polimerase Phusion (2U/ul)	1
Taq ligase (40 U/ul)	16
T5 Exonuclease (1:50)	3.2
dH2O	68.3
Aliquota	120ul : 8 = 15 ul

Após a construção do fragmento, este foi inserido em vetor *E. coli* competentes (beta-10) por meio de transformação. Foram adicionados 15 µl do produto da reação Gibson Assembly em 100 µl de células de *E. coli* competentes e deixadas no gelo por 30 minutos seguidos de choque térmico por 40 segundos a 42 °C, 2 minutos no gelo e adição de 1 mL de meio de cultura líquido LB (Luria Broth) e 1 hora em agitador orbital (150 rpm) a 37 °C. Posteriormente as células foram centrifugadas e ressuspensas em 50 µl de meio de cultura novo e semeada sobre meio de cultura LB suplementado com 50 mg de canamicina (marca de seleção). Após 24 h em estufa a 37 °C as colônias obtidas foram submetidas a PCR e sequenciadas por Sanger para confirmar se o fragmento inserido era o desejado.

3.2.3 CONJUGAÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA NOCAUTE EM SR1.6/6

Para a conjugação do plasmídeo com o inserto desejado (*E. coli* + pPSO4 + inserto) foi utilizada uma linhagem ajudante que possui o aparato para a conjugação, neste processo foi utilizada a linhagem de *E. coli* PRK2073 (resistente a Estreptomicina). Desta forma, foram preparados 5 mL de culturas em meio LB de *E. coli* + plasmídeo para o nocaute e *E. coli* PRK2073 crescidos por 24 h a 37 °C, as culturas foram centrifugadas por 1 minuto a 14.000 rpm e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura novo. Foram preparados 10 mL de cultura SR1.6/6 em meio HYPHO suplementado com metanol e celulose crescidos por 48 h a 30 °C, centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm e ressuspensas em 1 mL de meio novo. Foram adicionados 50 µl da cultura PRK2073 no tubo de cada plasmídeo (*E. coli* + pPSO4 + inserto) e deixados em agitador orbital (150 rpm) por 30 minutos a 37 °C, após este procedimento, foram adicionados 100 µl desta mistura em 1 mL de cultura de SR1.6/6 e semeado 50 µL em meio Nutriente Agar, em círculos, tomando cuidado para não escorrer, e deixados por 18 h a 30 °C. Foi semeado todo o círculo com alça de *drigalsk* em meio HYPHO suplementado de 15 mM de metanol e 50 mg de canamicina. As colônias resistentes a canamicina obtidas foram crescidas em meio de cultura sem a presença de canamicina por 24 h a 30 °C e 50 µl foram semeados sobre meio de cultura HYPHO suplementado com metanol

e 5% w/v de sacarose para a seleção de clones mutados. As colônias sensíveis ao antibiótico canamicina foram sequenciadas para confirmar a deleção desejada.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA NOCAUTE DE GENES DE HOPANÓIDE EM SRI.6/6

Foram construídos dois plasmídeos (Figura 3.2) para nocautear o gene *hpnE* e *hpnF* (*shc*), a construção dos primers (Tabela 3.3) foram dificultadas devido ao elevado percentual G+C desta região genômica, favorecendo a formação de estruturas secundárias e impedindo o perfeito anelamento e extensão dos primers.

Tabela 3.3 – Sequências dos primers para a construção dos plasmídeos para nocaute, combinados com a técnica Gibson Assembly.

Primer	Sequencia
shc US FWD (61+)	CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGT GTCGTCAACAGCCTGAC
shc US REV (57+)	GTGTAGCGCTCCTCCTT GAGCTCGAAGCAGATATG (reverse)
shc DS FWD (62+)	CATATCTGCTTCGAGCTC AAGGAGGAGCGCTACAC
shc DS REV (64+)	CCTGGTCGGCTGGATCCTCTAGTGAGCT GGCFTGAGCCGACGGAT (reverse)
hpnE US FWD (59+)	CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGT AGCTCACCAACATCCTC
hpnE US REV (64+)	AGATTGTCGTAGGCGGTT GTTGCCGTTGTCGATGGT (reverse)
hpnE DS FWD (61+)	ACCATCGACAACGGCAAC AACCGCCTACGACAATCT
hpnE DS REV (59+)	CCTGGTCGGCTGGATCCTCTAGTGAGCT CCCAGTAGCTGATCTTGT (reverse)

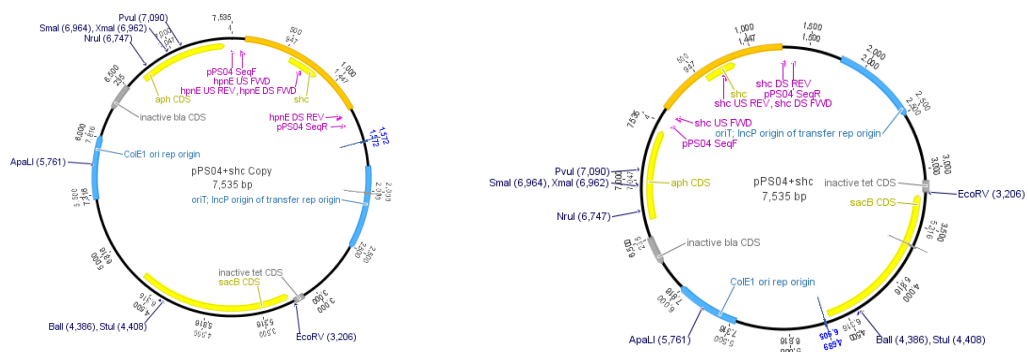


Figura 3.2 - Mapa do plasmídeo *hpnE* e *shc*, apresentando as regiões de anelamento dos primers específicos.

O gene *hpnE*, codifica para uma proteína “*dehydroqualene reductase*” podendo estar envolvida com a síntese de esqualeno em uma via de síntese alternativa de hopanóide, conforme anotação no NCBI. Este gene em SR1.6/6 foi reprimido durante a interação com citros, bem como o gene *shc* que codifica “*hopene cyclase*” percussora da via de biossíntese de hopanóides, responsável pela formação da cadeia cíclica desta molécula. No capítulo 2 deste trabalho foi estudado a expressão de genes de biossíntese de hopanóides durante a interação de SR1.6/6 (Figura 2.12). Portanto, o objetivo era obter mutantes defectivos para grande maioria dos genes avaliados no Capítulo 2, entretanto, até o momento foi realizado a construção de dois plasmídeos para a deleção do gene *hpnE* e *shc* (Figura 3.2).

3.3.2 CONJUGAÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA NOCAUTE EM SR1.6/6

Foi realizada a conjugação desses plasmídeos com SR1.6/6 que recebeu o plasmídeo e apresentou resistência canamicina, a marca de seleção, porém ao retirar a marca de seleção do meio de cultura, a bactéria não realizou o segundo *crossing*, e foi observado que as colônias de SR1.6/6 expulsaram o plasmídeo, revertendo a condição selvagem. Desta forma, outras construções estão sendo realizadas, a fim de aumentar o número de bases adjacentes ao gene a ser deletado, e assim proporcionar uma maior chance da realização do segundo *crossing* resultando na deleção do gene alvo.

3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a obtenção dos mutantes de *M. mesophilicum* SR1.6/6 com nocaute de genes envolvidos com a biossíntese de moléculas de hopanóides, os próximos passos serão estudar a colonização destes mutantes e avaliar as expressões de todos os genes da via de biossíntese por qPCR na ausência de genes específicos, a fim de entender a função desta classe gênica durante a interação SR1.6/6 e a planta hospedeira.

REFERÊNCIAS* do Capítulo 3

AGASHE, A.; Martinez-Gomez, C.; Drummond, A.; Marx, C.J. Good Codons, Bad Transcript: Large Reductions in Gene Expression and Fitness Arising from Synonymous Mutations in a Key Enzyme. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p.549–560, 2013.

ALMEIDA, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A. A. C.; RAMOS, R.T.J.; ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, A.R.; LIMA, A.O.S.; SÁ, P.H.; BARBOSA, S.; ARAÚJO, W.L.; SILVA, A. Draft Genome Sequence of *Methylobacterium mesophilicum* Strain SR1.6/6 isolated from *Citrus sinensis*. **GenomeA**, 2013.

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.

FORSBERG, K. J.; REYES, A.; WANG, B.; SELLECK, E. M.; SOMMER, M. O.; et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science**, v. 337, p. 1107-1111, 2012.

GOGARTEN, J. P.; DOOLITTLE, W. F.; LAWRENCE, J. G. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 2226-2238, 2002.

KIM, J.; COPLEY, S. D. Inhibitory cross-talk upon introduction of a new metabolic pathway into an existing metabolic network **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, E2856-2864, 2012.

LEE, D. H.; PALSSON, B. O. Adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 during growth on a nonnative carbon source, L-1,2-propanediol. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4158-4168, 2010.

MICHENER, J. K.; CAMARGO-NEVES, A. A.; VUILEUMIER, S.; BRINGEL, F.; MARX, C. J. Effective use of a horizontally-transferred pathway for dichloromethane catabolism requires post-transfer refinement. **eLife**, *in press*, 2014.

PEEL, D.; QUAYLE, J. R. Microbial growth on C1 compounds. 1. Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM1. **Biochemical Journal**, v. 81, p. 465-470, 1961.

SHAPIRO, B. J.; FRIEDMAN, J.; CORDERO, O. X.; PREHEIM, S. P.; IMBERLAKE, S. C. et al. Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. **Science**, v. 336, p. 48-55, 2012.

SMILLIE, C. S.; SMITH, M. B.; FRIEDMAN, J.; CORDERO, O. X. DAVID, L. A. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. **Nature**, v. 480, p. 241-244, 2011.

SPRINGAEL, D.; TOP, E. M. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. **Trends of Microbiology**, v. 12, p. 53-58, 2004.

*De acordo com:

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

VUILLEUMIER, S.; CHISTOSERDOVA, L.; LEE, M. C.; BRINGEL, F.; LAJUS, A.; ZHOU, Y.; GOURION, B.; BARBE, V.; CHANG, J.; CRUVEILLER, S.; DOSSAT, C.; GILLETT, W.; GRUFFAZ, C.; HAUGEN, E.; HOURCADE, E.; LEVY, R.; MANGENOT, S.; MULLER, E.; NADALIG, T.; PAGNI8, M.; PENNY, C.; PEYRAUD, R.; ROBINSON, D. G.; ROCHE, D.; ROUY, Z.; SAENAMPECHEK, C.; SALVIGNOL, G.; VALLENET, D.; WU5, Z.; MARX, C. J.; VORHOLT, J. A.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; WEISSENBACH, J.; ME'DIGUE, C.; LIDSTROM, M. E. "*Methylobacterium* genome sequences: A reference blueprint to Investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources." **Plos One**, v. 4, p. e5584, 2009.

