

**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

## 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 Methylophiles* (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.

## 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  $\beta$ -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 explosivo 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,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 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 (ARAUJO 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).

<b>Organismo</b>	<b>Linhagem</b>	<b>GenBank Assembly ID</b>	<b>Tamanho do genoma (Mpb)</b>	<b>Conteúdo CG (%)</b>	<b>Número de Genes</b>
<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	-

## 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.

CAMILI, 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.; LAPHORN, 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  $\beta$ -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 C<sub>1</sub> 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 N<sub>2</sub>-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.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3073-3077, 2000.

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

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.; SPÍCHAL, 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 PRS<sub>9</sub> 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.; VOULHOX, 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 Methylo trophics (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; TROTSENKO 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 CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, 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.

## 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.; YEH, 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.; QUROLLO, 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.; KLOEPFER, 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.

LACAVALA, 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 (FORSEBERG 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 evolvimento 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.

### 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.; WEISSENBAACH, 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 apresentados, os quais, também podem ser melhores estudados em outras condições ambientais.