

MARÍA ALEJANDRA MANTILLA GALINDO

**Exsudatos radiculares como reguladores da colonização da planta
por *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens***

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

São Paulo
2019

MARÍA ALEJANDRA MANTILLA GALINDO

**Exsudatos radiculares como reguladores da colonização da planta
por *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens***

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Versão corrigida

São Paulo
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mantilla Galindo, María Alejandra
Exsudatos radiculares como reguladores da
colonização da planta por *Methylobacterium* spp. e
Methylobacterium extorquens / María Alejandra Mantilla
Galindo; orientador Wellington Luiz de Araújo. --
São Paulo, 2019.
158 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Exsudatos radiculares. 2. Biofilmes. 3.
Interação planta-bactéria. 4. Colonização. 5.
Ecologia de interações. I. Luiz de Araújo,
Wellington, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): María Alejandra Mantilla Galindo

Título da Dissertação/Tese: Exsudatos radiculares como reguladores da colonização da planta por *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **850/2016** referente ao projeto intitulado: "*Influência dos exsudatos vegetais na ecologia de *Methylobacterium spp.* na rizosfera de diferentes plantas hospedeiras*" sob a responsabilidade de **Maria Alejandra Mantilla Galindo** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Welington Luiz de Araújo**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 13 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.02.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção CEP nº 850/2016, aprovado em 13/02/2017, e por solicitação do Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo, do departamento de Microbiologia, informo que o título do projeto da aluna **María Alejandra Mantilla Galindo** foi alterado para "*Exsudatos radiculares como reguladores da colonização da planta por Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens*", visto que a bactéria *Methylobacterium* spp., objeto de estudo do projeto, foi taxonomicamente reconsiderada e feita nova organização filogenética, originando um novo gênero: *Methylobacterium*.

São Paulo, 12 de setembro de 2019.

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora da CEP SH-ICB/USP

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Dedico a minha família,

*pelo amor, apoio, compreensão e especialmente por nunca
me permitir desistir de meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus, por me permitir continuar lutando por meus sonhos dia a dia;

A meus pais e irmã que sem importar a distância nem os horários sempre estiveram aí para me apoiar quando mais precisei, por não me permitir desistir e por acreditarem em mim;

Ao Prof. Dr. Welington, pela oportunidade, por me permitir trabalhar ao seu lado, pelas longas tardes de discussão no seu escritório, pela infinita paciência e por acreditar em mim;

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, por permitir o desenvolvimento da identificação dos exsudatos vegetais por GC-MS, e especialmente a Dra. Thaís Regiani Cataldi, pela paciência e disposição de me ensinar;

À secretária do programa Pós-Graduação em Microbiologia Gisele de Graça Santana, pela paciência, por sempre me lembrar dos prazos, documentações e pela amizade;

À agência de fomento CAPES pela bolsa inicial outorgada;

À Dra. Manuella Nóbrega Dourado, pela orientação, por todos os conselhos e assessorias;

À Dra. Daine Souza, pela disposição, por sempre tirar as minhas dúvidas e disponibilizar todos seus conhecimentos;

A minha grande amiga Sarina Tsui, por sempre estar disposta a me escutar, pela ajuda com todos os experimentos doidos, pelas orientações e por brindar sempre um pouco de seu tempo para me ajudar a corrigir meus erros de português;

A Alejandra Marin, por me ensinar que a amizade existe, por ser a minha família aqui no Brasil e por todas as experiências compartilhadas;

A todos os integrantes do LABMEM, todos vocês fizeram possível que hoje eu esteja completando essa fase da minha vida;

A o Dr. Leandro Maza Garrido, por sempre tirar as minhas dúvidas e estar disposto a me ajudar;

As minhas amigas, Luana, Sofia, Johana, Mireia, Rosmary, Marilia, pelas tardes de conversa, pelos conselhos e por brindar-me sempre companhia para recorrer os cantinhos do Brasil.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Um agradecimento especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida, para o desenvolvimento do projeto: Influência dos exsudatos da planta na ecologia de *Methylobacterium* spp. durante a interação com a planta hospedeira. **Processo FAPESP N° 2017/03422-4**

RESUMO

MANTILLA GALINDO, M. A. **Exsudatos radiculares como reguladores da colonização da planta por *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens***. 2019. 158f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O gênero *Methylobacterium* pode estabelecer associações epifíticas ou endofíticas com diferentes espécies vegetais. Para o estabelecimento dessa interação, ocorre uma comunicação química coordenada entre as partes, em que os exsudatos da planta hospedeira provavelmente desempenham um papel fundamental. Estudos anteriores, mostraram que a linhagem *M. mesophilicum* SR1.6/6 apresenta maior crescimento na presença de exsudatos vegetais, induzindo uma alteração no padrão da expressão de genes possivelmente envolvidos na colonização (atividade catalítica, formação de biofilme, metabolismo primário e genes envolvidos em resposta antioxidante). No entanto, o papel dos exsudatos vegetais, durante a interação com *Methylobacterium*, ainda não é bem entendido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de exsudatos radiculares de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) no estabelecimento da interação com *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*. Assim, foram desenhados *primers* específicos para 3 linhagens de *Methylobacterium* e uma linhagem de *Methylobacterium extorquens*, com a finalidade de quantificar cada uma das linhagens no solo e na raiz de plântulas de soja e milho por qPCR. Além disso, foi feita a identificação dos exsudatos vegetais durante a interação com *Methylobacterium* por GC-MS e a influência dos exsudatos vegetais na formação de biofilme também foi avaliada. Deste modo, foi observado que as linhagens AR1.6/2 (*M. extorquens*) e MP2-3 (*M. hispanicum*), quando inoculadas individualmente, sobreviveram no solo por até 90 dias. Enquanto as linhagens SR1.6/6 (*M. mesophilicum*) e R16E (*M. fujisawaense*) apresentaram menor taxa de sobrevivência no mesmo período avaliado, ademais foi visto que no consórcio bacteriano, só a linhagem MP2-3 sobreviveu no solo. Nos experimentos de interação, foi observado que a linhagem SR1.6/6, inoculada individualmente apresentou maior abundância nas raízes de plântulas de soja, e quando inoculada no consórcio, apresentou menor abundância. Em raiz de milho, a abundância das bactérias não diferiu significativamente. A partir das análises de GC-MS, foi observado que plântulas de soja e milho apresentaram perfis diferenciados, sendo que plântulas de milho mostraram maior porcentagem de carboidratos (16%) e ácidos orgânicos (7%), em relação aos exsudatos de plântulas de soja, que apresentaram 14% de carboidratos e 2% de ácidos orgânicos. Durante a interação, houve um aumento na abundância relativa de carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos tanto em plântulas de soja como de milho. Por último, foi evidenciado que os exsudatos de plântulas de milho induziram a formação de biofilme bacteriano. Os resultados obtidos neste trabalho, evidenciam a influência dos exsudatos na seleção de linhagens específicas de *Methylobacterium* e ou *Methylobacterium*, mediante a disponibilização de fontes específicas de carbono. Além disso, é possível sugerir que o sucesso da colonização da planta por *Methylobacterium* é dependente do metabolismo dessas fontes de nutrientes.

Palavras chave: Exsudatos radiculares. Biofilmes. Interação planta-bactéria. Colonização. Ecologia de interações.

ABSTRACT

MANTILLA GALINDO, M. A. **Root exudates as regulators of plant colonization by *Methylobacterium* spp. and *Methylobacterium extorquens*** 2019, 158f. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The genus *Methylobacterium* can establish epiphytic or endophytic associations with different plant species. For the establishment of interaction, chemical communication between plant and bacteria take place, in this communication the root exudates probably play a key role. Previous studies showed that the strain *M. mesophilicum* SR1.6/6 increased their development in root exudates and the expression of colonization related genes (catalytic activity, biofilm formation, primary metabolism and antioxidant genes). However, the importance and functions of plant root exudates during interaction with *Methylobacterium* are not well understood. Therefore, this work aims to determinate the role of soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*) seedling root exudates in the establishment of interaction with *Methylobacterium* spp. and *Methylobacterium extorquens*. Thus, specific primers were designed for three *Methylobacterium* spp. strains and one *Methylobacterium extorquens* strain. These primers were used for the strain's quantification in soil and seedlings roots (soybean and corn) by qPCR. Additionally, the composition of seedlings roots in interaction with *Methylobacterium* were identified by GC-MS and the influence of exudates in biofilm formation were evaluated. Thus, it was observed that the strains AR1.6/2 (*M. extorquens*) and MP2-3 (*M. hispanicum*) when inoculated individually survived in the soil for up to 90 days, while the strains SR1.6/6 (*M. mesophilicum*) and R16E (*M. fujisawaense*) showed a low survival. In bacterial consortia, only MP2-3 strain was survived for 90 days in soil. In the interaction experiments was evidenced that SR1.6/6 strain when inoculated individually had the biggest abundance in soybean roots but in consortia had the lowest. In corn root, the abundance of bacteria didn't differ significantly. From GC-MS analyzes, was observed that soybean and corn seedlings presented different profiles, and corn seedlings showed a higher percentage of carbohydrates (16%) and organic acids (7%), in comparison with soybean, which presented 14% of carbohydrates and 2% of organic acids. During interaction, carbohydrates, organic acids and amino acids percentages increased in soybean and corn seedlings. Finally, it was evidenced that corn seedling exudates induced the bacterial biofilm formation. The results obtained in this work show the influence of exudates in the selection of specific strains of *Methylobacterium* and or *Methylobacterium*, by providing specific carbon sources, and it's suggested that the success of plant colonization by *Methylobacterium* is dependent on the metabolism of these nutrient sources.

Key words: Root exudates. Biofilms. Plant-bacteria interaction. Colonization. Ecology of interactions.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Principais mecanismos pelos quais *Methylobacterium* promove o crescimento vegetal e interage com a planta hospedeira.25
- Figura 2** - Árvore filogenética baseada no 16S rRNA. de linhagens atribuídas ao gênero *Methylobacterium* até o ano 2018.....29
- Figura 3** - Principais interações mediadas pelos exsudatos na rizosfera da planta.32
- Figura 4** - Organização geral do presente estudo37
- Figura 5** - Representação gráfica dos tratamentos experimentais na interação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* com plântulas de milho e soja.48
- Figura 6** - Fluxograma da recuperação dos exsudatos e do material vegetal.50
- Figura 7** - Curvas de crescimento de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*. .56
- Figura 8** - Sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* em solo esterilizado.....58
- Figura 9** - Diferenciação dos padrões de sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* em solo esterilizado.....59
- Figura 10** - Influência de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* no comprimento da raiz de plântulas.60
- Figura 11** - Características fisiológicas das linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* selecionadas63
- Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose de PCR com primers desenhados para a detecção de linhagens específicas de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*. .64
- Figura 13** - Curvas de amplificação obtidas a partir das reações de qPCR com primers específicos para *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*.66
- Figura 14** - Curvas de sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* no solo.....67
- Figura 15** - Interação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* com plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).68
- Figura 16** - Quantificação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* na raiz de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).69
- Figura 17** - Metabólitos identificados nos tratamentos avaliados com plântulas de soja (*Glycine max*) e plântulas de milho (*Zea mays*).70

Figura 18 - Metabólitos identificados nos exsudatos radiculares de plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) e milho (<i>Zea mays</i>).	71
Figura 19 Heatmap dos 25 metabólitos significativamente diferentes entre plântulas de soja e milho	72
Figura 20 - Metabólitos identificados nos exsudatos de plântulas de soja e milho durante a interação com <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i>	73
Figura 21 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de <i>Methylobacterium extorquens</i> AR1.6/2 com plântulas de soja	74
Figura 22 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de <i>Methylobacterium fujisawaense</i> R16E com plântulas de soja.....	76
Figura 23 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6 com plântulas de soja.....	77
Figura 24 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de <i>Methylobacterium hispanicum</i> MP2-3 com plântulas de soja	78
Figura 25 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação do consórcio bacteriano com plântulas de soja.....	80
Figura 26 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de <i>Methylobacterium extorquens</i> AR1.6/2 com plântulas de milho.....	84
Figura 27 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de <i>Methylobacterium fujisawaense</i> R16E com plântulas de milho.	86
Figura 28 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6 com plântulas de milho.....	87
Figura 29 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de <i>Methylobacterium hispanicum</i> MP2-3 com plântulas de milho.	88
Figura 30 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação do consórcio bacteriano com plântulas de milho.....	90
Figura 31 - Produção de biofilme por <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> .94	
Figura 32 - Comparação da produção de biofilme por <i>Methylobacterium</i> spp., e <i>Methylobacterium extorquens</i> em meio SPW e em meio suplementado com exsudatos de plântulas de milho.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de estudo e respectivos hospedeiros.	38
Tabela 2 - <i>Primers</i> desenhados para a detecção de linhagens de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i>	43
Tabela 3 - Resumo dos metabólitos com diferença significativa nos exsudatos de plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) durante a interação com <i>Methylobacterium extorquens</i> e <i>Methylobacterium</i> spp.	81
Tabela 4 - Resumo dos metabólitos com diferença significativa nos exsudatos de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) durante a interação com <i>Methylobacterium extorquens</i> e <i>Methylobacterium</i> spp.	91