YADID, I.; RUDOLPH, J.; HLOUCHOVA, K.; COPLEY, S. D. Sequestration of a highly reactive intermediate in an evolving pathway for degradation of pentachlorophenol. Proc **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, E2182-2190, 2013.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível reanalisar os dados obtidos por sequenciamento 454 resultando em uma melhor montagem e anotação automática e manual de todo o genoma, além de descrever genes envolvidos durante a interação entre bactéria e a planta hospedeira. Esta análise permitiu compreender melhor as funções de algumas classes gênicas da linhagem SR1.6/6 que podem estar associadas com a capacidade desta bactéria em se estabelecer na planta hospedeira, além de fornecer dados para estudos posteriores, principalmente quanto a caracterização do padrão de expressão de genes identificados neste trabalho por meio da tecnologia RNAseq.

A descrição do genoma de *Methylobacterium mesophilicum* realizada neste trabalho pode servir como subsídios para diversos outros estudos envolvendo principalmente a interação com a planta hospedeira e o potencial biotecnológico desta linhagem para produção de compostos e hormônios vegetal, assim como, pode ser mais explorado a relação desta linhagem com inseto para utilização em controle biológico.

O estudo dos transcritos desta linhagem quando em interação com a planta hospedeira demonstrou que a presença da planta pode desencadear uma série de respostas na bactéria, onde esta parece apresentar os aparatos necessários para a colonização e adaptação, como por exemplo, genes envolvidos com resposta a estresse oxidativos e formação de biofilme. Um estudo de expressão gênica destas duas classes gênicas em outras condições de cultivo e crescimento devem ser realizados. Neste trabalho uma série de genes diferencialmente expressos durante a interação foram apresentado, os quais, também podem ser melhores estudados em outras condições ambientais.

ANEXO A - Artigo publicado na revista Genome A.(ALMEIDA et al., 2013)



Draft Genome Sequence of *Methylobacterium mesophilicum* Strain SR1.6/6, Isolated from *Citrus sinensis*

Diogo Marinho Almeida,^a Francisco Dini-Andreote,^c Aline Aparecida Camargo Neves,^b Rommel Thiago Jucá Ramos,^a Fernando Dini Andreote,^d Adriana Ribeiro Carneiro,^a André Oliveira de Souza Lima,^e Pablo Henrique Caracciolo Gomes de Sá,^a Maria Silvanira Ribeiro Barbosa,^a Wellington Luiz Araújo,^b Artur Silva^a

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil^a; Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Biomédicas II, Cidade Universitária, São Paulo, São Paulo, Brazil^b; Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil^c; Departamento de Solo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil^d; Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-Santa Catarina, Brazil^e

***Methylobacterium mesophilicum* strain SR1.6/6 is an endophytic bacterium isolated from a surface-sterilized *Citrus sinensis* branch. Ecological and biotechnological aspects of this bacterium, such as the genes involved in its association with the host plant and the primary oxidation of methanol, were annotated in the draft genome.**

Received 3 May 2013 Accepted 13 May 2013 Published 20 June 2013

Citation Marinho Almeida D, Dini-Andreote F, Camargo Neves AA, Jucá Ramos RT, Andreote FD, Carneiro AR, Oliveira de Souza Lima A, Caracciolo Gomes de Sá PH, Ribeiro Barbosa MS, Araújo WL, Silva A. 2013. Draft genome sequence of *Methylobacterium mesophilicum* strain SR1.6/6, isolated from *Citrus sinensis*. *Genome Announc.* 1(3):e00356-13. doi:10.1128/genomeA.00356-13.

Copyright © 2013 Marinho Almeida et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Artur Silva, asilva@ufpa.br, or Wellington Luiz Araújo, wlaraujo@usp.br.

The pink-pigmented facultative methylotrophic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* (Alphaproteobacteria) is ubiquitous on the surface and the interior of plants (1, 2). Members of this genus are able to grow on one or several reduced one-carbon compounds (C₁), such as methylamine and methanol, which is a volatile organic compound produced by plants, and also induce plant growth (3). *M. mesophilicum* strain SR1.6/6 was isolated from *Citrus sinensis*, and an interaction with *Xylella fastidiosa*, the causal agent of CVC (citrus-variegated chlorosis), has been proposed (1, 4, 5). Also, *M. mesophilicum* SR1.6/6 produces at least six long-chain acyl-homoserine lactones (HSLs), and can be transmitted by *Bucephalagonia xanthophis*, a sharpshooter insect (6, 7), suggesting that this strain is able to interact with different host and microbial species.

Genome sequencing was carried out by Genome Sequencer FLX 454 Titanium/Roche, resulting in a total of 253,143,785 bp, and analyzed 635,612 reads, with a coverage of 40×. The closest related available genome of *Methylobacterium radiotolerans* strain JCM2831 was used as a reference during the assembly process. The adapters and low-quality sequences were removed using the scripts “sff_extract_0_2_13.py” (http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/), for generation of the “traceinfo.xml,” and filtered with the script “pyseqfilter.py,” considering reads with 20 in Phred quality. We also performed *de novo* assembly using Velvet (8) and MIRA (9), generating a total of 1,015 contigs with N₅₀ of 38,663 bp.

The scaffolds were obtained by curing and extending the contigs with the SeqMan NGen and SeqMan software programs (DNASTAR). The nonextended contigs were mapped using the CLC Genomics Workbench (CLC bio, Inc.) for *de novo* assembly and further extension. This recursive approach (totaling 3 interactions) allowed the generation of 29 scaffolds with a total length of 6,214,449 bp, with an N₅₀ of 333,386.

The functional annotation was performed using FgenesB (SoftBerry), RNAmmer (10), tRNAscan-SE (11), Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>), and InterProScan (12). In addition, manual annotation was also performed using Artemis software (13).

This genome of this bacterium was found to be 6,214,449 bp long, containing 5,945 putative open reading frames. The average G+C content is 69.47% with 46 tRNAs, 4 rRNA genes, and 57 pseudogenes. We annotated gene clusters that enable methanol oxidation, which is a known metabolic process that is activated during plant-methylotrophic bacterium interaction (14). Interestingly, we found that the *pqqA* gene, which is not essential for C₁ growth, is missing, and *mxhF*, which is essential for C₁ growth, is duplicated. Other genes are located in 4 clusters on the chromosome with a similar organization observed for *Methylobacterium extorquens* AM1 (15). Cluster 1 (2.8 kb) contains the genes *mxhQE* that codify a sensor kinase and a two-component LuxR family transcriptional regulator, respectively. In cluster 2 (3.488 kb), the genes *pqqBC* and *pqqDE* are located 344 bp downstream of the gene *mxhDM* that is related to the transcriptional regulation of methanol dehydrogenase (MeDH) (15). Cluster 3 is a small region (2.808 kb) that contains the *pqqFG* gene (PQQ biosynthesis), which has been described to occur in a separated metabolic module (15). Cluster 4 (11.718 kb) is transcribed in the opposite direction of the other genes. This cluster contains 14 genes (*mxhFJGIRSACKLDEHB*) that are responsible for codifying the structural polypeptides of methanol dehydrogenase (15).

Nucleotide sequence accession numbers. The *M. mesophilicum* strain SR1.6/6 genome sequence and annotation data have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. ANPA00000000. The version described in this paper is the first version, accession no. ANPA01000000.

Marinho Almeida et al.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Foundation for Research Assistance, São Paulo State, Brazil (grant no. 2010/07594-5). This work was part of the Paraense Network of Genomics and Proteomics (Rede Paraense de Genômica e Proteômica), supported by the Paraense Amazonia Foundation (Fundação Amazônia Paraense - FAPESPA), the Amazon Center of Excellence in Genomics of Microorganisms (Núcleo Amazônico de Excelência em Genômica de Microorganismos)—Centers of Excellence Support Program (Programa de Apoio a Núcleo de Excelência) Pronex/CNPq/FAPESPA, the National Program for Academic Cooperation (Programa Nacional de Cooperação Acadêmica) PROCAD/CAPES, the Studies and Projects Funding Agency (Financiadora de Estudos e Projetos—FINEP), and the Minas Gerais Research Fund (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais—FAPEMIG).

REFERENCES

1. Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, Van Elsas JD, Van Vuurde JW, Azevedo JL. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4906–4914.
2. Dourado MN, Andreote FD, Dini-Andreote F, Conti R, Araújo JM, Araújo WL. 2012. Analysis of 16S rRNA and mxaF genes revealing insights into *Methylobacterium* niche-specific plant association. *Genet. Mol. Biol.* 35:142–148.
3. Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sundaram SP, Sa TM. 2006. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Environ. Exp. Bot.* 57: 168–176.
4. Lacava PT, Li WB, Araújo WL, Azevedo JL, Hartung JS. 2006. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. *J. Microbiol. Methods* 65:535–541.
5. Lacava PT, Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, Jr, Azevedo JL. 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 39:55–59.
6. Pomini AM, Cruz PL, Gai C, Araújo WL, Marsaioli AJ. 2009. Long-chain acyl-homoserine lactones from *Methylobacterium mesophilicum*: synthesis and absolute configuration. *J. Nat. Prod.* 72:2125–2129.
7. Gai CS, Lacava PT, Quecine MC, Auriac MC, Lopes JR, Araújo WL, Miller TA, Azevedo JL. 2009. Transmission of *Methylobacterium mesophilicum* by *Bucephalagonia xanthophis* for paratransgenic control strategy of citrus variegated chlorosis. *J. Microbiol.* 47:448–454.
8. Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18:821–829.
9. Chevreux B, Wetter T, Suhai S. 1999. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information, p 45–56. *In* Computer science and biology: proceedings of the German Conference on Bioinformatics 1999. Trier University, Hannover, Germany.
10. Lagesen K, Hallin P, Rodland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, Ussery DW. 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 35:3100–3108.
11. Lowe TM, Eddy SR. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25: 955–964.
12. Zdobnov EM, Apweiler R. 2001. InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17: 847–848.
13. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Barrell B, Rice P. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16: 944–945.
14. Sy A, Timmers AC, Knief C, Vorholt JA. 2005. Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7245–7252.
15. Chistoserdova L, Chen SW, Lapidus A, Lidstrom ME. 2003. Methylophilicity in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *J. Bacteriol.* 185:2980–2987.

ANEXO B: Expressão Diferencial de SR1.6/6 durante o tratamento planctônico GMC-A e interação GMC-B.

Expressão Diferencial no tratamento planctônico GMC-A

Produtos gênicos super expressos

<i>Locus Tag</i>	<i>Produto genico</i>
MmSR116_0020	Hypothetical protein
MmSR116_0111	folate-binding protein YgfZ
MmSR116_0685	Hypothetical protein
MmSR116_0855	hypothetical protein
MmSR116_1001	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein
MmSR116_1064	NAD-binding D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase
MmSR116_1073	DEAD/DEAH box helicase
MmSR116_1098	RAG2 PHD domain containing protein
MmSR116_1230	Hypothetical protein
MmSR116_1239	Hypothetical protein
MmSR116_1360	integration host factor subunit beta
MmSR116_1618	Polysaccharide deacetylase
MmSR116_1726	Hypothetical protein
MmSR116_1813	Electron transfer flavoprotein FAD binding protein
MmSR116_1832	Hypothetical protein
MmSR116_1924	Hypothetical protein
MmSR116_1991	SlyX family protein
MmSR116_2058	Hypothetical protein
MmSR116_2123	cytochrome c550
MmSR116_2186	d-galactonate transporter
MmSR116_2187	glucarate dehydratase
MmSR116_2318	Zinc-finger domain protein
MmSR116_2321	hypothetical protein
MmSR116_2413	CsbD family protein
MmSR116_2451	hypothetical protein MmSR116_2451
MmSR116_2544	Hypothetical protein
MmSR116_2737	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps
MmSR116_2833	hypothetical protein
MmSR116_3007	transport-associated protein
MmSR116_3046	hypothetical protein
MmSR116_3153	NifU domain-containing protein
MmSR116_3343	Hypothetical protein
MmSR116_3415	HNH endonuclease
MmSR116_3482	response regulator receiver protein
MmSR116_3546	hypothetical protein
MmSR116_3669	Hypothetical protein
MmSR116_4119	tol-pal system-associated acyl-CoA thioesterase
MmSR116_4349	Hypothetical protein
MmSR116_4429	short-chain dehydrogenase/reductase SDR
MmSR116_4460	Hypothetical protein
MmSR116_4485	Cysteine synthase

MmSR116_4500	Hypothetical protein
MmSR116_4586	Cobalamin B12-binding protein
MmSR116_5049	hypothetical protein
MmSR116_5130	Flavoprotein WrbA
MmSR116_5154	Hypothetical protein
MmSR116_5376	Hypothetical protein
MmSR116_5376	Thioredoxin
MmSR116_5691	Transglutaminase
MmSR116_5829	hypothetical protein

Produtos genicos repremidos

<i>Locus Tag</i>	Produto genico
MmSR116_0315	5'-nucleotidase
MmSR116_0967	peptidoglycan binding domain-containing protein
MmSR116_1553	Hypothetical protein
MmSR116_2177	Hypothetical protein
MmSR116_2179	Glycosyl transferase family 2
MmSR116_4659	Hypothetical protein

Expressão Diferencial no tratamento (biofilme + endofítico) GMC-B

Produtos genicos super expressos

<i>Locus Tag</i>	Produto genico
MmSR116_0074	Ornithine decarboxylase
MmSR116_0145	adenylate/guanylate cyclase
MmSR116_0300	hypothetical protein
MmSR116_0958	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase
MmSR116_1001	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein
MmSR116_1115	Exopolysaccharide production protein YjbE
MmSR116_1190	Glycosyl transferases group 1
MmSR116_1236	Hypothetical protein
MmSR116_1392	Hypothetical protein
MmSR116_1456	Hypothetical protein
MmSR116_1618	Polysaccharide deacetylase
MmSR116_1675	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
MmSR116_1973	Hypothetical protein
MmSR116_2616	Hypothetical protein
MmSR116_2637	Hypothetical protein
MmSR116_2737	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps
MmSR116_2956	Hypothetical protein
MmSR116_2981	ECF subfamily RNA polymerase sigma-24 factor
MmSR116_2989	cytochrome c class I
MmSR116_3007	transport-associated protein
MmSR116_3147	rhomboid family protein

MmSR116_3153	NifU domain-containing protein
MmSR116_3377	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase
MmSR116_3382	leucyl-tRNA synthetase
MmSR116_3400	hypothetical protein
MmSR116_3427	hort-chain dehydrogenase/reductase SDR
MmSR116_3445	calcium-binding EF-hand-containing protein
MmSR116_3490	type 11 methyltransferase
MmSR116_3546	hypothetical protein
MmSR116_3606	methionine biosynthesis protein MetW
MmSR116_3720	Hypothetical protein
MmSR116_3727	Hypothetical protein
MmSR116_3961	integrase family protein
MmSR116_3984	C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport protein
MmSR116_4006	Hypothetical protein
MmSR116_4087	glutamate racemase
MmSR116_4091	hypothetical protein
MmSR116_4453	luciferase-like monooxygenase
MmSR116_4637	signal transduction histidine kinase
MmSR116_4659	Hypothetical protein
MmSR116_4803	SMP-30/gluconolactonase/LRE domain-containing protein
MmSR116_5010	Hypothetical protein
MmSR116_5117	Hypothetical protein
MmSR116_5227	Hypothetical protein
MmSR116_5354	Maleylacetoacetate isomerase
MmSR116_5395	Hypothetical protein
MmSR116_5425	Polysaccharide deacetylase
MmSR116_5486	Thioredoxin
MmSR116_5494	PA-phosphatase-like phosphoesterase
MmSR116_5553	hypothetical protein
MmSR116_5623	hypothetical protein
MmSR116_5676	pilus biogenesis lipoprotein CpaD
MmSR116_5729	hypothetical protein
MmSR116_5734	NUDIX hydrolase

Produtos genicos reprimidos

<i>Locus Tag</i>	<i>Produto genico</i>
MmSR116_0068	Hypothetical protein
MmSR116_0150	hypothetical protein
MmSR116_0156	LysR family transcriptional regulator
MmSR116_0317	Sulfur oxidation protein SoxZ
MmSR116_1031	secretion protein HlyD family protein
MmSR116_1142	Bacterial extracellular solute-binding protein, family 5 Middle
MmSR116_1162	hypothetical protein
MmSR116_1221	Hypothetical protein
MmSR116_1347	Hypothetical protein
MmSR116_1362	30S ribosomal protein S1
MmSR116_1377	Hypothetical protein
MmSR116_1389	Hypothetical protein

MmSR116_1487	EamA-like transporter family
MmSR116_1539	transglutaminase domain-containing protein
MmSR116_1578	3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase
MmSR116_1667	Hypothetical protein
MmSR116_1681	50S ribosomal protein L36
MmSR116_1964	Acriflavin resistance protein
MmSR116_1977	Glycoside hydrolase family protein
MmSR116_2014	Membrane bound O-acyl transferase MBOAT family protein
MmSR116_2067	hypothetical protein
MmSR116_2120	two component LuxR family transcriptional regulator
MmSR116_2180	Hypothetical protein
MmSR116_2190	hypothetical protein
MmSR116_2254	hypothetical protein
MmSR116_2302	FOF1 ATP synthase subunit epsilon
MmSR116_2346	Hypothetical protein
MmSR116_2400	Helix-turn-helix domain protein
MmSR116_2594	Hypothetical protein
MmSR116_2991	UspA domain-containing protein
MmSR116_3017	Cytochrome oxidase subunit II
MmSR116_3069	XRE family transcriptional regulator
MmSR116_3254	WxcM domain-containing protein
MmSR116_3258	Protein of unknown function (DUF563)
MmSR116_3278	BlaR1 peptidase M56
MmSR116_3363	MltA-interacting MipA family protein
MmSR116_3379	two component transcriptional regulator
MmSR116_3401	Nitroreductase
MmSR116_3444	hypothetical protein
MmSR116_3545	type IV pilus assembly PilZ
MmSR116_3848	Hypothetical protein
MmSR116_3953	Hypothetical protein
MmSR116_3973	Hypothetical protein
MmSR116_4118	hypothetical protein
MmSR116_4156	DsbA oxidoreductase
MmSR116_4182	hypothetical protein
MmSR116_4282	response regulator receiver modulated metal dependent phosphohydrolase
MmSR116_4408	alpha/beta hydrolase fold protein
MmSR116_4493	Hypothetical protein
MmSR116_4520	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase
MmSR116_4605	Hypothetical protein
MmSR116_4729	Hypothetical protein
MmSR116_4734	Hypothetical protein
MmSR116_4792	transcriptional regulator
MmSR116_4907	Hypothetical protein MmSR116_4907
MmSR116_4927	Hypothetical protein
MmSR116_4938	transcriptional regulator
MmSR116_5063	hypothetical protein
MmSR116_5096	hypothetical protein
MmSR116_5156	Hypothetical protein

MmSR116_5281	Hypothetical protein
MmSR116_5322	Protein-export protein SecB
MmSR116_5381	Prephenate dehydratase
MmSR116_5399	YiaAB two helix domain protein
MmSR116_5411	Hypothetical protein
MmSR116_5424	NAD-dependent epimerase/dehydratase
MmSR116_5583	tartrate dehydrogenase
MmSR116_5607	Hypothetical protein
MmSR116_5768	ABC transporter-like protein
MmSR116_5787	DNA polymerase III subunit beta
MmSR116_5789	ECF subfamily RNA polymerase sigma-24 factor
MmSR116_5921	Hypothetical protein
MmSR116_5928	Hypothetical protein
MmSR116_5972	Hypothetical protein
MmSR116_5973	Hypothetical protein
MmSR116_6005	Hypothetical protein
MmSR116_6009	Hypothetical protein

ANEXO C- Artigo publicado na revista eLife (MICHENER et al., 2014)

ACCEPTED MANUSCRIPT



Effective use of a horizontally-transferred pathway for dichloromethane catabolism requires post-transfer refinement

Joshua K Michener, Aline A Camargo Neves, Stéphane Vuileumier, Françoise Bringel, Christopher J Marx

DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.04279>

Cite as: eLife 2014;10.7554/eLife.04279

Received: 7 August 2014

Accepted: 22 November 2014

Published: 24 November 2014

This PDF is the version of the article that was accepted for publication after peer review. Fully formatted HTML, PDF, and XML versions will be made available after technical processing, editing, and proofing.

This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#) permitting unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Stay current on the latest in life science and biomedical research from eLife.
[Sign up for alerts](#) at elifesciences.org

1 **Title: Effective use of a horizontally-transferred pathway for dichloromethane**
2 **catabolism requires post-transfer refinement**

3

4 Impact statement: Laboratory adaptation to use an introduced metabolic pathway recapitulates
5 natural mutations and offers a novel bioremediation strategy

6

7 Joshua K. Michener¹, Aline A. Camargo Neves^{1,2}, Stéphane Vuilleumier³, Françoise Bringel³,
8 and Christopher J. Marx^{1,4,5,6,*}

9

10 (1) Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA,
11 USA; (2) Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São
12 Paulo, São Paulo, Brazil; (3) Equipe Adaptations et Interactions Microbiennes dans
13 l'Environnement, UMR 7156 Université de Strasbourg – CNRS Génétique Moléculaire,
14 Génomique, Microbiologie, Strasbourg, France; (4) Faculty of Arts and Sciences Center for
15 Systems Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA; (5) Department of Biological
16 Sciences, University of Idaho, Moscow, ID, USA; (6) Institute for Bioinformatics and
17 Evolutionary Studies, University of Idaho, Moscow, ID, USA.

18

19

20 Running title: Evolutionary refinement after horizontal transfer

21

22 (*) Correspondence should be sent to Christopher J. Marx

23 Phone: (208) 885-8594

24 Email: cmarx@uidaho.edu

25 875 Perimeter Drive MS 3051

26 Moscow, ID 83844-3051

27 **Abstract**

28 When microbes acquire new abilities through horizontal gene transfer, the genes and
29 pathways must function under conditions with which they did not coevolve. If newly-acquired
30 genes burden the host, effective use will depend on further evolutionary refinement of the
31 recombinant strain. We used laboratory evolution to recapitulate this process of transfer and
32 refinement, demonstrating that effective use of an introduced dichloromethane degradation
33 pathway required one of several mutations to the bacterial host that are predicted to increase
34 chloride efflux. We then used this knowledge to identify parallel, beneficial mutations that
35 independently evolved in two natural dichloromethane-degrading strains. Finally, we constructed
36 a synthetic mobile genetic element carrying both the degradation pathway and a chloride
37 exporter, which preempted the adaptive process and directly enabled effective dichloromethane
38 degradation across diverse *Methylobacterium* environmental isolates. Our results demonstrate the
39 importance of post-transfer refinement in horizontal gene transfer, with potential applications in
40 bioremediation and synthetic biology.