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Fórmula utilizada para a elaboração das curvas padrão.	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido Índolacético
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i>
C_t	<i>Threshold Cycle</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
D.O.	Densidade Óptica
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EPS	Exopolissacarídeos
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês <i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i>
Kb	Kilobase (s)
SPW	Meio Perwinkle Wilt modificado
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PGPB	Bactérias promotoras do crescimento vegetal, do inglês <i>Plant Growth Promoting Bacteria</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
qPCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase, do inglês <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
rRNA	RNA ribossomal
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE SIMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Grão centígrado (s)
g.L^{-1}	Gramas por litro
(<)	Menor que
μL	Microlitro
mg.mL^{-1}	Miligramas por mL
(m/v)	massa por volume
(%)	Porcentagem
(v/v)	volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	Aspetos gerais do gênero <i>Methylobacterium</i>	22
2.2	Interação de <i>Methylobacterium</i> spp. com plantas hospedeiras	26
2.3	O gênero <i>Methylobacterium</i>	27
2.4	Exsudatos vegetais como mediadores da interação planta-micro-organismo na rizosfera.....	30
2.5	Importância dos exsudatos vegetais na interação planta-micro-organismo.....	33
2.6	Outras funções dos exsudatos vegetais	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivos específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	Linhagens e condições de cultura	37
4.2	Material vegetal.....	38
4.3	Curvas de crescimento de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i>	39
4.4	Sobrevivência de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> em solo esterilizado	39
4.5	Promoção do crescimento radicular de plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) e milho (<i>Zea mays</i>), por <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i>	40
4.6	Desenho de <i>primers</i> para a detecção e quantificação de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i>	41
4.7	Ensaio de <i>primers</i> específicos para linhagens de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> por PCR em tempo real.....	44
4.8	Sobrevivência de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> no solo.	44
4.8.1	Inoculação do solo não esterilizado e recuperação do DNA	44
4.8.2	Quantificação de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> no solo por PCR em tempo real.....	45
4.9	Interação de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> com plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) e soja (<i>Glycine max</i>).....	47
4.9.1	Obtenção de plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) e milho (<i>Zea mays</i>)	47
4.9.2	Tratamentos experimentais	47
4.9.3	Inoculação de linhagens de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> em plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) e milho (<i>Zea mays</i>)	49
4.9.4	Recuperação dos exsudatos e extração de DNA bacteriano a partir das raízes de plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) e milho (<i>Zea mays</i>)	49

4.9.5	<i>Quantificação de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens nas raízes de plântulas de soja (Glycine max) e milho (Zea mays) por PCR em tempo real</i>	51
4.9.6	<i>Identificação dos exsudatos bacterianos e das plântulas de soja e milho por GC-MS</i>	51
4.9.6.1	Preparo das amostras e extração de metabólitos	51
4.9.6.2	Identificação dos exsudatos por GC-MS	52
4.9.6.3	Análise estatística dos metabólitos identificados por GC-MS	53
4.10	<i>Produção de Biofilme por Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens em meio de cultura SPW</i>	53
4.11	<i>Produção de Biofilme por Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens na presença dos exsudatos de plântulas de milho</i>	54
4.12	<i>Análises Estatísticas</i>	54
5	RESULTADOS	56
5.1	<i>Curvas de crescimento de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens</i>	56
5.2	<i>Sobrevivência de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens em solo esterilizado</i>	57
5.3	<i>Promoção do crescimento radicular de plântulas de soja (Glycine max) e milho (Zea mays), por Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens</i>	60
5.4	<i>Seleção de linhagens de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens</i>	61
5.5	<i>Desenho de primers para a detecção e quantificação de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens</i>	63
5.6	<i>Ensaio de primers específicos para linhagens de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens por PCR em tempo real</i>	65
5.7	<i>Sobrevivência de linhagens de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens no solo</i>	66
5.8	<i>Interação de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens com plântulas de milho (Zea mays) e soja (Glycine max)</i>	68
5.9	<i>Quantificação de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens na raiz de plântulas de soja (Glycine max) e milho (Zea mays)</i>	69
5.10	<i>Identificação dos exsudatos vegetais e bacterianos por GC-MS</i>	70
5.10.1	<i>Identificação dos exsudatos de plântulas de soja (Glycine max) e milho (Zea mays)</i> ..	70
5.10.2	<i>Identificação dos exsudatos de plântulas de soja (Glycine max) e milho (Zea mays) durante a interação com Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens</i>	72
5.10.2.1	Plântulas de soja em interação com <i>Methylobacterium extorquens</i> AR1.6/2	74
5.10.2.2	Plântulas de soja em interação com <i>Methylobacterium fujisawaense</i> R16E	75
5.10.2.3	Plântulas de soja em interação com <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6....	76
5.10.2.4	Plântulas de soja em interação com <i>Methylobacterium hispanicum</i> MP2-3.....	78
5.10.2.5	Plântulas de soja em interação com o consórcio bacteriano	79

5.10.2.6	Plântulas de milho em interação com <i>Methylobacterium extorquens</i> AR1.6/2	84
5.10.2.7	Plântulas de milho em interação com <i>Methylobacterium fujisawaense</i> R16E.....	85
5.10.2.8	Plântulas de milho em interação com <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6	86
5.10.2.9	Plântulas de milho em interação com <i>Methylobacterium hispanicum</i> MP2-3.....	87
5.10.2.10	Plântulas de milho em interação com o consórcio bacteriano.....	89
5.11	Produção de biofilme por <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> in vitro	94
5	DISCUSSÃO	96
6	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICES	117
A	– Representação das regiões utilizadas no desenho de <i>primers</i> específicos de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i>	117
B	– Eletroforese em gel de agarose de PCR com <i>primers</i> para amplificação do gene 16S rRNA com o DNA genômico das diferentes linhagens de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> usados para a validação dos <i>primers</i> desenhados.....	119
C	– Curvas Padrão dos <i>primers</i> utilizados para a quantificação das linhagens de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> AR1.6/2 no solo.....	120
D	– Eletroforese em gel de agarose de PCR com <i>primers</i> para amplificação do gene 16S rRNA com o DNA extraído das amostras de solo.	122
E	– Curvas Padrão dos <i>primers</i> utilizados para a quantificação das linhagens de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> AR1.6/2 na raiz de plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) e milho (<i>Zea Mays</i>).....	123
F	– Eletroforese em gel de agarose de PCR com <i>primers</i> para amplificação do gene 16S rRNA com o DNA extraído das raízes de plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) e milho (<i>Zea mays</i>).....	125
G	– Curvas de crescimento <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i>	126
H	– Sobrevivência de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i> em solo esterilizado.	128
I	– <i>Heat map</i> com os metabólitos identificados nas plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) e milho (<i>Zea mays</i>) sem inoculação	130
J	– Resultados teste <i>t</i> e PCA da comparação dos exsudatos produzidos por plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) e milho (<i>Zea mays</i>)	131
K	– Resultados análises estatísticas plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) em interação com <i>Methylobacterium extorquens</i> AR1.6/2	133
L	– Resultados análises estatísticas plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) em interação com <i>Methylobacterium fujisawaense</i> R16E.....	135
M	– Resultados análises estatísticas plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) em interação com <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6	137

N – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) em interação com <i>Methylobacterium hispanicum</i> MP2-3	140
O – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (<i>Glycine max</i>) em interação com o consórcio bacteriano.....	143
P – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) em interação com <i>Methylobacterium extorquens</i> AR1.6/2	146
Q – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) em interação com <i>Methylobacterium fujisawaense</i> R16E.....	148
R – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) em interação com <i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6	150
S – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) em interação com <i>Methylobacterium hispanicum</i> MP2-3	152
T – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) em interação com o consórcio bacteriano	154
ANEXOS	157
A - Análises físico-químicas dos solos utilizados nos experimentos descritos nos itens 4.4 e 4.8.....	157
B - Comparação de genomas de <i>Methylobacterium</i> spp. e <i>Methylobacterium extorquens</i>	158

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Methylobacterium* pertence à classe Alfa-proteobacteria, ordem Rhizobiales e família Methylobacteriaceae (DONOVAN; MCDONALD; WOOD, 2014). Este gênero é constituído por 32 espécies descritas sendo *Methylobacterium organophilum* a espécie tipo do gênero (GREEN; ARDLEY, 2018). Membros deste gênero se caracterizam por apresentar a capacidade de metabolizar o metanol na ausência da biotina como cofator (GREEN; ARDLEY, 2018), e por desenvolver associações endofíticas ou epifíticas com diversas espécies de plantas (ARAÚJO et al., 2015; DOURADO et al., 2013). Estas associações, geralmente, apresentam um estímulo positivo na planta, promovendo o crescimento vegetal pela produção de fitohormônios (citocininas e auxinas), disponibilizando nutrientes, inibindo patógenos e regulando os níveis de etileno (hormônio do estresse) (CHAUHAN et al., 2015; KUMAR et al., 2016; MADHAIYAN et al., 2006a).

Os mecanismos que permitem o estabelecimento da interação entre *Methylobacterium* e a planta hospedeira ainda não são bem compreendidos, mas acredita-se que os exsudatos vegetais desempenham um papel fundamental no processo (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; SÁNCHEZ-CAÑIZARES et al., 2017; SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018). Os exsudatos vegetais, são compostos secretados pela raiz, que correspondem a 20-40% do carbono (BADRI; VIVANCO, 2009; SINGH et al., 2019) e 15% do nitrogênio fixado pela planta (SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018) e desempenham um papel fundamental na estruturação das comunidades microbianas da rizosfera (COMPANT et al., 2019; HAICHAR et al., 2014). Estes exsudatos, podem também estar envolvidos no favorecimento de espécies capazes de trazer algum benefício ecológico e evolutivo para a planta (HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008). No entanto, a espécie favorecida pelos exsudatos deve ser capaz de coexistir com outros micro-organismos e colonizar a planta hospedeira (SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018), sendo necessário portanto, não somente responder ao estímulo da planta, mas também competir com outros micro-organismos.

Estudos anteriores, mostraram que *M. mesophilicum* SR1.6/6 é capaz de colonizar plântulas de soja (*Glycine max*) após o reconhecimento inicial, sendo observadas células individuais após 24 h e produção de biofilme após 72 h (ARAÚJO et al., 2015). Também foi observado que os exsudatos das raízes de plântulas de milho (*Zea mays*) e de *Citrus sinensis* induzem um maior crescimento de *M. mesophilicum* SR1.6/6 (SALGUERO-LONDOÑO, 2015). Os exsudatos de plântulas de soja induzem a expressão de diferentes grupos de genes, incluindo aqueles relacionados com a atividade catalítica, adesão, atividade transportadora e

genes envolvidos em resposta antioxidante nesta linhagem (ARAÚJO et al., 2015), sugerindo que esta resposta possa estar associada à capacidade de colonizar a planta hospedeira.