41

42 **Introduction**

43 Microbes frequently acquire genetic material from organisms that are distant evolutionary
44 relatives but close ecological neighbors [1-3]. These horizontally-transferred genes and pathways
45 play important roles in processes ranging from the spread of antibiotic resistance to ecological
46 differentiation [4,5]. When, for example, a new environmental niche opens up through the
47 introduction of a xenobiotic compound, horizontal gene transfer (HGT) can speed the assembly
48 and dissemination of a corresponding catabolic pathway [6]. However, newly-acquired abilities
49 may be costly for the host until they are carefully integrated into existing metabolic and
50 regulatory networks [7,8]. The challenges associated with such adaptations are highlighted by
51 many examples from metabolic engineering, where productively transferring genes and
52 pathways into new hosts often requires significant post-transfer refinement [9,10].

53 Observing this process of transfer and refinement in nature is challenging, but we can
54 recreate the same process in the laboratory using a combination of genetic engineering and
55 experimental evolution. Laboratory evolution has been used extensively to study natural
56 evolutionary processes. Recent experiments have highlighted the mechanisms by which
57 evolution can optimize existing traits [11], select for the emergence of a novel ability [12], and
58 refine a rudimentary pathway [13]. Laboratory studies focusing on genetic exchanges between
59 microbes have described the recombination of mutations within an evolving population [14] or
60 the replacement of an endogenous metabolic pathway with an alternative route [15]. Meanwhile,
61 metabolic engineers have used adaptive evolution as an engineering tool, including the evolution
62 of highly modified strains, but under conditions that do not reproduce HGT [16-19]. In this work,
63 we combined these approaches to study how microbes evolve following the acquisition through
64 horizontal gene transfer of a novel metabolic ability by deliberately transferring a mobile

65 metabolic pathway into a new host and then using experimental evolution to select for its
66 efficient use.

67 We investigated this process of HGT followed by evolutionary refinement using
68 dichloromethane (DCM) catabolism in *Methylobacterium* strains as an example.
69 Dichloromethane became an important industrial solvent during World War II and is still the
70 most prevalent chlorinated solvent today (www.eurochlor.org). Following widespread
71 environmental contamination by DCM, several microbial strains have been isolated based on
72 their ability to grow on DCM as the sole source of carbon and energy. Most notably,
73 *Methylobacterium extorquens* DM4, a methylotrophic Alphaproteobacterium, has served as a
74 reference model to elucidate the details of bacterial growth with DCM [20,21]. *M. extorquens*
75 DM4 expresses a dehalogenase, DcmA, whose gene shows clear signs of horizontal transfer
76 [22,23] and whose product, formaldehyde, feeds directly into central methylotrophic metabolism
77 [24].

78 Past efforts to understand the genetics of growth on DCM used gene knockouts to uncover
79 DCM-specific genes (Figure 1A) [25]. We complemented these efforts using a synthetic
80 approach involving conjugal transfer of the *dcmA* gene into several naïve *Methylobacterium*
81 strains (Figure 1B) [26,27]. These *dcmA* transconjugants showed DCM dehalogenase activity but
82 grew poorly on DCM, and we previously investigated factors that might explain their limited
83 growth [27]. Growing on DCM using the *dcmA* catabolic pathway is very challenging for the
84 host, as its products and intermediates include formaldehyde, hydrochloric acid, and the
85 alkylating agent *S*-chloromethylglutathione (Figure 1F) [28,29]. As DCM dehalogenase activity
86 was generally high in transconjugant strains [27], we hypothesized that one or more of these

87 stresses was limiting growth in the transconjugants and thus required post-transfer evolutionary
88 refinement of the host to produce highly active DCM-degrading strains.

89 In this work, we used experimental evolution to identify the factors that were limiting
90 growth in *dcmA*-containing transconjugants. Beginning from these ancestral transconjugants, we
91 evolved replicate populations with DCM as the sole source of carbon and energy and obtained
92 evolved isolates with substantially higher fitness on DCM (Figure 1C). We sequenced the
93 genomes of these evolved strains to identify the mutations that increased fitness on DCM and
94 then reconstructed these mutations in isogenic backgrounds to measure their effect on fitness
95 (Figure 1D). Based on these mutations, we could infer both the primary limiting stress that the
96 pathway placed on its host as well as the biochemical mechanisms that the cells used to
97 overcome this stress. Finally, we used this knowledge to uncover naturally-occurring refining
98 mutations in two DCM-degrading environmental isolates and to design an improved gene
99 cassette that enhances DCM bioremediation by preempting the need for post-transfer refinement
100 (Figure 1E).

101

102 **Results**

103 *Experimental evolution selected for increased fitness on DCM*

104 We previously transferred the DCM dehalogenase *dcmA* into three strains of *M. extorquens*
105 as well as three other species of *Methylobacterium* [27]. Each of the transconjugants was
106 significantly less fit than the natural isolate, *M. extorquens* DM4 (hereafter referred to as
107 ‘DM4’). In this work, replicate populations of five of these transconjugants were serially
108 propagated with DCM as the sole carbon and energy source to select for increased fitness on
109 DCM. One of these five transconjugants, *M. extorquens* AM1, was initially unable to grow on

110 DCM alone and instead was propagated on a mixture of DCM and methanol. After a total of 150
111 generations of growth, individual clones were isolated from each replicate population. We
112 measured the fitness of each clone in direct competition with the reference strain, DM4, and
113 selected the most-fit clone from each population for further analysis.

114 For four out of the five ancestral transconjugant strains, the fitness of isolates from each
115 evolved population was significantly higher than the fitness of the ancestor during growth on
116 DCM (Figure 2), increasing by 1.6- to 13-fold relative to the respective ancestral transconjugant.
117 *M. radiotolerans* was the only transconjugant that did not yield improved isolates after 150
118 generations, and these non-improved populations were not further characterized.

119

120 *Whole-genome resequencing and allele exchange identified causal mutations*

121 The genomes of all ancestral strains had previously been sequenced [23,30], so we used a
122 combination of whole-genome resequencing and targeted Sanger sequencing to identify putative
123 causal mutations in the evolved isolates. In the seven isolates that we resequenced, we repeatedly
124 found mutations to the genes for the protein translocase *secY*, the chloride/proton antiporter *clcA*,
125 and a hypothetical protein with a domain of unknown function (DUF599, which we renamed
126 *edgA* for Evolved Dichloromethane Growth), as well as a single mutation to *besA*, a homolog of
127 the eukaryal bestrophin family of chloride channels (Figure 3A). Sanger sequencing confirmed
128 these mutations in the resequenced isolates and targeted sequencing of these loci demonstrated
129 that each remaining isolate had mutations at one of these four loci. We note that additional
130 mutations were identified in each resequenced isolate.

131 Repeated mutations to the same loci in independently evolved replicates strongly suggested
132 that the mutations were causal. However, to conclusively demonstrate causality we introduced

133 several of these mutations into the ancestral strains *M. extorquens* AM1 and PA1 (hereafter
134 referred to as ‘AM1’ and ‘PA1’). We focused here upon AM1 and PA1, as these two strains
135 incurred mutations to all four loci described above and are genetically tractable. Since the *secY*
136 mutation was not identified in PA1 nor the *clcA* mutation in AM1, we also constructed hybrid
137 allele exchange vectors to move these mutations into the hosts in which they were not observed.
138 We then measured the fitness of the reconstructed mutants against the natural isolate, DM4. Each
139 of the mutations was highly beneficial, regardless of whether the mutation arose in that host
140 during evolution (Figure 3B). In contrast, the mutations had only minor fitness effects during
141 growth on an alternate carbon source, succinate, indicating that their beneficial effects were
142 specific to the challenge of growing on DCM and were not broadly beneficial during laboratory
143 growth (Figure 3, figure supplement 1).

144 While each of the single mutations was beneficial, the fitness effects were not additive. For
145 example, isolate E2 contained mutations in both *clcA* and *besA*. Each of these mutations was
146 beneficial alone, but the double mutant was no more fit than the *besA*^{E2} single mutant (Figure
147 3C). Similarly, when we constructed *clcA*^{E1}/*secY*^{A1} and *clcA*^{E1}/*edgA*^{E3} double mutants, we found
148 that the double mutants were less fit than the *clcA*^{E1} single mutant (Figure 3-figure supplement
149 2).

150

151 *Mutations to secY and clcA are predicted to increase chloride export*

152 The protein translocase gene *secY* was mutated in seven of thirteen evolved isolates,
153 totaling six amino acid mutations and one in-frame deletion. In the crystal structure of the SecY
154 homolog from *Methanocaldococcus jannaschii* [31], these seven mutations cluster to the same
155 region of the protein surface, at the interface of the channel pore and its blocking plug (Figure

156 4A). Several of these mutations have been identified and characterized in the *Escherichia coli*
157 SecY homolog (with 58% amino acid identity to *M. extorquens* DM4 SecY) based on their
158 ability to secrete proteins with mistranslated sequences [32]. These mutations are predicted to
159 disrupt interactions between the plug and pore, leading to a leaky channel [33], and detailed
160 biochemical investigation of one such mutant in *E. coli* demonstrated that this mutation allows
161 the facilitated diffusion of small anions, most notably chloride [34].

162 Similarly, the promoter of the chloride/proton antiporter *clcA* was mutated in four of the
163 thirteen evolved isolates. The two evolved PA1 isolates with *clcA* promoter mutations showed
164 increased levels of *clcA* mRNA compared to either the ancestor or the PA1 isolate with a wild
165 type *clcA* promoter (Figure 4B and Figure 4-figure supplement 1). However, the *E. coli* ClcA
166 antiporter (with 33% amino acid identity to DM4) is capable of importing or exporting chloride,
167 while necessarily transporting protons in the opposite direction [35]. To determine the
168 directionality of ClcA-mediated transport in our strains, we used a pH biosensor to determine the
169 effect of *clcA* overexpression on proton transport during growth with DCM. We observed a
170 transient decrease in intracellular pH upon addition of DCM that was significantly larger in the
171 strain overexpressing *clcA* (Figure 4C), consistent with ClcA importing protons and exporting
172 chloride.

173 Next, we tested the effect of *secY* and *clcA* mutations on the chloride sensitivity of the
174 mutant strains, since mutations that benefit the cell by facilitating chloride diffusion during
175 growth on DCM may also result in detrimental levels of chloride import in high salt media. We
176 measured the growth rate of strains on succinate with varying external chloride concentrations,
177 using sucrose as a control for the effects of osmolarity. We were unable to detect a change in the
178 sensitivity of AM1 mutants because the strain was already highly chloride sensitive [27]. In PA1,

179 the *clcA*^{E1} mutant was no more sensitive to NaCl or sucrose than the wild type strain (Figure
180 4D). In contrast, the PA1 *secY*^{A1} mutant was highly sensitive to NaCl, but only slightly more
181 sensitive to sucrose (Figure 4D).