Contudo, ainda pouco se conhece acerca de como os exsudatos vegetais afetam a interação de *Methylobacterium* com a planta hospedeira, ou selecionado diferentes genótipos microbianos. Por outro lado, as estratégias utilizadas por *Methylobacterium*, em resposta à planta, ainda não foram elucidadas. Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho foi identificar compostos presentes nos exsudatos radiculares associados à especificidade e ao aumento da competitividade de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*, durante a interação com plântulas de milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*), e avaliar a capacidade destas bactérias em competirem sob diferentes condições no ambiente. Visando a ter melhor entendimento da interação de *Methylobacterium* com a planta hospedeira. Para isso, nesse trabalho foi avaliada a sobrevivência em solo e a abundância de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum* na raiz plântulas de soja e milho, bem como a identificação de compostos presentes nos exsudatos vegetais, envolvidos na interação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do gênero *Methylobacterium*

O gênero *Methylobacterium* (PATT; COLE; HANSON, 1976) pertence à classe Alfa-proteobacteria (DONOVAN; MCDONALD; WOOD, 2014) e é constituído por 32 espécies, sendo *M. organophilum* a espécie tipo do gênero (GREEN; ARDLEY, 2018). Em geral, espécies pertencentes a este gênero, apresentam colônias cor de rosa de 1 a 2 mm de diâmetro, células na forma de bastonetes Gram negativos ou Gram variáveis (GREEN; ARDLEY, 2018; KOVALEVA; DEGENER; VAN DER MEI, 2014). O gênero é ubíquo na natureza, podendo ser encontrado em diferentes ambientes, tais como o solo, poeira, ar, sedimentos de lagos e, especialmente em associação com plantas (KWAK et al., 2014; OCHSNER et al., 2014).

As bactérias pertencentes ao gênero *Methylobacterium*, apresentam a capacidade de usar o metanol como fonte de carbono na ausência de biotina como cofator (GREEN; ARDLEY, 2018). O metabolismo deste composto, envolve a participação da enzima periplásmica metanol desidrogenase (MDH), a qual permite a oxidação do metanol em formaldeído (SY et al., 2005; ZHANG; LIDSTROM, 2003). Já no citoplasma o formaldeído pode ser oxidado a CO₂ para a geração de energia, ou ser assimilado em forma de biomassa através da via da serina (SY et al., 2005; ZHANG; LIDSTROM, 2003). A capacidade de utilização do metanol como fonte de carbono, confere ao gênero uma vantagem competitiva frente a outros microrganismos durante a colonização de plantas (DOURADO et al., 2015; SY et al., 2005). Visto que, as plantas liberam esse composto durante o crescimento vegetal como resultado da quebra de pectina (GALBALLY; KIRSTINE, 2002; MACDONALD; SCIENCES, 1993).

A degradação da pectina pelas plantas pode liberar aproximadamente 150 Tg de metanol por ano (KUMAR et al., 2018). Assim, o metabolismo metilotrófico, permite que bactérias deste gênero tenham uma participação ativa no ciclo global do carbono (IGUCHI; YURIMOTO; SAKAI, 2015), participando da redução da quantidade de metanol liberada na atmosfera (KUMAR et al., 2018), visto que ao colonizar ativamente a filosfera, *Methylobacterium* spp. utiliza o metanol como fonte de carbono (KUMAR et al., 2018).

Espécies do gênero *Methylobacterium* podem estabelecer associações com diferentes plantas, tais como soja (*Glycine max*) (SOBRAL, 2003), laranja (*Citrus sinensis*) (ARAÚJO et al., 2002), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L) (MADHAIYAN et al., 2005), eucalipto (*Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla*) (ANDREOTE et al., 2009), entre outras. Durante essa associação *Methylobacterium* pode colonizar a planta, comportando-se como um micro-

organismo endofítico ou epifítico, sendo capaz de promover o crescimento vegetal e/ou interagir com patógenos (ARAÚJO et al., 2002, 2015; DOURADO et al., 2013).

Um dos mecanismos pelos quais *Methylobacterium* promove o crescimento vegetal é por meio da produção de fito-hormônios (Figura 1) (OMER et al., 2004), dentre os quais se destacam as auxinas como o ácido indolacético (AIA) e as citocininas como a zeatina (HOLLAND; POLACCO, 1994; IVANOVA; DORONINA; TROTSSENKO, 2001). O ácido indolacético, desempenha um papel central na divisão celular, bem como no alongamento, desenvolvimento de frutos e senescência (DUCA et al., 2014). Além disso, também estimula a formação de pelos radiculares e aumenta o comprimento das raízes da planta (DUCA et al., 2014). A síntese deste fito-hormônio já foi confirmada para *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6, sendo postuladas três possíveis vias de biossíntese: a) do indole-3-acetonitrilo, b) do indole-3-acetamida e c) da triptamina (BOGAS et al., 2016).

Por outro lado, a zeatina induz a divisão celular e está especialmente envolvida na proliferação do meristema apical da parte aérea (SAM), responsável pela produção de todos os órgãos aéreos da planta (KESHISHIAN; RASHOTTE, 2015). Ademais age como coadjuvante das auxinas na diferenciação celular (KESHISHIAN; RASHOTTE, 2015). Genes fundamentais na sínteses de zeatina, como o *miaA*, foram detectados no genoma de *Methylobacterium oryzae* CBMB20 (KWAK et al., 2014).

Outra forma pela qual *Methylobacterium* promove o crescimento vegetal é por meio da redução dos níveis de etileno, hormônio cuja a alta concentração reflete uma condição de estresse na planta, reduzindo a elongação radicular (Figura 1) (GLICK, 2014). Essa modulação, é possível graças à produção da enzima ACC deaminase por *Methylobacterium*, a qual converte o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor do etileno, em amônia e ácido alfa-cetoglutárico (FEDOROV et al., 2013; MADHAIYAN et al., 2006a). Deste modo, *Methylobacterium* utiliza o ACC liberado como fonte de nitrogênio, reduzindo a síntese do etileno, e promovendo o crescimento da planta (MADHAIYAN et al., 2006a).

Estudos anteriores, demonstraram a atividade enzimática de ACC deaminase em linhagens de *M. oryzae* e *M. fujisawaense* (MADHAIYAN et al., 2006a, 2007), assim como, a presença do gene *acdS* responsável por codificar esta enzima nos genomas de *M. populi* e *M. radiotolerans* (FEDOROV et al., 2013). Adicionalmente, os autores obtiveram proteínas recombinantes desta ACC deaminase que evidenciou a estrutura homotetramérica da enzima, a qual apresenta uma alta especificidade ao ACC (FEDOROV et al., 2013).

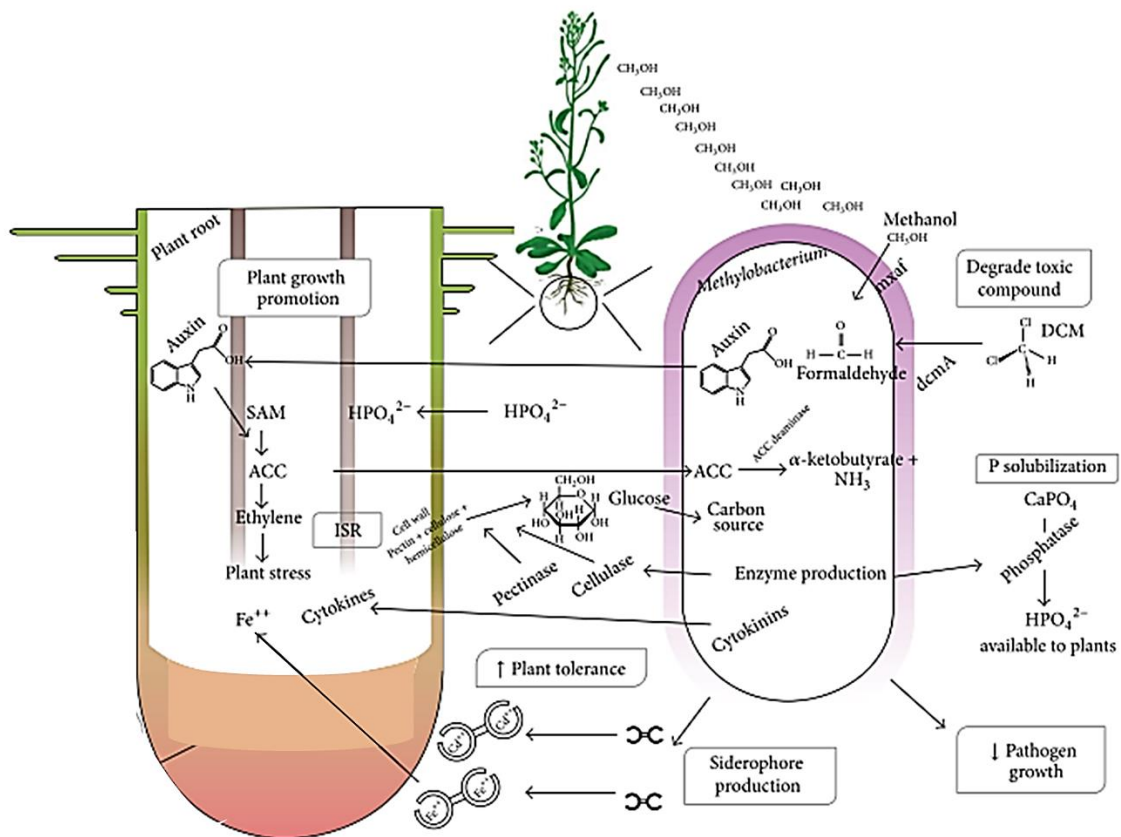
As vias de sínteses de etileno e ácido indole acético estão relacionadas (Figura 1), pois a produção em quantidade elevada de AIA (entre 3 μ M-1mM) pela bactéria, inibe o crescimento

da planta por meio da estimulação da síntese de etileno (PECK; KENDE, 1995). Na biossíntese de etileno, o precursor S-Adenosil-Metionina (SAM) é convertido a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e posteriormente a etileno, pela ação das enzimas ACC sintetase (ACS) e ACC oxidase (ACO), respectivamente (MADHAIYAN; POONGUZHALI; SA, 2007; PECK; KENDE, 1995). Dessa forma, a produção de AIA em elevada concentração pela bactéria estimula a síntese *de novo* da ACC sintetase, provavelmente devido a um aumento na expressão dos genes codificantes para esta enzima ou por regulação pós-transcricional, resultando em um aumento de etileno e na inibição do crescimento da planta (HANSEN; GROSSMANN, 2000). O equilíbrio entre as concentrações de etileno e AIA, é fundamental para a manutenção da colonização de plantas por bactérias endofíticas (HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008), o que poderia possivelmente acontecer com *Methylobacterium* durante a interação com a planta hospedeira.

Diferentes espécies de *Methylobacterium* podem fornecer fósforo à planta, por meio da solubilização de fosfato, produzindo enzimas como fosfatases ácidas não específicas, fitases e C-P liases (AGAFONOVA et al., 2014; KUMAR et al., 2016) ou por meio da produção de ácidos orgânicos que atuam como agentes quelantes dos ânions e convertem formas não disponíveis de fósforo em formas disponíveis (JAYASHREE et al., 2011). Além de fósforo, *Methylobacterium* é capaz de disponibilizar ferro para a planta (DOURADO et al., 2015). Este micronutriente é necessário para a biossíntese de clorofila, reações redox e atividades fisiológicas importantes nas plantas (SAHA et al., 2016). A disponibilização deste elemento ocorre mediante a produção de sideróforos (Figura 1), compostos orgânicos de baixo peso molecular que apresentam alta afinidade com o íon férrico (Fe^{+3}) e permitem a sua internalização e posterior solubilização (RAJKUMAR et al., 2010).

A capacidade de *Methylobacterium* de solubilizar fósforo e produzir sideróforos foi avaliada num estudo, por meio da técnica de WC-MS (*whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis*), a partir da qual, foi observado que de 190 isolados de *Methylobacterium*, 185 foram capazes de solubilizar fosfato na presença de metanol como fonte de carbono e 93 solubilizaram fosfato na presença de glicose (TANI et al., 2012). No entanto, somente 35 isolados produziram sideróforos (TANI et al., 2012). Em outro estudo, Lacava et al. (2008) mostraram que linhagens de *Methylobacterium* isoladas de *Citrus* produzem sideróforos de tipo hidroxamato, mas não do tipo catecol (LACAVA et al., 2008). Estes trabalhos demonstram que *Methylobacterium* spp. pode promover o crescimento vegetal por meio de diferentes estratégias, incluindo a produção de reguladores vegetais e disponibilização de fósforo e ferro para a planta.

Figura 1 - Principais mecanismos pelos quais *Methylobacterium* promove o crescimento vegetal e interage com a planta hospedeira.



Fonte: Modificado de Dourado et al. (2015)

Methylobacterium promove o crescimento vegetal, mediante a solubilização de fósforo e disponibilização de ferro, a produção de hormônios vegetais como: citocininas e auxinas, a modulação de etileno e a indução da ISR (resistência sistêmica).

Por fim, é importante mencionar que *Methylobacterium* pode induzir a resistência sistêmica da planta (ISR), a qual corresponde à ativação dos mecanismos de defesa contra patógenos, como resultado da colonização por micro-organismos benéficos (HARUN-OR-RASHID; CHUNG, 2017; KUMAR; VERMA, 2018). Plantas de arroz e amendoim quando inoculadas com *Methylobacterium*, apresentaram indução da ISR, além disso, foi observado um aumento na produção de enzimas relacionadas à defesa, como, quitinase, fenilalanina amônia liase, β -1,3-glucanase e peroxidase (MADHAIYAN et al., 2004, 2006b). De forma similar, Andanov et al. (2011) observaram que mesmo em inóculo de baixa densidade, *Methylobacterium* induz ISR em plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) contra a bactéria fitopatogênica *Pectobacterium atrosepticum*. Outro estudo, mostrou que *Methylobacterium* induz ISR em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) frente ao patógeno *Ralstonia solanacearum*, neste estudo as plantas tratadas com *Methylobacterium* mostraram um aumento na produção de proteínas relacionadas à patogênese (*pathogenesis-related proteins* - PR-

proteins) associadas com a ISR, como a β -1,3-glucanase e fenilalanina amônia liase, além de menos sintomas e menor produção de etileno nas plantas tratadas (YIM et al., 2013).

2.2 Interação de *Methylobacterium* spp. com plantas hospedeiras

A interação entre *Methylobacterium* spp. e planta hospedeira tem início com a presença do microrganismo no solo ou sobre a planta, seguido do reconhecimento, pela bactéria, de exsudatos vegetais como, carboidratos solúveis, aminoácidos, terpenos, alcaloides, entre outros (ABANDA-NKPWATT et al., 2006). Estes exsudatos, podem contribuir para a seleção de genótipos bacterianos específicos e possivelmente são reconhecidos por *Methylobacterium* spp. induzindo o movimento quimiotático bacteriano até a planta (AFZAL; KHAN; SESSITSCH, 2014; DOURADO et al., 2012a; POONGUZHALI; MADHAIYAN; YIM, 2008).

Após o primeiro contato com a planta, acreditasse que bactérias do gênero *Methylobacterium* comporta-se de forma similar às demais bactérias endofíticas, onde o processo de colonização dos tecidos vegetais segue a sequência: **i.** adesão da bactéria na superfície da raiz (HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008); **ii.** replicação celular e formação de micro-colônias (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010); **iii.** produção de biofilme mediado por *Quorum-sensing* (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010) **iv.** entrada nos tecidos vegetais por locais onde estão emergindo raízes laterais, por lesões ou pela ponta da raiz (BRENCIC; WINANS, 2005; GUSTAVO et al., 2015) e **v.** propagação através do córtex, a endoderme e o xilema, (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010).

A linhagem *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 é capaz de colonizar raiz e caule de vinca (*Catharanthus roseus*) e tabaco (*Nicotiana clevelandii*), sendo mais abundante nos caules (ANDREOTE et al., 2006). Neste estudo, foi observado que a presença de *M. mesophilicum* SR1.6/6 afeta as comunidades microbianas na raiz e no caule de ambas espécies vegetais estudadas, além disso, os autores sugerem que *Methylobacterium* pode controlar patógenos do xilema, incluindo *X. fastidiosa* (ANDREOTE et al., 2006). Em outro trabalho, foi observado que esta linhagem pode estar associada ao controle de *X. fastidiosa in vitro* (LACAVA et al., 2004).

Dourado et al. (2013) observaram que exsudatos de plantas de eucaliptos (*Eucalyptus citriodora*), assim como as N-acyl-homoserine lactones (AHL), podem induzir a expressão do gene *mxoF* (codifica a enzima metanol desidrogenase), em *M. mesophilicum* SR1.6/6, indicando que este gene pode ser regulado em resposta aos exsudatos da planta e por *quorum sensing*. Além disso, os autores mostraram que o etanol (exsudado pela planta) não afetou a

expressão dos genes relacionados a resposta ao estresse *ctrI* (codifica a enzima *phytoene dehydrogenase*) e *acds* (ACC deaminase). Adicionalmente, os exsudatos de eucalipto e arroz, não influenciaram a expressão dos genes relacionados à patogenicidade (*patatin* e *phoU*), dessa forma, os autores sugeriram que *M. mesophilicum* SR1.6/6 poderia colonizar a planta como endófito, sem causar danos ao seu hospedeiro

Em outro estudo, Araújo et al. (2015) observaram que *M. mesophilicum* SR1.6/6 é capaz de colonizar a raiz de plantas de soja (*Glycine max*) e formar biofilme 72 h após o primeiro contato. Por outro lado, este trabalho mostrou que os exsudatos radiculares de soja (*Glycine max*) induzem a expressão de diferentes grupos de genes, incluindo aqueles relacionados com atividade catalítica, adesão, atividade transportadora e resposta antioxidante em *M. mesophilicum* SR1.6/6. Além disso, Salguero-Londoño (2016) mostrou que *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 apresenta maior crescimento na presença de exsudatos de plantas de milho (*Zea mays*) e citros (*Citrus sinensis*), sugerindo que a planta hospedeira poderia induzir um aumento da densidade celular dessa bactéria na rizosfera.

Portanto, acredita-se que o estabelecimento da interação planta hospedeira-*Methylobacterium* requer uma comunicação química coordenada entre a bactéria endofítica e o seu hospedeiro, sendo os exsudatos da planta hospedeira, os possíveis reguladores da especificidade do processo de colonização.

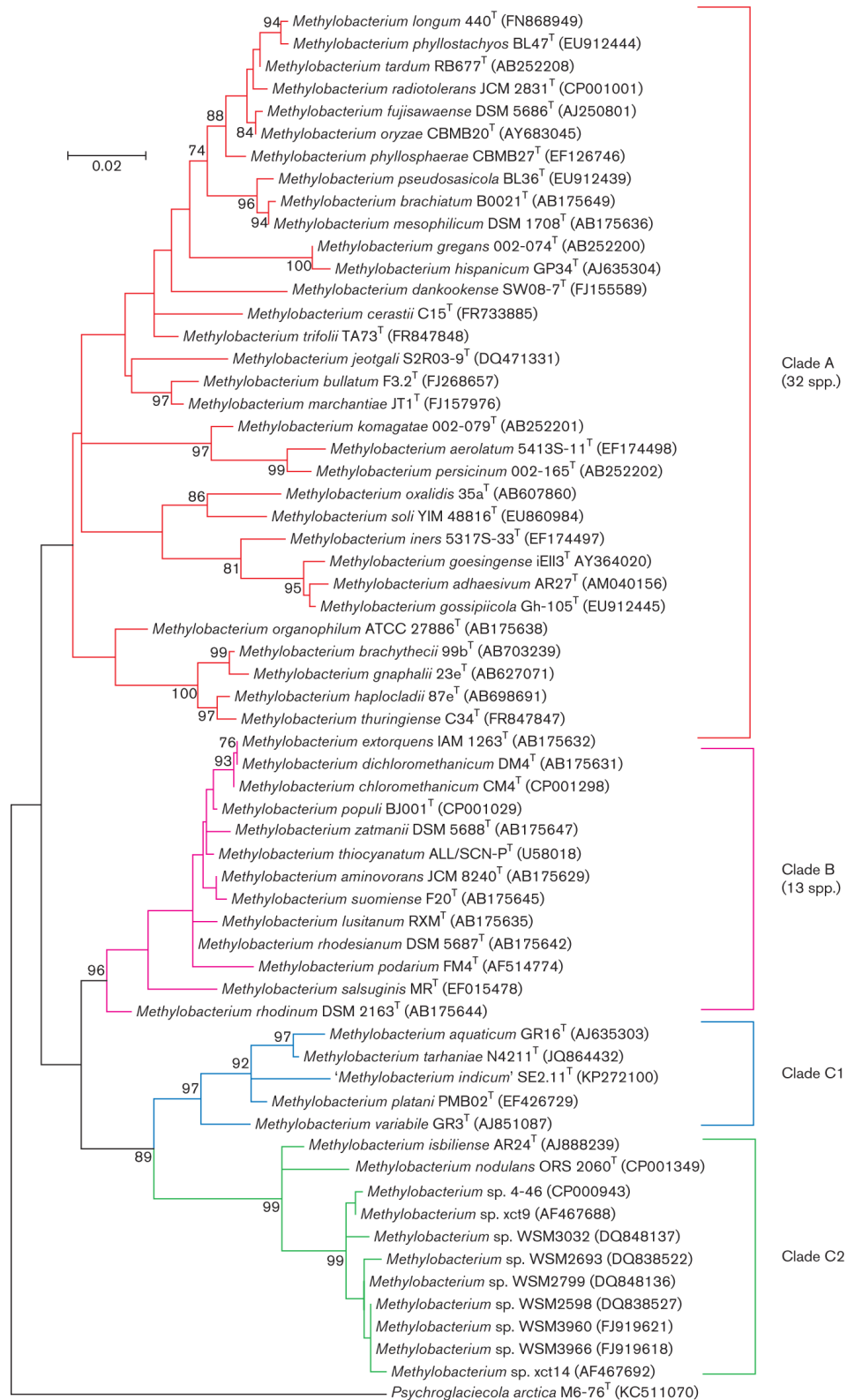
2.3 O gênero *Methylobacterium*

Recentemente, Green e Ardley (2018), fizeram uma reclassificação taxonômica do gênero *Methylobacterium* baseada no gene 16S rRNA de 52 espécies de *Methylobacterium* descritas até então. Os autores propuseram uma divisão em dois gêneros diferentes *Methylobacterium* e *Methylobacterium*. Assim, como está apresentado na Figura 2, as 32 espécies agrupadas no clado A da árvore, continuam sendo classificadas como gênero *Methylobacterium*, sendo *Methylobacterium organophilum* a espécie tipo. No clado B, 11 espécies anteriormente classificadas como *Methylobacterium*, passaram a pertencer a um novo gênero denominado de *Methylobacterium*, sendo *Methylobacterium extorquens* a espécie tipo do gênero. As espécies agrupadas no clado C, foram espécies *incertae sedis* (incapacidade para localizar exatamente um taxón dentro da classificação), dentre as quais se encontra *Methylobacterium nodulas*, reportada em diversos trabalhos devido a sua capacidade de fixar nitrogênio e induzir formação de nódulos em plantas (GREEN; ARDLEY, 2018).

O gênero *Methylobacterium* é constituído por espécies que são capazes de se desenvolverem na presença de metanol, sem a biotina como cofator. Algumas espécies, também apresentam a capacidade de crescer na presença de metilamina como única fonte de carbono, característica que distingue de *Methylobacterium* (GREEN; ARDLEY, 2018). Adicionalmente, algumas espécies de *Methylobacterium* podem usar a betaína, glicerol, etanol, piruvato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato, lactato, malato e acetato como única fonte de carbono (GREEN; ARDLEY, 2018).

Membros do gênero *Methylobacterium*, também podem interagir com espécies vegetais como morango (*Fragaria × ananassa* cv. Elsanta), (ABANDA-NKPWATT et al., 2006), e *Citrus sinensis* (ARAÚJO et al., 2002). Recentemente, foi observado que o gênero *Methylobacterium* foi o mais dominante em caules e folhas no estágio de florescimento (S4-S6) de plantas de soja (*Glycine max*) (SHINTARO HARA, MASATOSHI MATSUDA, 2019).

Figura 2 - Árvore filogenética baseada no 16S rRNA, de linhagens atribuídas ao gênero *Methylobacterium* até o ano 2018.



Fonte: Green e Ardley (2018)

Na árvore filogenética, estão representados os cladogramas A, correspondente ao gênero *Methylobacterium* e o clado B, correspondente ao gênero *Methylorubrum*.