182

183 *Two DCM-degrading environmental Methylobacterium isolates contain mutations to clcA*

184 We next asked whether our laboratory evolution experiments had recapitulated the natural
185 process of adaptation to growth on DCM, thereby allowing the identification of refining
186 mutations in environmental isolates. The sequences of *secY*, *besA*, and *edgA* in the reference
187 isolate, DM4, did not contain any of the mutations identified in the laboratory-evolved strains.
188 However, we found that DM4 expressed significantly higher levels of *clcA* mRNA than the other
189 three ancestral strains of *M. extorquens* tested (Figure 5A). The sequences upstream of *clcA*
190 differ between all four strains, making it difficult to identify the causal mutations in DM4.
191 Consequently, we exchanged a 140-bp region upstream of *clcA* (containing a total of five
192 nucleotide changes) between DM4 and PA1. The resulting DM4 strain with the PA1 *clcA*
193 promoter had decreased *clcA* expression and minimal growth with DCM as the sole carbon and
194 energy source, while the PA1 strain with the DM4 *clcA* promoter had increased *clcA* expression
195 and was significantly more fit than the wild type PA1 strain (Figure 5B). However,
196 complementing the DM4 *clcA*^{E0} mutant strain with a *clcA/dcmA* expression plasmid restored
197 growth on DCM (Figure 5-figure supplement 1).

198 Having identified necessary refining mutations in DM4, we examined the other known
199 DCM-degrading *Methylobacterium* isolate, *M. extorquens* DM17 [36], to determine whether a
200 parallel event had occurred in its evolutionary history. When we sequenced the *secY*, *besA*, and
201 *edgA* loci in this strain, the nucleotide sequences were exactly identical to *M. extorquens* AM1.

202 Compared to *M. extorquens* AM1, however, the *clcA* locus of DM17 contained an insertion
203 sequence 52 bp upstream of the *clcA* promoter, and we found that *clcA* expression was even
204 higher in DM17 than in DM4 (Figure 5A).

205

206 *A synthetic expression cassette containing both clcA and dcmA confers higher fitness on DCM*
207 *in naïve transconjugants*

208 Having demonstrated that *clcA* overexpression increases the fitness in several strains of *M.*
209 *extorquens* during growth on DCM, we tested whether this effect would also hold in other
210 environmental isolates across the *Methylobacterium* genus. We constructed a plasmid that
211 expressed *dcmA* from the native DM4 promoter as well as *clcA* from a constitutive promoter. We
212 then mated either our original *dcmA* plasmid (pJM10) or this new *dcmA/clcA* plasmid (pJM83)
213 into a collection of natural *Methylobacterium* isolates. We found that every strain showed higher
214 fitness on DCM with the dual-expression *dcmA/clcA* plasmid than with the single-expression
215 *dcmA* plasmid (Figure 6).

216

217 **Discussion**

218 Previous studies in experimental evolution generally focused on a single wild type
219 microbial strain. In contrast, we evolved five different *Methylobacterium* strains, each of which
220 carried the same horizontally-transferred metabolic pathway for DCM catabolism. By
221 sequencing the evolved isolates, we identified mutations across diverse backgrounds that
222 improve the ability to grow on DCM. Working backward from these mutations allowed us to
223 determine that chloride accumulation appears to be the most critical factor limiting growth, and
224 to identify multiple mechanisms that alleviate this stress. We found parallel responses at both the

225 genetic and physiological level, indicating that the different strains faced similar challenges
226 when forced to use their new metabolic capability and overcame these challenges in similar
227 ways. Horizontal transfer of *dcmA* is not sufficient for efficient growth on DCM and, in both the
228 laboratory and the environment, microbes must also acquire refining mutations to optimize the
229 newly-acquired pathway.

230 Several lines of evidence suggest that chloride export was the key limiting factor during
231 growth on DCM. First, the observed mutations in *secY* are predicted to turn the protein
232 translocase into a leaky chloride channel, as demonstrated previously in *E. coli* [34]. Our growth
233 rate measurements confirm that *secY* mutants are more sensitive to extracellular chloride, as we
234 would expect if the mutant SecY facilitates chloride diffusion across the cell membrane. Second,
235 mutations to the promoter of *clcA* increase *clcA* expression. The *in vivo* pH measurements upon
236 DCM addition establish that ClcA imports protons, with a necessary concomitant export of
237 chloride, and that increased ClcA expression leads to increased proton import and chloride
238 export. Similarly, the *E. coli* response to extreme acid stress uses ClcA to export chloride, with
239 other mechanisms used for proton export [35]. Third, BesA is predicted to be a chloride channel
240 [37] and while we cannot yet explain the mechanism by which the identified mutation would
241 affect its function, we hypothesize that the mutation may also allow increased chloride export.
242 Finally, we observed that double mutants are no more fit than the best single mutant, suggesting
243 that all the mutations we detected are addressing the same physiological limitation. Previous
244 experiments found that mutations affecting the same pathway were less beneficial when
245 combined [15], in some cases to the point of being collectively deleterious [38-40]. Due to the
246 antagonism of *edgA*^{E3} with *clcA*^{E1}, it is likely that EdgA is also involved in chloride export.

247 While chloride export is not an unexpected stress during growth on DCM, there was no *a*
248 *priori* reason to expect that chloride export was the major limiting stress across all of the strains
249 that we tested. Multiple other stresses could have been dominant, including sensitivity to internal
250 acidification, the solvent effects of DCM, changes in formaldehyde fluxes perturbing the native
251 host metabolism, or the mutagenic effects of glutathione-conjugated DCM [25]. Indeed, our
252 previous efforts to find a single physiological difference that explained the varied fitness of the
253 ancestral *dcmA* transconjugants on DCM did not identify chloride sensitivity as a predictive
254 phenotype for fitness during growth on DCM [27]. There was no reason to expect that chloride
255 was more toxic than protons, but using ClcA to export the chloride, even at the cost of importing
256 yet more protons, was highly beneficial. It appears that chloride is either more toxic or less
257 effectively managed than excess protons.

258 The apparent linkage between *besA* and chloride export may offer insights into a human
259 disease. Mutations to the human bestrophin homologs can lead to vitelliform macular dystrophy,
260 but little is known about these proteins aside from their roles as chloride channels [37,41].
261 Bacterial homologs of the bestrophin family are similarly uncharacterized. Select bacterial
262 homologs have been shown to affect swarming [42] and sporulation [43], but these systems have
263 not explicitly replicated the role of the human homolog as a chloride channel. However, our
264 *Methylobacterium* system may offer an opportunity to characterize the chloride transporter
265 function of this protein family in a tractable host with a strong linkage between BesA function
266 and fitness.

267 By design, our analysis has focused on mutations with very large fitness effects. Mutations
268 that alleviate stresses imposed during growth on DCM had the potential to dramatically increase
269 fitness, and restricting our evolution experiment to 150 generations predominantly selected these

270 mutations. Our populations undoubtedly sampled mutations that would be generally beneficial
271 during growth in our media and laboratory conditions, as has been seen in earlier experiments
272 with *M. extorquens* AM1 [44], but the fitness effects of these mutations appear to have been
273 minor compared to the DCM-specific mutations. For example, isolate N1 lost an entire 458 kbp
274 plasmid, which was likely due to selection but with a small fitness benefit as compared to
275 acquiring a *secY* mutation [45]. The rarity of mutations generically beneficial during laboratory
276 growth greatly simplified our analysis of the evolved isolates.

277 We expect that multiple lineages within a population independently arrived at solutions to
278 increase chloride efflux. However, the size of the fitness effects produced evolutionary dynamics
279 that resembled periodic selection [46], in which the first large effect mutation to arise in the
280 population rapidly fixed. Combinations of mutations were generally no more beneficial than the
281 best single mutation, so we predominantly observed the result of a single selective sweep (Figure
282 3, figure supplement 3). Population E2 is the exception, where the *clcA*^{E2} mutation fixed first,
283 followed by the *besA*^{E2} mutation (Figure 3, figure supplement 4). The *clcA*^{E2} mutant has a fitness
284 of 0.6 as compared to 0.8 for *besA*^{E2} or the *besA*^{E2}/*clcA*^{E2} double mutant (Figure 3C). Thus, while
285 the double mutant is no more fit than the *besA*^{E2} single mutant, the *besA*^{E2} mutation is still highly
286 beneficial in the *clcA*^{E2} background.

287 Experimental populations of *M. radiotolerans* did not increase in fitness over 150
288 generations of growth on DCM. When we tested this strain with the dual-expression *clcA/dcmA*
289 plasmid, the fitness increased but the increase was smaller than for other strains (Source Data for
290 Figure 6). We hypothesize that our inability to find improved isolates of *M. radiotolerans* stems
291 from a combination of fewer accessible beneficial mutations, smaller fitness effects of the

292 beneficial mutations, and a decreased sensitivity to the mutagenic effects of growing on DCM
293 [47].

294 Experimental evolution is increasingly used to simulate natural evolutionary processes
295 [48]; however, there are few examples where mutations that arise during laboratory evolution
296 can also be identified in natural populations [49,50]. We have shown that mutations to *clcA* can
297 be highly beneficial during laboratory growth, and that parallel mutations to *clcA* have arisen in
298 two independent DCM-degrading environmental isolates of *M. extorquens*. In the reference
299 environmental isolate *M. extorquens* DM4, we can directly link nucleotide mutations in the *clcA*
300 promoter to *clcA* overexpression and increased organismal fitness during growth on DCM.
301 Demonstrating linkages between evolutionary processes observed in the laboratory and in nature
302 will be increasingly important for the further development and application of experimental
303 evolution.

304 Having identified *clcA* overexpression as a beneficial evolutionary refinement following
305 acquisition of *dcmA*, we used this knowledge to develop a novel bioremediation strategy and
306 designed new expression cassettes for bioremediation that are less dependent on subsequent
307 adaptation for effective function. Rather than introducing an exogenous microbe into a
308 contaminated site, we propose to introduce a genetic cassette to the indigenous microflora, an
309 approach known as genetic bioaugmentation [51,52]. Our experiments clearly demonstrated that
310 simply introducing the degradation pathway for a contaminant can be inefficient, as the
311 recipients may be unprepared for the stresses produced by the pathway [26,27]. Instead, we
312 propose to identify these stresses in the laboratory and then provide both the catabolic pathway
313 and solutions to the most common limitations. In our example of DCM degradation,

314 transconjugants that received both the catabolic gene *dcmA* and the chloride exporter gene *clcA*
315 were more efficient at degrading DCM than those that received *dcmA* alone (Figure 6).

316 In summary, our results highlight the important role of evolutionary refinement in the
317 horizontal transfer of a challenging catabolic pathway. Dichloromethane degradation led to
318 chloride accumulation and required modifications to the recipient to export the chloride. Based
319 on recent examples from metabolic engineering, we expect that these types of host-pathway
320 interactions are common [9,53-56] and, consequently, that post-transfer refinement of microbial
321 hosts is also widespread in nature. Our approach of deliberate horizontal transfer in the
322 laboratory followed by experimental evolution offers an opportunity to identify both the limiting
323 stresses and the mutations that can overcome these stresses. As screens and selections for
324 complex microbial phenotypes are further developed, we expect that this approach will find
325 many applications, both in the analysis of natural microbial isolates and in the optimization of
326 genetically engineered microbes and mobile genetic elements.