2.4 Exsudatos vegetais como mediadores da interação planta-micro-organismo na rizosfera

A rizosfera foi definida por Hiltner (1904) como a porção de solo que está rodeando as raízes de uma planta e dessa forma, está sendo influenciada pela atividade das mesmas (DAZZO; GANTER; LANSING, 2009; HILTNER 1904). Podem ser encontradas três zonas diferentes, a endorizosfera formada pela endodermis e as camadas corticais dentro da raiz; o rizoplano, que corresponde à superfície da raiz; e a ectorizosfera, referente às partículas de solo que se encontram após a superfície da raiz, mas que são impactadas pelas mesmas (KLOEPPER, 2019; SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018).

A planta interage com os microrganismos da rizosfera de diferentes formas e, portanto, estes micro-organismos estão envolvidos na manutenção do *fitness* vegetal (COMPANT et al., 2019). Essas interações, podem ser positivas, negativas ou neutras (KLOEPPER, 2019). Dentre as interações positivas, encontram-se as associações simbióticas com fungos endomicorrízicos ou ectomicorrízicos, e com bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria-PGPB*) (BAIS et al., 2006). Dentre as interações negativas, destacam-se associações com bactérias e fungos patogênicos (HAICHAR et al., 2014).

O estabelecimento dessas interações é diretamente influenciado pelos exsudatos vegetais uma vez que, por meio deste processo a planta apresenta a capacidade de atrair e estimular o desenvolvimento de micro-organismos benéficos, enquanto simultaneamente pode controlar ou suprimir o desenvolvimento dos patógenos (CANARINI et al., 2019; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Assim, os exsudatos vegetais geram uma maior abundância e atividade de micro-organismos na rizosfera, em relação ao solo, o que é conhecido como efeito rizosfera (*rhizosphere effect*) (BAIS et al., 2006; COMPANT et al., 2019; HAICHAR et al., 2014).

Os exsudatos vegetais são compostos secretados pela raiz, correspondentes aproximadamente a 20-40% de carbono (BADRI; VIVANCO, 2009; SINGH et al., 2019) e 15% de nitrogênio, fixado e absorvido pela planta, respectivamente (SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018). Geralmente, os exsudatos vegetais são classificados como compostos de baixo e alto peso molecular (SINGH et al., 2019). Dentre os compostos de baixo peso molecular, estão agrupados aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e compostos fenólicos, enquanto, nos de alto peso molecular se agrupam a mucilagem (polissacarídeos) e as proteínas (BAIS et al., 2006; HAICHAR et al., 2014; KLOEPPER, 2019; SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018). Características como composição, quantidade e qualidade dos exsudatos

vegetais são influenciadas pela espécie vegetal, variedade, genótipo e pelo estágio de desenvolvimento vegetal, além de fatores ambientais e tipo de solo (HERTENBERGER; ZAMPACH; BACHMANN, 2002; HUANG et al., 2014).

Os exsudatos vegetais fazem parte do processo de rizodeposição, que corresponde, à liberação de carbono da raiz ao solo circundante (JONES; NGUYEN; FINLAY, 2009). A liberação destes, ocorre principalmente pela região apical da raiz, que é a primeira a entrar em contato com o solo (CANARINI et al., 2019). A rizodeposição também pode ocorrer pelas células da borda, que são células metabolicamente ativas e programadas para se separar da caliptra (região apical da raiz) (BADRI; VIVANCO, 2009).

As células da borda não só produzem a mucilagem, mas também proteínas e metabólitos de baixo peso molecular que podem servir como fonte de carbono para os micro-organismos da rizosfera ou como moléculas sinalizadoras (SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018). Também, podem exercer outras funções como, atrair zoósporos, controlar o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, controlar o crescimento e a expressão gênica de bactérias endofíticas, bem como proteger a planta reduzindo a toxicidade causada por metais pesados (HAWES et al., 2000).

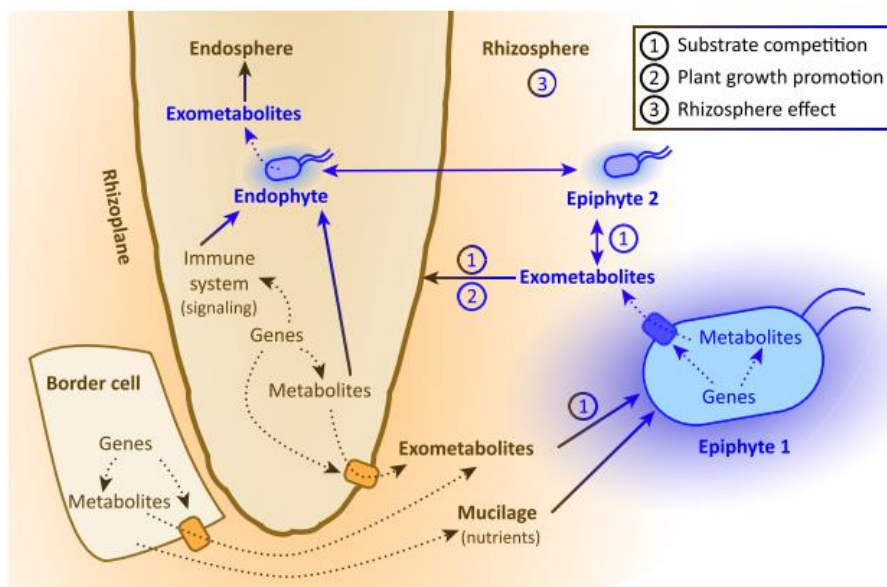
Os mecanismos pelos quais a raiz secreta os exsudatos na rizosfera ainda não são muito bem compreendidos, mas acredita-se que o transporte passivo e ativo sejam os principais mecanismos envolvidos (HUANG et al., 2014). Exsudatos secretados por transporte passivo, podem seguir duas vias. A primeira é a de difusão, a partir da qual, moléculas polares, de pequena massa molecular não carregadas, são transportadas naturalmente por meio da permeabilidade das membranas lipídicas, e então são levadas pelo gradiente de concentração entre as células da raiz e a rizosfera (BADRI; VIVANCO, 2009; SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018). A segunda via, ocorre com moléculas de massa um pouco maior, como os açúcares, que são secretados com ajuda de proteínas com domínio transmembrana, que atuam como canais de transporte (HUANG et al., 2014). Dentre os transportadores caracterizados encontram-se os *SWEET transporters*, que permitem o transporte de açúcares como a sacarose e os *UMAMIT transporters*, que permitem o transporte de aminoácidos (CANARINI et al., 2019).

No mecanismo de transporte ativo, ocorre a secreção de exsudatos de maior massa molecular como, polissacarídeos, proteínas e metabólitos secundários (HUANG et al., 2014). Neste processo, o transporte de exsudatos ocorrer por meio de proteínas de membrana pertencentes à família ABC (*ATP-Binding Cassette*) e MATE (*Multidrug And Toxic Compound Extrusion*) (HUANG et al., 2014; VIVES-PERIS et al., 2019). Além disso, a secreção de

moléculas de alta massa molecular, pode ser realizada por meio de vesículas, dentro das quais são armazenados este tipo de compostos, para sua posterior secreção na rizosfera (BADRI; VIVANCO, 2009; VIVES-PERIS et al., 2019).

Uma vez secretados na rizosfera, tanto pela região apical como por células de borde, os exsudatos podem servir como substrato para o desenvolvimento de microrganismos (DOORNBOS; LOON, 2012). Alguns dos compostos, também podem atuar como moléculas sinalizadoras induzindo o movimento quimiotático de micro-organismos (BAIS et al., 2006) em direção a raiz, gerando o efeito rizosfera (SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018). Os micro-organismos também secretam moléculas sinalizadoras, possibilitando um diálogo químico com a planta (*cross-talking*) (BADRI et al., 2009) o qual, vai determinar se a interação a ser estabelecida será do tipo positiva, negativa ou neutra (BAIS et al., 2006). Em uma interação positiva, os micro-organismos são atraídos pela planta até o rizoplane e em seguida, podem colonizá-la endofiticamente ou epifiticamente (SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018). Na rizosfera, pode ser observada a competição por substrato entre micro-organismos, atraídos pelos exsudatos (Figura 3).

Figura 3 - Principais interações mediadas pelos exsudatos na rizosfera da planta.



Fonte: SASSE; MARTINOIA e NORTHEN (2018).

Observa-se como a parte apical da raiz da planta, assim como, as células da borda liberam na rizosfera os exsudatos (*exometabolites*), os quais são captados pelos microrganismos presentes no solo que usam esses exsudatos como substrato. Os exsudatos também são reconhecidos pelos microrganismos como moléculas sinalizadoras, o que induz seu movimento quimiotático até a raiz da planta, gerando o efeito rizosfera.

2.5 Importância dos exsudatos vegetais na interação planta-micro-organismo

É importante destacar que a influência dos exsudatos vegetais na composição e estrutura das comunidades microbianas da rizosfera, foi evidenciada num estudo, no qual, a partir de soluções artificiais demonstraram como os exsudatos com maior diversidade de fontes de carbono e nitrogênio aumentam a biomassa microbiana do solo em relação a exsudatos com menor diversidade de fontes (STEINAUER; CHATZINOTAS; EISENHAUER, 2016). Além de exercer influências na abundância e composição das comunidades microbianas, os exsudatos vegetais podem também exercer um papel na determinação da especificidade da interação planta-micro-organismo, já que, plantas leguminosas em condições de limitação de nitrogênio secretam flavonoides, responsáveis pela atração de bactérias fixadoras, como *Rhizobium* spp. e pela indução da expressão dos genes *nod* na bactéria (BROUGHTON et al., 2003; PERRET; STAEHELIN, 2000). Como resultado, a bactéria sintetiza fatores *Nod* (lipocito-oligosacarídeos), os quais são reconhecidos pela planta, permitindo o estabelecimento da interação e a formação de nódulos (BROUGHTON et al., 2003; PERRET; STAEHELIN, 2000).

Os exsudatos estão envolvidos na indução da quimiotaxia de bactérias benéficas para a planta, como pode ser verificado em um estudo recente que avaliou a resposta quimiotáctica de *Pseudomonas* sp. RP2, uma linhagem promotora do crescimento de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), na presença de seis exsudatos diferentes (ácido salicílico, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido benzoico, ácido tartárico e ácido esteárico). Este estudo demonstrou que a linhagem apresenta maior quimiotaxia e crescimento na presença do ácido esteárico e do ácido palmítico, sendo sugerido que estes compostos facilitam a colonização das raízes de amendoim por *Pseudomonas* sp. RP2 (ANKATI; RANI; PODILE, 2019).

Outro exemplo da influência dos exsudatos na quimiotaxia, foi demonstrado num estúdio no qual raízes de plantas de *Arabidopsis thaliana* na presença do patógeno *Pseudomonas syringae* pv tomato (Pst DC3000) secretam ácido L-málico (RUDRAPPA et al., 2008). Este exsudato atua como molécula sinalizadora para atrair a bactéria *Bacillus subtilis* FB17, que induz resistência sistêmica (*Induced Systemic Resistance-ISR*) e atua como promotora do crescimento vegetal (RUDRAPPA et al., 2008). Este estudo, mostra como a planta pode regular a produção de exsudatos na presença de patógenos, para atrair micro-organismos que ajudam no controle de doenças.

Recentemente, Zalinha et al. (2018) mostraram como a utilização de determinados compostos presentes nos exsudatos vegetais de um tipo de aveia (*Avena barbata*), por bactérias

presentes na rizosfera, pode conferir uma vantagem na colonização deste ambiente. Além disso, foi observado que as bactérias presentes no solo onde *Avena barbata* cresce, podem ter uma resposta positiva ou negativa à presença dos exsudatos da planta. Sendo que, as bactérias que respondem positivamente, consomem principalmente ácidos orgânicos e aminoácidos.

Assim, estes estudos mostram como as interações planta-micro-organismos são complexas, onde os exsudatos desempenham um papel relevante na conformação da microbiota da rizosfera, bem como no início da comunicação entre as raízes e os micro-organismos presentes no solo, para posteriormente permitir o estabelecimento da interação com a planta.

2.6 Outras funções dos exsudatos vegetais

Na rizosfera a planta não interage somente com micro-organismos, mas também com nematoides, protozoários, pequenos invertebrados e raízes de outras plantas (MHLONGO et al., 2018). Dessa forma, os exsudatos vegetais também estão envolvidos na competição contra outras espécies de plantas, na proteção contra nematoides e insetos, bem como na inibição de fungos e bactérias patogênicas (BAETZ; MARTINOIA, 2014).