327

328 **Materials and Methods**

329 *Strains and cultivation*

330 *E. coli* cultures were grown in LB containing 10 g/L NaCl except for cultures containing
331 the *dcmA/clcA* dual expression plasmid (pJM83), which were salt-sensitive and instead were
332 grown in LB containing 0.5 g/L NaCl. Unless otherwise noted, *Methylobacterium* strains were
333 grown in 10 mL cultures in a 50 mL flask at 30 °C and 220 rpm in M-PIPES medium
334 supplemented with 3.5 mM succinate or 5 mM DCM [57]. Antibiotics were added to final
335 concentrations of 10 µg/mL streptomycin, 12.5 µg/mL tetracycline, or 50 µg/mL kanamycin. All
336 DCM cultures were grown in gas-tight 50 mL screw-top flasks sealed with Mininert valves

337 (Supelco, Bellefonte, PA) and teflon tape. Before use, valves were sterilized with ethanol and
338 dried in a laminar flow hood. Unless otherwise noted, chemicals were purchased from Sigma-
339 Aldrich (St. Louis, MO) and enzymes from New England Biolabs (Ipswich, MA). The additional
340 *Methylobacterium* strains presented here were either isolated from the University of Washington
341 campus (L1, D21, D23, D24; CJM, unpublished) or from the surroundings of Woods Hole, MA
342 (J-4-1, C-7-2, C-7-1, C-2-3, G-1-1, M-1-1; N. F. Delaney, unpublished). Strains and plasmids are
343 listed in Supplementary File 1.

344

345 *Experimental evolution*

346 Transconjugant strains containing pJM10 were streaked to single colonies on M-PIPES +
347 succinate + kanamycin plates. Liquid cultures were inoculated from single colonies into M-
348 PIPES + succinate + kanamycin and grown to saturation. Cultures were then diluted 100x into
349 M-PIPES + DCM to initiate the evolution experiment, starting 3-4 replicate flasks for each
350 transconjugant. Every 3.5 days, cultures were diluted into fresh M-PIPES + DCM. Initial dilution
351 factors were 16x, rising to 64x by the end of the experiment. Aliquots were taken at 12, 24, 36,
352 48, 60, 90, 120, and 150 generations and frozen at -80 °C in 8% DMSO. After 150 generations,
353 the cultures were plated on M-PIPES + succinate plates to isolate single colonies. Individual
354 colonies were restreaked onto M-PIPES + succinate plates, then inoculated into liquid cultures in
355 M-PIPES + succinate. Liquid cultures were diluted 100x into M-PIPES + DCM to test for DCM
356 growth. For each replicate population, the isolate with the highest yield on DCM as assayed by
357 OD₆₀₀ was selected for further analysis.

358 The ancestral AM1 transconjugant was unable to grow on DCM alone. Consequently, the
359 initial stages of evolution were performed in DCM supplemented with 0.75 mM methanol and

360 kanamycin. For two of the populations, A2 and A3, the populations were able to grow on DCM
361 alone after 60 generations of evolution, and the remaining 90 generations were conducted on
362 DCM alone. For the final population, A1, the entire evolution experiment was performed with
363 DCM + methanol + kanamycin.

364

365 *Competitive fitness assays*

366 Competition experiments were conducted to compare the fitness of the tested strain against
367 *M. extorquens* DM4 $\Delta dcmA$ *hptA::Venus* + pJM10, as described previously [27]. Briefly, strains
368 were grown to saturation in M-PIPES + succinate + kanamycin, then diluted 100x into M-PIPES
369 + DCM. After three days, cultures were mixed at defined ratios in fresh M-PIPES + DCM and
370 allowed to grow for three more days. A flow cytometer was used to measure the population
371 ratios before and after the final round of growth on DCM. The fitness of the isolate was then
372 calculated based on the change in population ratios and the fold-growth of the mixed population.

373

374 *Genome resequencing*

375 To prepare genomic DNA for sequencing, evolved isolates were streaked to single colonies
376 on M-PIPES + succinate, and then grown to saturation in M-PIPES + succinate. Saturated
377 cultures were centrifuged at 4500 g for 10 min, washed in 1 mL of water, and centrifuged at
378 8000 g for 3 min. After discarding the remaining supernatant, cell pellets were stored at -20 °C
379 overnight. Pellets were resuspended in 570 μ L of TET (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, and
380 1% Triton X-100), heated to 90 °C for 1 h, then cooled to RT. Lysozyme was added to a final
381 concentration of 2 mg/mL, and the suspension was incubated at 37 °C for 30 min. Next, 30 μ L of
382 10% SDS and 0.2 mg/mL of proteinase K were added, and the suspension was incubated for a

383 further 1 h at 37 °C. After addition of 0.5 mg/mL RNase A, the suspension was incubated at 37
384 °C for 1 h, heated to 90 °C for 10 min, and 100 µL 5 M NaCl and 80 µL CTAB/NaCl (10%
385 CTAB in 0.7 M NaCl) were added. After a further 10 min incubation at 90 °C, the mixture was
386 extracted twice with phenol/chloroform, precipitated with isopropanol, air dried, and
387 resuspended in 10 mM Tris pH 7.5.

388 DNA sequencing was performed at the Microarray and Genomic Analysis Core Facility of
389 the University of Utah and the IBEST Genomics Resources Core of the University of Idaho
390 using a HiSeq 2000 and yielding 90x-200x coverage. Genomic DNA libraries were constructed
391 using a TruSeq DNA Sample Prep LT kit (Illumina, San Diego, CA) following the
392 manufacturer's instructions. Genome sequences were analyzed using breseq-0.24 [58]. Putative
393 mutations were confirmed by PCR amplification from the chromosome and Sanger sequencing.
394 To determine the first appearance of a given mutation, the chromosomal loci were amplified by
395 PCR from the mixed population aliquots that had been frozen at intermediate time points during
396 evolution. The fraction of the population with a given allele was determined by Sanger
397 sequencing of these mixed PCR products, with an estimated detection limit of ~5% of the
398 population.

399

400 *Plasmid and strain construction*

401 To construct plasmid pJM83, plasmid pJM40 was amplified in an around-the-horn PCR to
402 remove the *pHluorin/mCherry* coding frame. The *clcA* gene was amplified from PA1 gDNA
403 with primers that added homology to the pJM40 expression construct (promoter and terminator).
404 The *clcA* insert was then cloned into the pJM40 PCR product using Gibson assembly [59].

405 To construct the allele exchange vectors, plasmid pPS04 was digested with *Xba*I and *Sac*I.
406 The appropriate chromosomal locus, including ~500 bp on either side of the desired mutation,
407 was amplified by PCR using primers that added homology to the pPS04 vector backbone. The
408 chromosomal amplicon was then cloned into the pPS04 backbone using Gibson assembly [59].
409 In the case of plasmids pJM66, pJM67, pJM75, pJM76, pJM88, and pJM89, the mutant allele
410 was moved into a strain in which it did not occur. Rather than cloning a single ~1000 bp
411 chromosomal locus, these plasmids were constructed from three separate amplicons. These
412 amplicons included a ~500 bp upstream homology region amplified from the recipient
413 chromosome, a small region containing the desired mutation amplified from the donor
414 chromosome, and a second ~500 bp downstream homology region amplified from the recipient
415 chromosome. The PCR primers used added the appropriate homology to combine all three
416 amplicons into the pPS04 backbone in a single Gibson assembly reaction.

417 Plasmids were mated into recipient *Methylobacterium* strains using triparental matings as
418 described previously [60]. Allele exchanges were performed as described [61]. Putative allele
419 exchange mutants were confirmed by Sanger sequencing a PCR amplification of the modified
420 chromosomal locus.

421

422 *In vivo pH measurements*

423 *In vivo* pH measurements were conducted as described previously [27]. Briefly, an
424 expression plasmid containing both *dcmA* and a pHluorin-mCherry translational fusion (pJM40)
425 was mated into the appropriate strain. The transconjugant was grown to saturation in M-PIPES +
426 succinate + tetracycline, then diluted 100x into M-PIPES + DCM and grown for three days.
427 Cultures were diluted to a final optical density of 0.01 before analysis on an LSRII flow

428 cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ). pHluorin was excited at 488 nm and measured at 530/30
429 nm. mCherry was excited at 561 nm and measured at 620/40 nm. Samples were gated for
430 forward scatter, side scatter, and mCherry fluorescence. After determining the population
431 fluorescence, DCM was added to a final concentration of 10 mM. The culture was quickly
432 vortexed and returned to the flow cytometer, leading to an approximately 20 s delay between
433 DCM addition and consistent fluorescence measurements. After DCM addition, the population
434 fluorescence was monitored for a further 10 min.

435 For each strain, a standard curve was constructed by diluting the DCM-grown culture to a
436 final OD₆₀₀ of 0.01 in a solution composed of 30 mM buffer, 50 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 μM
437 valinomycin, and 10 μM nigericin. Buffers used were MES pH 5.1, MES pH 5.3, MES pH 5.5,
438 MES pH 5.7, MES pH 6.1, PIPES pH 6.5, PIPES pH 6.9, and PIPES pH 7.3. The population
439 mean fluorescence ratio (pHluorin fluorescence divided by mCherry fluorescence) was measured
440 for each combination of strain and pH, then fit to a modified Henderson-Hasselbalch equation.
441 The internal pH of the experimental samples was calculated by finding the fluorescence ratio of
442 each cell, dividing the timecourse into 5 s intervals, calculating the population mean of the
443 fluorescence ratio for each interval, and comparing that ratio to the standard curve to calculate
444 the internal pH.

445

446 *qRT-PCR measurements*

447 For qRT-PCR measurements, cultures were grown to saturation in M-PIPES plus succinate,
448 and then diluted into the indicated media conditions. Upon reaching mid-log phase (typically at
449 half the optical density of a saturated culture), cultures were centrifuged for 10 min at 4500 g and

450 4 °C, washed once with 1 mL of water, and pelleted again at 8000 g for 3 min. Cell pellets were
451 flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C overnight.

452 RNA was extracted using an RNeasy Kit (Qiagen, Germantown, MD) and RNase-free
453 DNase (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse
454 transcribed using SuperScript III (Life Technologies, Carlsbad, CA), approximately 1 µg of
455 RNA, and gene specific primers (*rpsB* FWD 5'-ACCAACTGGAAGACCATCTC-3'; *rpsB* REV
456 5'-CTTCTCGAGCTTGTCCTTCTCAC-3'; *clcA* FWD 5'-ATCGTCACCGAGATGACCCAG-
457 3'; *clcA* REV 5'-CCAAGGTGTGATAGAGGCCG-3') according to the manufacturer's
458 directions. cDNA was quantified by qPCR, using a CFX-96 qPCR machine (Bio-Rad, Hercules,
459 CA) and EvaGreen qPCR mix (Biotium, Hayward, CA). Three technical replicates were
460 performed for each biological replicate. For each replicate, the *clcA* concentration was
461 normalized by the *rpsB* concentration. For each strain, the average normalized *clcA*
462 concentration was compared to the reference strain, typically PA1.

463

464 *Growth rate measurements*

465 Growth rates were measured using an automated system as described previously [62].
466 Briefly, strains were grown to saturation in M-PIPES + succinate and then diluted 64x into 640
467 µL of M-PIPES + succinate with the appropriate concentration of osmolyte (NaCl or sucrose) in
468 a 48-well plate. After the cultures reached saturation, they were again diluted 64x into 640 µL of
469 the appropriate media, with three replicate wells per condition. The optical density of these assay
470 plates was monitored every 45 min until the cultures again reached saturation. The growth rate of
471 the culture was calculated using CurveFitter [57].

472

473 Acknowledgements

474 The authors acknowledge financial support from the National Institutes of Health (F32
 475 GM106629 to J.K.M.), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, and the
 476 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (fellowships to A.A.C.N). The
 477 authors thank Y. Trotsenko for providing *M. extorquens* DM17, C. Miller for advice on testing
 478 ClcA directionality, D. D. Nayak for outlining several of the early concepts of this project, N. F.
 479 Delaney for providing six *Methylobacterium* isolates, and members of the Marx Laboratory for
 480 offering helpful comments on the manuscript. Genome sequencing at the University of Idaho
 481 IBEST Genomics Resources Core was supported by grants from the National Center for
 482 Research Resources (P20RR016448) and the National Institute of General Medical Sciences
 483 (P20GM103397) from the National Institutes of Health.

484

485 References

- 486 1. Gogarten JP, Doolittle WF, Lawrence JG (2002) Prokaryotic evolution in light of gene
 487 transfer. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2226-2238.
- 488 2. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of
 489 bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
- 490 3. Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, et al. (2011) Ecology drives a
 491 global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature* 480: 241-
 492 244.
- 493 4. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, et al. (2012) The shared antibiotic
 494 resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337: 1107-1111.
- 495 5. Shapiro BJ, Friedman J, Cordero OX, Preheim SP, Timberlake SC, et al. (2012) Population
 496 genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. *Science* 336: 48-51.
- 497 6. Springael D, Top EM (2004) Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics:
 498 new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends*
 499 *Microbiol* 12: 53-58.
- 500 7. Yadid I, Rudolph J, Hlouchova K, Copley SD (2013) Sequestration of a highly reactive
 501 intermediate in an evolving pathway for degradation of pentachlorophenol. *Proc Natl*
 502 *Acad Sci U S A* 110: E2182-2190.
- 503 8. Kim J, Copley SD (2012) Inhibitory cross-talk upon introduction of a new metabolic pathway
 504 into an existing metabolic network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2856-2864.

- 505 9. Michener JK, Nielsen J, Smolke CD (2012) Identification and treatment of heme depletion
506 attributed to overexpression of a lineage of evolved P450 monooxygenases. *Proc Natl*
507 *Acad Sci U S A* 109: 19504-19509.
- 508 10. Chang MC, Eachus RA, Trieu W, Ro DK, Keasling JD (2007) Engineering *Escherichia coli*
509 for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat Chem Biol* 3: 274-277.
- 510 11. Elena SF, Lenski RE (2003) Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and
511 genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet* 4: 457-469.
- 512 12. Blount ZD, Barrick JE, Davidson CJ, Lenski RE (2012) Genomic analysis of a key
513 innovation in an experimental *Escherichia coli* population. *Nature* 489: 513-518.
- 514 13. Quandt EM, Deatherage DE, Ellington AD, Georgiou G, Barrick JE (2014) Recursive
515 genomewide recombination and sequencing reveals a key refinement step in the
516 evolution of a metabolic innovation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:
517 2217-2222.
- 518 14. Winkler J, Kao KC (2012) Harnessing recombination to speed adaptive evolution in
519 *Escherichia coli*. *Metab Eng* 14: 487-495.
- 520 15. Chou HH, Chiu HC, Delaney NF, Segre D, Marx CJ (2011) Diminishing returns epistasis
521 among beneficial mutations decelerates adaptation. *Science* 332: 1190-1192.
- 522 16. Fong SS, Burgard AP, Herring CD, Knight EM, Blattner FR, et al. (2005) In silico design
523 and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid. *Biotechnol*
524 *Bioeng* 91: 643-648.
- 525 17. Trinh CT, Sreenc F (2009) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient conversion
526 of glycerol to ethanol. *Appl Environ Microbiol* 75: 6696-6705.
- 527 18. Lee SM, Jellison T, Alper HS (2012) Directed evolution of xylose isomerase for improved
528 xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ*
529 *Microbiol* 78: 5708-5716.
- 530 19. Lee DH, Palsson BO (2010) Adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 during
531 growth on a nonnative carbon source, L-1,2-propanediol. *Appl Environ Microbiol* 76:
532 4158-4168.
- 533 20. Gälli R, Leisinger T (1985) Specialized bacterial strains for the removal of dichloromethane
534 from industrial waste. *Conservation & Recycling* 8: 91-100.
- 535 21. Muller EE, Bringel F, Vuilleumier S (2011) Dichloromethane-degrading bacteria in the
536 genomic age. *Res Microbiol* 162: 869-876.
- 537 22. Schmid-Appert M, Zoller K, Traber H, Vuilleumier S, Leisinger T (1997) Association of
538 newly discovered IS elements with the dichloromethane utilization genes of
539 methylotrophic bacteria. *Microbiology* 143: 2557-2567.
- 540 23. Vuilleumier S, Chistoserdova L, Lee M-C, Bringel F, Lajus A, et al. (2009)
541 *Methylobacterium* genome sequences: A reference blueprint to Investigate microbial
542 metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. *PLoS One* 4: e5584.
- 543 24. Chistoserdova L (2011) Modularity of methylotrophy, revisited. *Environ Microbiol* 13: 2603-
544 2622.
- 545 25. Muller EEL, Hourcade E, Louhichi-Jelail Y, Hammann P, Vuilleumier S, et al. (2011)
546 Functional genomics of dichloromethane utilization in *Methylobacterium extorquens*
547 DM4. *Environmental Microbiology* 13: 2518-2535.
- 548 26. Kayser MF, Ucurum Z, Vuilleumier S (2002) Dichloromethane metabolism and C1
549 utilization genes in *Methylobacterium* strains. *Microbiology* 148: 1915-1922.

- 550 27. Michener JK, Vuilleumier S, Bringel F, Marx CJ (2014) Phylogeny poorly predicts the utility
551 of a challenging horizontally transferred gene in *Methylobacterium* strains. *J Bacteriol*
552 196: 2101-2107.
- 553 28. Kayser MF, Stumpp MT, Vuilleumier S (2000) DNA polymerase I is essential for growth of
554 *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 with dichloromethane. *J Bacteriol* 182:
555 5433-5439.
- 556 29. Kayser MF, Vuilleumier S (2001) Dehalogenation of dichloromethane by dichloromethane
557 dehalogenase/glutathione *S*-transferase leads to formation of DNA adducts. *J Bacteriol*
558 183: 5209-5212.
- 559 30. Marx CJ, Bringel F, Chistoserdova L, Moulin L, Farhan Ul Haque M, et al. (2012) Complete
560 genome sequences of six strains of the genus *Methylobacterium*. *J Bacteriol* 194: 4746-
561 4748.
- 562 31. Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, et al. (2004) X-ray
563 structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36-44.
- 564 32. Emr SD, Hanley-Way S, Silhavy TJ (1981) Suppressor mutations that restore export of a
565 protein with a defective signal sequence. *Cell* 23: 79-88.
- 566 33. Smith MA, Clemons WM, Jr., DeMars CJ, Flower AM (2005) Modeling the effects of prl
567 mutations on the *Escherichia coli* SecY complex. *J Bacteriol* 187: 6454-6465.
- 568 34. Dalal K, Duong F (2009) The SecY complex forms a channel capable of ionic
569 discrimination. *EMBO Rep* 10: 762-768.
- 570 35. Accardi A, Miller C (2004) Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue
571 of CIC Cl⁻ channels. *Nature* 427: 803-807.
- 572 36. Firsova JE, Doronina NV, Trotsenko YA (2010) Analysis of the key functional genes in new
573 aerobic degraders of dichloromethane. *Microbiology* 79: 66-72.
- 574 37. Sun H, Tsunenari T, Yau KW, Nathans J (2002) The vitelliform macular dystrophy protein
575 defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4008-4013.
- 576 38. Kvitek DJ, Sherlock G (2011) Reciprocal sign epistasis between frequently experimentally
577 evolved adaptive mutations causes a rugged fitness landscape. *PLoS Genet* 7: e1002056.
- 578 39. Chou HH, Delaney NF, Draghi JA, Marx CJ (2014) Mapping the fitness landscape of gene
579 expression uncovers the cause of antagonism and sign epistasis between adaptive
580 mutations. *PLoS Genet* 10: e1004149.
- 581 40. Rokyta DR, Joyce P, Caudle SB, Miller C, Beisel CJ, et al. (2011) Epistasis between
582 Beneficial Mutations and the Phenotype-to-Fitness Map for a ssDNA Virus. *PLoS Genet*
583 7: e1002075.
- 584 41. Tsunenari T, Sun H, Williams J, Cahill H, Smallwood P, et al. (2003) Structure-function
585 analysis of the bestrophin family of anion channels. *J Biol Chem* 278: 41114-41125.
- 586 42. Inoue T, Shingaki R, Hirose S, Waki K, Mori H, et al. (2007) Genome-wide screening of
587 genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 189: 950-957.
- 588 43. Rahn-Lee L, Gorbatyuk B, Skovgaard O, Losick R (2009) The conserved sporulation protein
589 YneE inhibits DNA replication in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 191: 3736-3739.
- 590 44. Lee MC, Chou HH, Marx CJ (2009) Asymmetric, bimodal trade-offs during adaptation of
591 *Methylobacterium* to distinct growth substrates. *Evolution* 63: 2816-2830.
- 592 45. Lee MC, Marx CJ (2012) Repeated, selection-driven genome reduction of accessory genes in
593 experimental populations. *PLoS Genet* 8: e1002651.
- 594 46. Atwood KC, Schneider LK, Ryan FJ (1951) Periodic selection in *Escherichia coli*. *Proc Natl*
595 *Acad Sci U S A* 37: 146-155.