A alelopatia é um mecanismo de defesa da planta, por meio da produção de metabólitos que impede o crescimento de outras plantas, favorecendo a competição com outras espécies vegetais (KONG et al., 2019). Este mecanismo de defesa é mediado pela secreção de metabólitos secundários chamados aleloquímicos, dentre os que se encontram flavonoides, terpenos, alcaloides, entre outros (KONG et al., 2019; LATIF; CHIAPUSIO; WESTON, 2017). Os aleloquímicos podem afetar negativamente outras plantas, induzindo mudanças na estrutura celular, inibindo a divisão celular, desestabilizando o sistema antioxidante, afetando o processo de fotossíntese, entre outras coisas (VIVES-PERIS et al., 2019).

Como proteção contra fitopatógenos e insetos, a planta produz fitoanticipinas, moléculas de baixo peso molecular, que são produzidas por plantas saudáveis que não passaram por condições de estresse biótico (BAETZ; MARTINOIA, 2014). Por outro lado, como resposta ao estresse biótico ou abiótico a planta secreta compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, as fitoalexinas (JEANDET, 2015). Dessa forma, pode ser observado que os exsudatos radiculares desempenham função chave para o estabelecimento da planta no seu ambiente, permitindo o estabelecimento de diferentes tipos de interações com outros organismos, incluindo fungos e bactérias do solo.

3 OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos exsudatos radiculares de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) no estabelecimento da interação com *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*.

3.1 Objetivos específicos

- Selecionar quatro linhagens de *Methylobacterium* spp. e ou *Methylobacterium extorquens*, com base em parâmetros fisiológicos: taxa de crescimento, sobrevivência no solo esterilizado, promoção de crescimento radicular de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*);
- Identificar compostos presentes nos exsudatos radiculares de plântulas de milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*);
- Determinar a abundância de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* nas raízes de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), por meio de qPCR;
- Avaliar a ocorrência de competição entre os isolados de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* em resposta aos exsudatos radiculares;
- Avaliar a influência dos exsudatos vegetais na formação de biofilme por *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* *in vitro*.

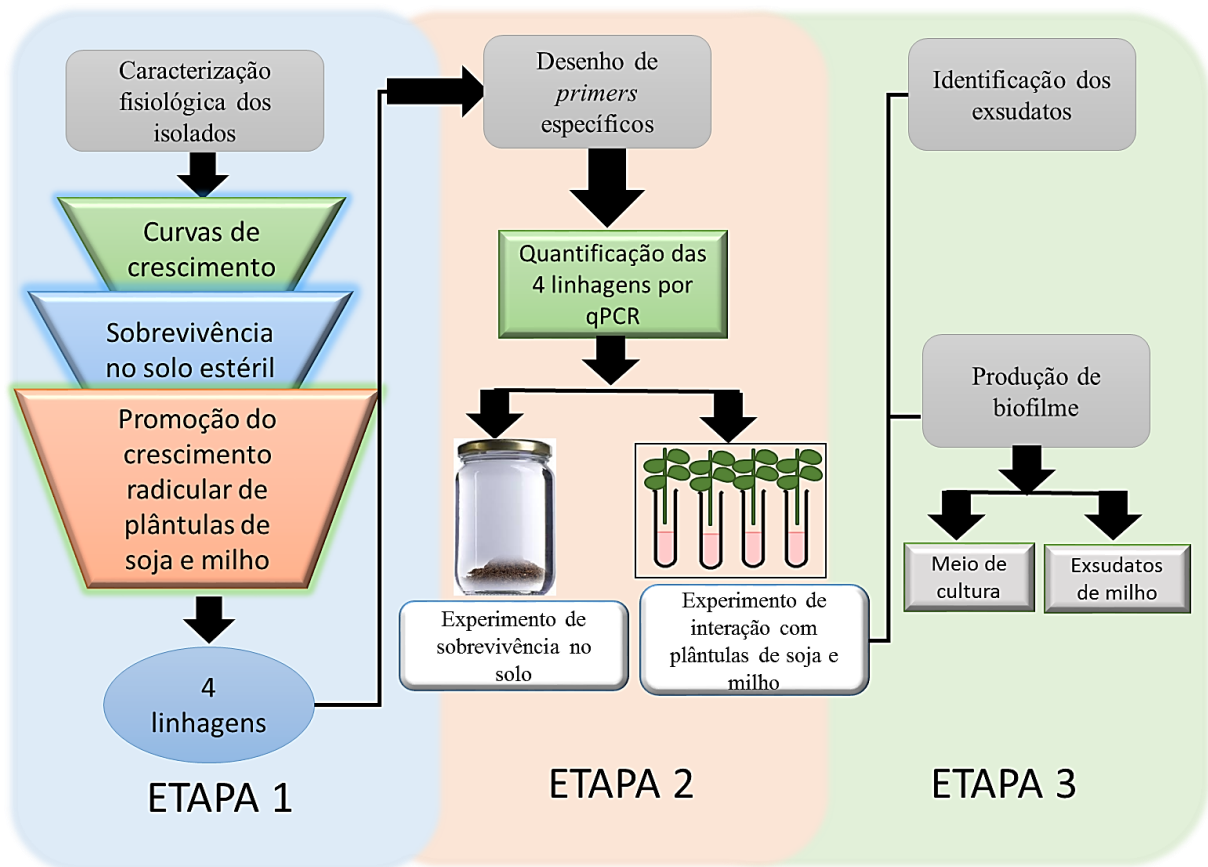
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Como apresentado na Figura 4., o presente estudo é constituído por três etapas principais. Na primeira, 10 linhagens de *Methylobacterium* spp. e 2 linhagens de *Methylobacterium extorquens*, pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana (LABMEM) do Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo, foram avaliadas por meio da análise de: (i) curvas de crescimento bacteriano; (ii) avaliação de sobrevivência no solo esterilizado; (iii) ensaio de promoção do crescimento radicular de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*). De acordo com os resultados obtidos a partir desses testes de caracterização fisiológica, foram selecionadas quatro linhagens, as quais foram objeto de estudo na segunda e terceira etapas do trabalho.

Na segunda etapa, foram desenhados *primers* para as quatro linhagens selecionadas. Os *primers*, permitiram a detecção e quantificação de cada uma das linhagens, nos experimentos desenvolvidos para avaliação da sobrevivência no solo e de interação com plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), quando inoculadas individualmente ou em consórcio bacteriano.

Finalmente, na terceira etapa do trabalho, os exsudatos vegetais e bacterianos, produzidos durante os experimentos de interação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* com plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), foram identificados, e o seu efeito sobre a formação de biofilme bacteriano avaliado.

Figura 4 - Organização geral do presente estudo



Fonte: este trabalho

A primeira etapa do trabalho está destacada com retângulo azul, em cor-de-rosa a segunda etapa e na cor verde a terceira etapa.

4.1 Linhagens e condições de cultura

Na primeira etapa do trabalho, foram utilizadas 10 linhagens de *Methylobacterium* spp. e duas linhagens de *Methylorubrum extorquens* (anteriormente *Methylobacterium extorquens*) pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana (LABMEM) do Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo, as quais foram isoladas de diferentes hospedeiros (Tabela 1).

As linhagens de *Methylobacterium* e *Methylorubrum*, foram reativadas a partir de tubos de criopreservação, em placas de Petri contendo meio de cultivo SPW-Perwinkle Wilt modificado (peptona de soja 4 g.L⁻¹; triptona de soja 1 g.L⁻¹; extrato de malte 5 g.L⁻¹; sacarose 10 g.L⁻¹; K₂HPO₄ 1,2 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 1 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,4 g.L⁻¹; glutamina 0,4 g.L⁻¹; histidina 0,2 g.L⁻¹; ágar bacteriológico 15 g.L⁻¹; pH 6,6), por esgotamento (ARAÚJO et al., 2015). As culturas, foram incubadas por 3-5 dias a 28°C, até a obtenção de colônias isoladas definidas e da coloração característica do gênero. A partir das colônias isoladas, apresentando

a coloração característica do gênero (cor de rosa), as linhagens bacterianas eram crescidas em meio SPW, a 28 °C e 180 rpm, durante 72 h.

Tabela 1- Linhagens de estudo e respectivos hospedeiros.

Linhagem de estudo	Hospedeiro	Referência
<i>Methylobacterium extorquens</i> AR 1.6/2 *	Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Araújo et al. (2002)
<i>Methylobacterium extorquens</i> AR1.6/8*	Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Araújo et al. (2002)
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> F4	Cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.)	Barros Rossetto (2008)
<i>Methylobacterium oryzae</i> F7	Cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.)	Barros Rossetto (2008)
<i>Methylobacterium oryzae</i> F8	Cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.)	Barros Rossetto (2008)
<i>Methylobacterium hispanicum</i> MP2-3	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i>)	Dourado et al. (2012b)
<i>Methylobacterium oryzae</i> R12E	Eucalipto (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	Ferreira et al. (2008)
<i>Methylobacterium mesophilicum</i> R14E	Eucalipto (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	Ferreira et al. (2008)
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> R16E	Eucalipto (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)	Ferreira et al. (2008)
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> SR 1.6/4	Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Araújo et al. (2002)
<i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR 1.6/6	Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Araújo et al. (2002)
<i>Methylobacterium oryzae</i> TC3-10	Café (<i>Coffea arabica</i>)	Dourado et al. (2012b)

Fonte: (DOURADO et al., 2012b).

[*] Espécie realocada no gênero *Methylobacterium* por Green e Ardley (2018). (mudaram do gênero *Methylobacterium* para *Methylobacterium*).

4.2 Material vegetal

Para a realização de testes de interação entre *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* e planta hospedeira, foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max*) da variedade IAC-100 e milho (*Zea mays*) da variedade SUWAN-SRR, que foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP (Piracicaba, SP).

As sementes foram superficialmente desinfetadas por imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguida de uma imersão em hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto, etanol 70% novamente por 1 minuto e duas imersões em água destilada esterilizada por 5 minutos. Para retirar o excesso de água, as sementes foram dispostas sobre papel filtro estéril (ARAÚJO et al., 2015). Após secagem, as sementes foram utilizadas posteriormente para os experimentos de interação.

4.3 Curvas de crescimento de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*

As curvas de crescimento de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* foram realizadas em tubos de ensaio (10 cm x 1,5 cm). Para isso, um pré-inóculo bacteriano foi preparado nas condições descritas no item 4.1. A partir deste, um inóculo de 2 mL com a densidade óptica ($D.O_{600nm}$) ajustada para 0,05 (10^6 UFC.mL⁻¹ aproximadamente) (HALL et al., 2014) foi preparado para cada uma das linhagens em quatro repetições, totalizando 32 tubos de ensaio para cada uma das linhagens avaliadas, os tubos foram incubados a 28°C sob agitação constante (180 rpm). O crescimento bacteriano foi avaliado durante 5 dias, sendo realizadas leituras a cada 12 horas durante as primeiras 48 horas, e posteriormente, a cada 24 horas.

Cada um dos tubos de ensaio com cultivo bacteriano foi suplementado com a enzima celulase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 0,1 mg.mL⁻¹ (modificado de BRADLEY et al., 2017), para reduzir a floculação (agregados celulares) e melhorar as leituras.

Em cada tempo de leitura (0 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h e 96 h e 120 h), quatro tubos de cada uma das linhagens (correspondentes às réplicas biológicas) foram retirados para a avaliação de sua absorvância, obtendo-se o valor da leitura da densidade óptica ($D.O_{600nm}$). Antes da leitura da densidade óptica, os tubos foram centrifugados a 16.000xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de biomassa foi ressuscitado em 150 µL de meio SPW líquido. O volume da suspensão, foi colocado em placa de 96 poços de fundo plano Jet Biofil (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd, China) e a leitura da densidade óptica ($\lambda=600nm$) foi realizada em espectrofotômetro Epoch 2 – Bio tek (Bio tek Instruments, Inc, Vermont, New England).

4.4 Sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* em solo esterilizado

Foi preparado um substrato com uma mistura de solo vegetal (Orient Garden Comercio e Distribuição de Insumos Agrícolas LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e cascalho de areia Aqua pedras (Leonice da Silva Jovenato Aquarios, Riberão Preto, SP, Brasil) na proporção 4:1 (4g de solo vegetal por 1 g de cascalho de areia), este procedimento melhora a homogeneização das amostras de bactérias ao solo. Foram pesados 200 g de substrato, e estes foram colocados em um recipiente de vidro com tampa de rosca para cada uma das linhagens bacterianas avaliadas. As análises físico-químicas do solo, estão apresentados no Anexo A. Os recipientes de vidro contendo substrato foram submetidos a três ciclos de esterilização (com intervalos de 24h entre

cada ciclo) em autoclave a 121°C por 20 minutos para garantir a eliminação de esporos de micro-organismos (MERCIER et al., 2015).

Foi preparada uma suspensão bacteriana de 20 mL ajustada a uma densidade óptica (D.O._{600nm}) de 0,5 (aproximadamente 10^7 UFC.mL⁻¹) em água destilada, para cada uma das linhagens. Cada um dos frascos contendo 200 g de substrato foi inoculado com a respectiva suspensão da linhagem bacteriana a ser avaliada, e então 50 g do substrato inoculado foram distribuídos em frascos de vidro com tampa de rosca (10 cm x 5 cm), totalizando 4 frascos (correspondentes às quatro réplicas biológicas) por linhagem. O solo foi incubado por até 90 dias a 28°C.

A avaliação da sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *M. extorquens* em solo esterilizado foi realizada nos tempos 0 (controle inicial), 15, 30 e 90 dias após inoculação. Cada amostragem foi realizada coletando 1g de solo de cada réplica, que foi ressuspenso em 9 mL de tampão PBS-*Phosphate-buffered saline* (8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,44 g de Na₂HPO₄; 0,24 g de KH₂PO₄; completar com 1 litro de água destilada, pH 7,4). Diluições apropriadas desta suspensão foram realizadas e 25 µL foram semeados por *drop plate* em triplicatas, em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultivo HYPHO suplementado com metanol 0.5% v/v (14,5mM de K₂HPO₄; 18,8mM de NaH₂PO₄; 3,8 mM de (NH₄)₂SO₄; 0,8mM de MgSO₄; 1mL de elementos traços L⁻¹). As culturas foram incubadas a 28°C por 4 dias. Após o crescimento, a taxa de sobrevivência de cada uma das linhagens bacterianas foi determinada por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001).

4.5 Promoção do crescimento radicular de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), por *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*

Foi realizado um teste para avaliar o efeito de *Methylobacterium* spp. e *M. extorquens* no comprimento da raiz de plântulas após germinação. Para isso, sementes de soja (*Glycine max*) e de milho (*Zea mays*), previamente desinfetadas (item 4.2), foram inoculadas com as linhagens bacterianas a ser avaliadas (Tabela 1).

Foram utilizadas 25 sementes para cada planta (soja e milho) para cada um dos tratamentos (bactérias). A inoculação foi realizada em tubos cônicos de plástico (Falcon) de 50 mL contendo as 25 sementes e 25 mL de uma suspensão bacteriana ajustada para uma D.O._{600nm}=1,0 em meio SPW (10^8 UFC.mL⁻¹ aproximadamente) e mantidas a 28°C por 1 hora sob agitação (180rpm). Após este período, as sementes foram removidas da suspensão

bacteriana, o excesso da cultura foi retirado com papel filtro esterilizado e as semente foram transferidas em folhas de papel *germitest* de 28 x 38 cm (J.Prolab, São Jose dos Pinhais, Paraná, PR, Brasil) previamente umedecido com água destilada. Sobre as sementes inoculadas, foi colocada uma segunda folha de papel *germitest* uniformemente umedecida. As folhas foram enroladas, formando rolos e mantidas em béquer plástico coberto com sacolas transparentes com pequenos orifícios, para manter a umidade e permitir a ventilação. As sementes foram mantidas a 28°C em câmara de germinação por 7 dias para soja (modificado de Cassán et al., 2009) e 3 dias para milho.

Após o período de incubação, o comprimento das raízes das plântulas de soja e milho foi mensurado por meio do programa Image J (SCHNEIDER; RASBAND; ELICERI, 2012) NIH (National Institutes of Health) (CASSÁN et al., 2009). O controle negativo foi obtido por meio do tratamento das sementes (milho e soja) apenas com meio SPW, nas condições descritas anteriormente. Para a análise estatística, foram coletados dados de três experimentos independentes.

4.6 Desenho de *primers* para a detecção e quantificação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*

O desenho de *primers* específicos para as linhagens AR1.6/2, MP2-3 e R16E, foi realizado a partir das sequências dos genes *rpoB*, *trpA*, e a região intergênica dos genes 16S rRNA e 23S rRNA, respectivamente. Para a linhagem SR1.6/6, o desenho de *primers* foi realizado a partir da sequência de uma proteína hipotética. As sequências foram obtidas diretamente do genoma dos isolados de interesse (genomas ainda não publicados) e foram alinhadas no programa Geneious 7.0.6. Os *primers* foram desenhados manualmente baseados nos alinhamentos das sequências citadas acima, por identificação de regiões específicas das linhagens de interesse (Apêndice A). Foram considerados os seguintes parâmetros no desenho dos *primers*: tamanho entre 20-25 pb, concentração de CG entre 50-70%, tamanho do produto de amplificação entre 150-220 pb e diferença na T_m (*melting temperature*) do par de *primers* não superior a 5°C (Tabela 2.). A existência de dímeros dos *primers* (*hairpin*, *selfdimers* e *heterodimers*) foi analisada no programa OligoAnalyzer Tool 3.1 (disponível em: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Outros parâmetros, como a temperatura de *melting* (T_m), tamanho do produto de amplificação e a especificidade de anelamento na sequência alvo, foram determinados no Primer-Blast do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

A validação dos *primers* e a otimização da temperatura de anelamento foi realizada, utilizando-se o DNA genômico dos 10 isolados de *Methylobacterium* spp. e das duas linhagens de *Methylorubrum extorquens* (Tabela 1). A extração de DNA genômico foi realizada com o Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, EUA). No caso dos pares de *primers* SR1.6/6-F/SR1.6/6-R e MF5-R16-F/MF5-R16-R, foram preparadas reações de 25µL contendo: DNA genômico [50 ng/µL], 1X de *Easy®Taq* Buffer, 0,2mM de dNTPs, 0,2 µM de cada *primer* e 2,5U de *Easy®Taq* DNA polimerase (TransGen Biotech Co, Ltd, Pequim, China). Já para os pares de *primers* MEX1-F /MEX1-R e MHP1-F/MHP1-R, foram preparadas reações de 25µL contendo: DNA genômico [50ng/ µL], 1X de *GoTaq® Reaction Buffer*, 0,2mM de dNTPs, 0,5 µM de cada *primer* e 1,25 U de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega, Madison, WI, EUA).

As reações de PCR foram realizadas seguindo as condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 30 segundos da respectiva temperatura de anelamento de cada um dos pares de *primers* avaliados (Tabela 2.); 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72° C em termociclador (VERITI 96-WELL THERMAL CYCLER, 0.2ML, Applied Biosystems).

Os produtos de PCR foram analisados em gel de Agarose (1% m/v) corados com “SYBR® Safe DNA Gel Stain” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), junto com o marcador de peso molecular 1 Kb plus-Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a 3 volts.cm⁻¹. Após a eletroforese, o gel foi foto-documentado sobre luz UV.

Como controle positivo, o DNA genômico de cada isolado foi utilizado para a amplificação do gene 16S rRNA. Para isso, foram preparadas reações de 25µL contendo: DNA genômico extraído de cada linhagem [50ng/ µL], 1X de *GoTaq® Reaction Buffer*, 0,2mM de dNTPs, 0,5 µM do *primer forward* 27F (5' – AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3'), 0,5 µM do *primer reverse* 1378R (5'- CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG – 3') e 1,25 U de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega, Madison, WI, EUA), para amplificar o gene 16S rRNA. A amplificação do gene foi tomada como ausência de inibidores (Apêndice B).

Tabela 2 - *Primers* desenhados para a detecção de linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*

Nome do <i>primer</i>	Linhagem detectada	Gene alvo	Sequência 5'→3'	Tamanho do <i>primer</i> (pb)	% GC	Tm calculado	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
MEX1-F	AR1.6/2	<i>rpoB</i>	TTCGATGTGGACCCGGACACG	21	61,9	64,68	70°C	213
MEX1-R			AGCGAACAGCAGCTTGCCGGAC	22	63,6	63,64		
MHP1-F	MP2-3	<i>trpA</i>	AGACCTCCCTGAAGGTGCTGG	21	61,9	63,54	65°C	208
MHP2-R			ATCAGGATCACGGGCGTGTC	20	60	62,30		
SR1.6/6-F	SR1.6/6	Proteína hipotética	AACTCAAGCTATCCGGCCTG	20	55	59,82	67°C	208
SR1.6/6-R			TCGACGAAGCCCAGGAATTC	20	55	60,11		
MF5-R16-F	R16E	Região intergenica do 16S e 23S	CGGGCGATTGACAGCCGATTTC	22	59,1	64,62	70°C	169
MF6-R16-R			CGGCGCCTGTTTACACAAGTG	21	57,1	62,63		

Na tabela, as sequências dos pares de *primers* estão representadas, bem como o gene alvo, o conteúdo GC (%), a Tm calculada de acordo com o programa *PrimerBlast* e a temperatura de anelamento de cada par de *primers* para as reações de PCR.

4.7 Ensaio de *primers* específicos para linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* por PCR em tempo real

Com a finalidade de determinar se os *primers* desenhados e validados por PCR convencional, amplificavam os produtos desejados na técnica de qPCR, foi feita a extração de DNA genômico das linhagens AR.1.6/2, R16E, MP2-3 e SR1.6/6 com o Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, EUA). Adicionalmente, foi preparado um consórcio bacteriano com 4 mL de uma solução bacteriana contendo 1 mL da cultura crescida de cada linhagem (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3), assim, a suspensão do consórcio foi centrifugada e o seu *pellet* foi utilizado para a extração de DNA.

As reações de qPCR com volume final de 20 µL foram conduzidas contendo: 10 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Live Technologies LTD, Kingsland Grange, Warrington, UK); 1 µL de DNA genômico [50 ng/µL]; 0,4 µL de cada *primer* [200 nM]. Todas as reações foram feitas em duplicatas no equipamento StepOne Plus da Applied Biosystems, de acordo com a programação para teste de quantificação comparativo ($\Delta\Delta C_T$). As reações foram realizadas nas seguintes condições: *hold* inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, a temperatura de anelamento específica de cada par de *primers* por 30 segundos e uma extensão final de 72°C a 30 segundos. A detecção da fluorescência foi realizada na etapa de extensão.

4.8 Sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* no solo.

4.8.1 Inoculação do solo não esterilizado e recuperação do DNA

A fim de avaliar a sobrevivência das linhagens AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3 no solo não esterilizado, foram preparados 150g de substrato conforme descrito no item 4.4, sem os ciclos de esterilização por autoclavagem, para cada uma das linhagens a ser avaliadas. As análises físico-químicas do solo estão apresentadas no Anexo A.

O substrato (150 g), foi inoculado com 15 mL de uma suspensão bacteriana ($D.O_{600nm} = 0,5$) em água destilada esterilizada com cada uma das linhagens isoladamente ou em mistura (consórcio bacteriano). A suspensão do consórcio, foi preparada com 3,75 mL de cada bactéria (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3) ajustada a $D.O_{600nm} = 0,5$ (aproximadamente 10^7 UFC.mL⁻¹). A suspensão bacteriana, foi homogeneizada nos 150 g do substrato, e posteriormente foram distribuídos em frascos de vidro, totalizando 3 frascos (correspondentes a três réplicas

biológicas) por linhagem. O tratamento controle, foi realizado com três frascos de solo, tratados com água destilada estéril. Após inóculo, o solo foi incubado por 90 dias a 28°C.

A sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *M. extorquens* no solo foi realizada por meio da quantificação de cada linhagem bacteriana por meio de qPCR, utilizando *primers* específicos (item 4.6). A quantificação foi realizada nos tempos 0 (controle inicial), 15, 30 e 90 dias após inoculação. Foram utilizadas 3 réplicas por tempo de análise. Cada amostragem foi realizada coletando 0,25 g de solo de cada réplica, a partir dos quais foi feita a extração de DNA, com o kit DNeasy®Powersoil da QUIAGEN (Dutch holding QUIAGEN N.V, Hilden, Alemanha). A integridade do DNA foi avaliada em gel de Agarose (1% m/v) e corado com “SYBR® Safe DNA Gel Stain” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria em Biodrop DUO, para utilização posterior nas reações de qPCR.