- 596 47. Perez-Pantoja D, Nikel PI, Chavarria M, de Lorenzo V (2013) Endogenous stress caused by
597 faulty oxidation reactions fosters evolution of 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria.
598 PLoS Genet 9: e1003764.
- 599 48. Kawecki TJ, Lenski RE, Ebert D, Hollis B, Olivieri I, et al. (2012) Experimental evolution.
600 Trends Ecol Evol 27: 547-560.
- 601 49. Wong A, Rodrigue N, Kassen R (2012) Genomics of adaptation during experimental
602 evolution of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Genet 8:
603 e1002928.
- 604 50. Traverse CC, Mayo-Smith LM, Poltak SR, Cooper VS (2013) Tangled bank of
605 experimentally evolved *Burkholderia* biofilms reflects selection during chronic
606 infections. Proceedings of the National Academy of Sciences 110: E250–E259.
- 607 51. Top EM, Springael D, Boon N (2002) Catabolic mobile genetic elements and their potential
608 use in bioaugmentation of polluted soils and waters. FEMS Microbiol Ecol 42: 199-208.
- 609 52. Ikuma K, Gunsch CK (2013) Successful genetic bioaugmentation with *Pseudomonas putida*
610 for toluene degradation in soil columns. Environmental Chemistry Letters 11: 365-370.
- 611 53. Verwaal R, Jiang Y, Wang J, Daran JM, Sandmann G, et al. (2010) Heterologous carotenoid
612 production in *Saccharomyces cerevisiae* induces the pleiotropic drug resistance stress
613 response. Yeast 27: 983-998.
- 614 54. Bernhardt R, Urlacher VB (2014) Cytochromes P450 as promising catalysts for
615 biotechnological application: chances and limitations. Appl Microbiol Biotechnol 98:
616 6185-6203.
- 617 55. Kizer L, Pitera DJ, Pfleger BF, Keasling JD (2008) Application of functional genomics to
618 pathway optimization for increased isoprenoid production. Appl Environ Microbiol 74:
619 3229-3241.
- 620 56. Ro DK, Ouellet M, Paradise EM, Burd H, Eng D, et al. (2008) Induction of multiple
621 pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of
622 anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. BMC Biotechnol 8: 83.
- 623 57. Delaney NF, Kaczmarek ME, Ward LM, Swanson PK, Lee MC, et al. (2013) Development
624 of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for
625 *Methylobacterium extorquens*. PLoS One 8: e62957.
- 626 58. Deatherage DE, Barrick JE (2014) Identification of mutations in laboratory-evolved
627 microbes from next-generation sequencing data using breseq. Methods Mol Biol 1151:
628 165-188.
- 629 59. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, et al. (2009) Enzymatic
630 assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods 6: 343-345.
- 631 60. Fulton GL, Nunn DN, Lidstrom ME (1984) Molecular cloning of a malyl coenzyme A lyase
632 gene from *Pseudomonas* sp. strain AM1, a facultative methylotroph. Journal of
633 Bacteriology 160: 718-723.
- 634 61. Marx CJ (2008) Development of a broad-host-range *sacB*-based vector for unmarked allelic
635 exchange. BMC Research Notes 1: 1.
- 636 62. Delaney NF, Rojas Echenique JI, Marx CJ (2013) Clarity: an open-source manager for
637 laboratory automation. J Lab Autom 18: 171-177.

641 **Figure Legends**

642 Figure 1: Experimental evolution recapitulates post-transfer optimization of a challenging
643 catabolic pathway. The natural isolate, DM4, grows well on dichloromethane. (A) Past efforts to
644 explain the genetics of growth on DCM relied on gene knockouts (yellow) to identify important
645 genes [25]. (B) We deliberately transferred the *dcmA* gene (red) into naïve recipient
646 *Methylobacterium* strains, which then grew poorly on DCM [27]. (C) Serial propagation on
647 DCM selected for mutants with increased fitness on DCM. (D) Whole genome resequencing
648 allowed us to identify these mutations (blue), and reconstructing the individual mutations in wild
649 type cells verified that they were causal. We then worked backwards from the mutations to
650 identify the stress that the mutations overcame. (E) Introducing a plasmid containing both the
651 pathway (red) and a solution to the most common limiting stress (blue) allowed efficient growth
652 on DCM without chromosomal modifications to the host. (F) The biochemistry of DCM
653 dehalogenation produces several challenging compounds (red) that potentially limit growth on
654 DCM.

655

656 Figure 2: Evolved isolates from four of the five transconjugants have improved fitness relative to
657 the ancestor. A single clonal isolate was selected from each replicate population after 150
658 generations of growth on DCM. Each isolate was mixed with the reference strain,
659 DM4 Δ *dcmA*+pJM10, and grown on DCM to determine competitive fitness. Error bars show ± 1
660 standard deviation, calculated from three biological replicates. The horizontal dashed line
661 indicates equal fitness to the reference isolate, DM4.

662

663 Figure 3: Each evolved isolate has a mutation in at least one of four loci. (A) A combination of
 664 whole genome resequencing and targeted Sanger sequencing allowed the identification of
 665 mutations at four loci, encoding the protein translocase *secY*, the chloride/proton antiporter *clcA*,
 666 a hypothetical protein that we named *edgA*, and the bestrophin-homolog chloride channel *besA*.
 667 A simplified phylogenetic tree is shown at left [27]. Mutation names indicate the genetic locus
 668 followed by the isolate name in which it has been detected. (B) Reconstruction of these single
 669 mutations in AM1 and PA1 demonstrated that each individual mutation was beneficial, even in a
 670 host in which the mutation was not observed (*secY* in PA1 and *clcA* in AM1). (C) In PA1, the
 671 double mutant *besA*^{E2}/*clcA*^{E2} has similar fitness to the *besA*^{E2} single mutant when grown on
 672 DCM. During the evolution of population E2, the *clcA*^{E2} mutation fixed first, followed by the
 673 *besA*^{E2} mutation. Each of the reconstructed strains expresses *dcmA* from plasmid pJM10. Error
 674 bars show ± 1 standard deviation, calculated from three biological replicates. N.D.: not
 675 determined.

676
 677 Figure 4: Mutations in *secY* and *clcA* are predicted to increase chloride export. (A) When
 678 mapped to the crystal structure of SecY from *Methanocaldococcus jannaschii* [31], the seven
 679 mutations to *secY* cluster in a small region of the protein structure (blue and cyan) at the interface
 680 between the channel and plug (red) that is associated with leakage of small anions. (B) Mutations
 681 to the *clcA* promoter in isolates E1 and E2 lead to significantly increased transcription of *clcA*, as
 682 measured by qRT-PCR (one tailed Welch's t-test with two degrees of freedom). Error bars show
 683 ± 1 standard deviation, calculated from three biological replicates. (C) Adding DCM to strains
 684 that overexpress *clcA* leads to a larger decrease in internal pH. Strains contain pJM40, expressing
 685 both *dcmA* and a fluorescent pH biosensor. The strain with a mutated *clcA* promoter (blue)

686 overexpresses ClcA relative to the wild type strain (green). At t=0, DCM was added to a final
687 concentration of 10 mM. After an approximate delay of 20 s, the culture was continuously
688 sampled with a flow cytometer to determine the dynamics of the internal pH. Both strains
689 showed a transient decrease in pH, but the decrease is larger for the *clcA* overexpression strain
690 (p=0.036, one-tailed Welch's t-test with two degrees of freedom). (D) Mutations to *secY*, but not
691 to *clcA*, increase chloride sensitivity. Growth rates of three PA1 strains (wild type, *secY*^{A1}, and
692 *clcA*^{E1}) were measured using an automated assay system. The osmolarity of the medium was
693 varied through the addition of sucrose or sodium chloride. The *secY*^{A1} mutant did not grow at the
694 highest chloride concentration.

695
696 Figure 5: DM4 requires *clcA* overexpression to grow on DCM. (A) The environmental DCM-
697 degrading isolates, DM4 and DM17, overexpress *clcA* relative to three other strains of *M.*
698 *extorquens* (one tailed Welch's t-test with two degrees of freedom). Error bars show ± 1 standard
699 deviation, calculated from three biological replicates. (B) Growth on DCM in DM4 and PA1
700 depends on the *clcA* promoter but not the strain background. A 140-bp region upstream of *clcA*
701 (the '*clcA* promoter') was swapped between PA1 and DM4. Regardless of the genetic
702 background, strains with the DM4 *clcA* promoter overexpressed *clcA* and were more fit on DCM
703 compared to strains with the PA1 *clcA* promoter. All strains expressed *dcmA* from plasmid
704 pJM10. Error bars show ± 1 standard deviation, calculated from three biological replicates.

705

706 Figure 6: A mobile genetic element containing both *dcmA* and *clcA* allows a diverse array of
707 *Methylobacterium* isolates to grow efficiently on DCM. Plasmids containing either *dcmA* (x-
708 axis) or *dcmA* and *clcA* (y-axis) were introduced into 16 different *Methylobacterium* strains,

709 including the 5 strains used to found the evolved populations (black) and 11 that were new
710 (blue). Each transconjugant was tested against the reference, DM4 Δ *dcmA*+pJM10, to determine
711 its competitive fitness. Note that negative fitness values indicate net death over the course of the
712 competition. The dashed line indicates equal fitness of the two transconjugants, as would be
713 expected if *clcA* expression were neutral. Error bars show ± 1 standard deviation, calculated from
714 three biological replicates. Figure 3, Figure Supplement 1: Mutations have relatively small fitness
715 effects during growth on succinate compared to the benefits of three-fold or more on DCM.

716
717 Figure 3, Figure Supplement 2: Comparison of competitive fitness of single and double mutants
718 in *M. extorquens* PA1 explains evolutionary patterns. All tested strains contain *dcmA* in pJM10.

719 (A) The *secY*^{A1}/*clcA*^{E1} PA1 double mutant is less fit than the *clcA*^{E1} single mutant during growth
720 on DCM. (B) The *edgA*^{E3}/*clcA*^{E1} PA1 double mutant is less fit than the *clcA*^{E1} single mutant
721 during growth on DCM.

722

723

724

725 Figure 3, Figure Supplement 3: Allele frequency dynamics for *M. nodulans* populations. For
726 each of the four *M. nodulans* populations, the yield (as measured by OD₆₀₀) was determined at
727 the end of each serial culture. The near fixation of the indicated mutations, to *secY* and *edgA*,
728 correspond to dramatic transitions in the culture yield.

729

730

731 Figure 3, Figure Supplement 4: In population E2, the *clcA*^{E2} mutation fixed first, followed by
732 *besA*^{E2}. As shown in Figure 3C, the *besA*^{E2} mutation was moderately beneficial in the *clcA*^{E2}
733 background, while the reverse was not true.

734

735 Figure 4, Figure Supplement 1: Relative *clcA* expression is independent of the growth substrate.
736 All five strains were grown to mid-log phase in M-PIPES containing either 5 mM DCM plus
737 0.075 mM methanol (green) or 3.5 mM succinate (blue). For each growth substrate, *clcA*
738 expression was measured by qRT-PCR and compared to wild type PA1 under the same
739 conditions. Relative *clcA* expression across different strains was similar for both growth
740 conditions. Error bars show ± 1 standard deviation, calculated from three biological replicates. P
741 values are calculated using a one-tailed Welch's t-test with two degrees of freedom

742

743 Figure 5, Figure Supplement 1: Overexpression of *clcA*, either by the DM4 *clcA* promoter or the
744 pJM83 *clcA/dcmA* dual expression plasmid, confers high fitness on DCM. Replacing the *clcA*
745 promoter in DM4 $\Delta dcmA$ with the *clcA* promoter from PA1 severely reduces fitness on DCM.
746 However, this fitness defect can largely be compensated through *clcA* overexpression by the
747 introduction of the pJM83 *dcmA/clcA* dual expression plasmid. Error bars show ± 1 standard
748 deviation, calculated from three biological replicates.