4.8.2 Quantificação de Methylobacterium spp. e Methylobacterium extorquens no solo por PCR em tempo real

4.8.2.1 Curvas padrão

Foram geradas curvas-padrão para a quantificação das linhagens AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3 no solo não esterilizado (Apêndice C). A construção das curvas foi feita a partir de diluições seriadas 1:10 do DNA genômico isolado de cada bactéria (HÖPPENER-OGAWA et al., 2007; SANTHANAM et al., 2017). Assim, a plotagem do Ct (*threshold cycle*) frente ao número de moléculas de DNA presentes em cada diluição, permitiu obter a curva, junto à sua regressão linear. Parâmetros como: eficiência entre 90% -110% e um R^2 : > 0,9, foram aceitáveis para a utilização das curvas.

Com base no tamanho do genoma (**AR1.6/2**: 5246455 pb; **R16E**: 6597385 pb; **MP2-3**: 5048570 pb e **SR1.6/6**: 6629020 pb), bem como, da concentração de DNA isolado de cada linhagem bacteriana (previamente calculada por espectrofotometria em Biodrop DUO), foi determinado o número de moléculas de DNA presentes em cada uma das diluições, com auxílio da seguinte equação:

Equação 1 - Fórmula utilizada para a elaboração das curvas padrão.

$$\text{Número de cópias(moléculas)} = \frac{\frac{Xng}{\mu L} * 6,0221 \times 10^{23} \frac{\text{moléculas}}{\text{mol}}}{\left(N \times \frac{660g}{\text{mol}}\right) * 1 \times 10^9 \frac{ng}{g}}$$

Fonte: (PREDIGER, 2013).

Na equação: [Xng/μL]: concentração de DNA genômico extraído (DNA não diluído); [6,0221x10²³moléculas/mol]: número de Avogadro; [N]:tamanho do genoma de cada linhagem em pb; [660g/mol]: Peso molecular meio de um par de bases.

4.8.2.2 Reações de PCR em tempo real

Foram conduzidas reações com volume final de 20 μL, contendo: 10 μL de Power SYBR® Green PCR Master Mix Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Live Technologies LTD. Kingsland Grange, Warrington,UK); 2 μL de DNA bacteriano extraído a partir do solo [25 ng/ μL]; 0,4 μL *primer forward* [200nM]; 0,4 μL *primer reverse* [200nM]. Todas as reações foram feitas em duplicata no equipamento StepOnePlus™ (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). As condições de amplificação foram, uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, a temperatura de anelamento específica de cada par de *primers* por 30 segundos e uma extensão final de 72°C a 30 segundos. A coleta de fluorescência foi realizada na etapa de extensão e a curva de *melting* foi avaliada com um gradiente de temperatura de 72°C até 95°C, variando 0,3°C cada 15 segundos.

Considerando que os *primers* desenhados tinham como alvo uma única região do genoma, cada cópia de DNA foi considerada como uma única célula bacteriana. Assim, por meio da curva padrão, foi possível inferir o número de células de cada linhagem bacteriana por grama de solo.

Um controle da detecção bacteriana foi realizado, utilizando os *primers* 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1378R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG - 3') que amplificam o gene 16S rRNA. Assim, reações de 25μL contendo: DNA genômico extraído do solo [50ng/μL], 1X de GoTaq® *Reaction Buffer*, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μM de cada um dos *primers* e 1,25 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, EUA) foram feitas para garantir que a não detecção de uma linhagem por meio das reações de qPCR fosse devido à ausência dessa linhagem no solo e não devido à presença de inibidores no material gênico recuperado das amostras de solo. A

amplificação positiva da PCR com *primers* que amplificam o gene 16S rRNA foi considerada como ausência de inibidores (Apêndice D).

4.9 Interação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* com plântulas de milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*)

4.9.1 Obtenção de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*)

Os experimentos de interação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* com a planta hospedeira, foram realizados com plântulas axênicas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) de aproximadamente 10 cm de comprimento, as quais foram obtidas a partir de sementes superficialmente desinfetadas, conforme descrito no item 4.2. As sementes desinfetadas de soja e de milho, foram germinadas em 10 mL de ágar-água (7 g.L⁻¹) em tubos de ensaio de 20 cm x 2 cm. Plântulas de soja foram obtidas após incubação de sementes por 7 dias a 28°C com fotoperíodo de 12h/12h de claro/escuro e as plântulas de milho foram obtidas após incubação de sementes por 5 dias a 28°C, com fotoperíodo de 12h/12h de claro/escuro.

As plântulas de soja e milho (aproximadamente 10 cm), foram transferidas a tubos de ensaio (20cm x 2cm) contendo 18 mL de água destilada estéril, e deixadas sob agitação a 180 rpm a 28°C, com fotoperíodo de 12h/12h de claro/escuro por 3 dias. Este procedimento, foi realizado com a finalidade de permitir que as raízes das plântulas exsudassem compostos envolvidos no estabelecimento da interação (ARAUJO et al., 2015; YUAN et al., 2015).

4.9.2 Tratamentos experimentais

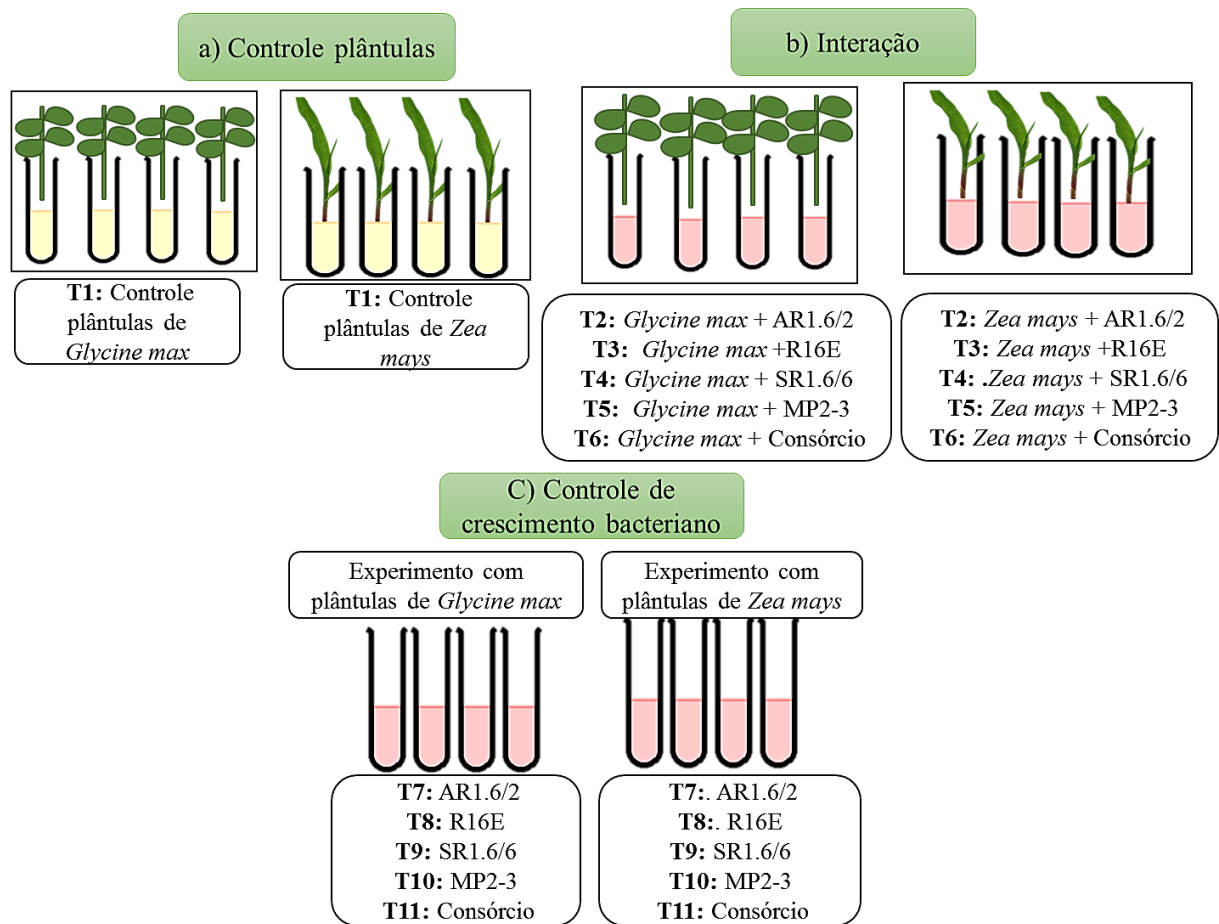
Os experimentos de interação entre as diferentes linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* com plântulas de soja e milho, foram realizados de forma independente. Sendo que, cada experimento, foi constituído por 11 tratamentos (Figura 5) os quais se agrupavam em três condições diferentes:

- a.) Controle plântulas: correspondente ao tratamento controle das plântulas de soja (*Glycine max*) ou de milho (*Zea mays*). Nesses tratamentos, as plântulas foram submergidas em 18 mL de água destilada estéril junto com 2 mL de meio SPW estéril;
- b.) Interação: correspondente a 5 tratamentos para as plântulas de soja (*Glycine max*) e 5 tratamentos para as plântulas de milho (*Zea mays*), nos quais, as plântulas foram submergidas em 18 mL de água destilada estéril e inoculadas com 2 mL da linhagem a avaliar (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3) ou com 2 mL do consórcio bacteriano;

c.) Controle de crescimento bacteriano: correspondente a 5 tratamentos para o experimento desenvolvido com as plântulas de *Glycine max* e 5 tratamentos para o experimento com plântulas de *Zea mays*. Cada tratamento, foi constituído por 2 mL do inóculo da linhagem a avaliar (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3) ou 2 mL do consórcio, suspenso em 18 mL de água destilada estéril.

Para cada um dos tratamentos descritos, foram preparados quatro tubos, com a finalidade de obter duas réplicas biológicas.

Figura 5 - Representação gráfica dos tratamentos experimentais na interação de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* com plântulas de milho e soja.



Fonte: este trabalho

Na figura, observa-se em quadros verdes as três condições avaliadas e em quadros de borda preta os diferentes tratamentos. As letras “T” seguido do número arábigo representam o tratamento.

4.9.3 Inoculação de linhagens de *Methylobacterium spp.* e *Methylobacterium extorquens* em plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*)

As três linhagens de *Methylobacterium spp.* (R16E, SR1.6/6 e MP2-3) e *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2, foram crescidas em 100 mL de meio SPW a 28°C e sob agitação (180 rpm), por 3 dias. Após esse período, a densidade óptica de cada cultura foi ajustada a D.O._{600nm} de 1,0 (10⁸ UFC.mL⁻¹ aproximadamente). Posteriormente, foram preparadas alíquotas de 2 mL de cada cultura bacteriana (D.O._{600nm} =1,0) em microtubos, os quais foram centrifugados a 16.000xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspensionado em 2 mL de meio SPW esterilizado. Para o consórcio, foram preparadas alíquotas de 2 mL contendo: 500µL de cada linhagem (AR1.6/2, R16E, MP2-3 e SR1.6/6) na D.O._{600nm} =1,0.

Assim, as plântulas obtidas no item 4.9.1, contendo 18 mL de água destilada e os exsudatos radiculares, foram inoculadas com 2 mL da suspensão bacteriana, de acordo com os tratamentos descritos na condição “b.” do item 4.9.2.

Para os tratamentos da condição “a.” (item 4.9.2) foram acrescentados 2 mL de meio SPW estéril no lugar do inóculo bacteriano. Da mesma forma, para os tratamentos da condição “c.” (item 4.9.2), foram adicionadas as alíquotas de 2 mL das culturas bacterianas e do consórcio nos tubos contendo 18 mL de água destilada esterilizada. As co-culturas das plântulas com as linhagens bacterianas, assim como, os tratamentos controles foram incubadas por 4 dias a 28°C, sob agitação (180 rpm), com fotoperíodo de 12h/12h de claro/escuro.

4.9.4 Recuperação dos exsudatos e extração de DNA bacteriano a partir das raízes de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*)

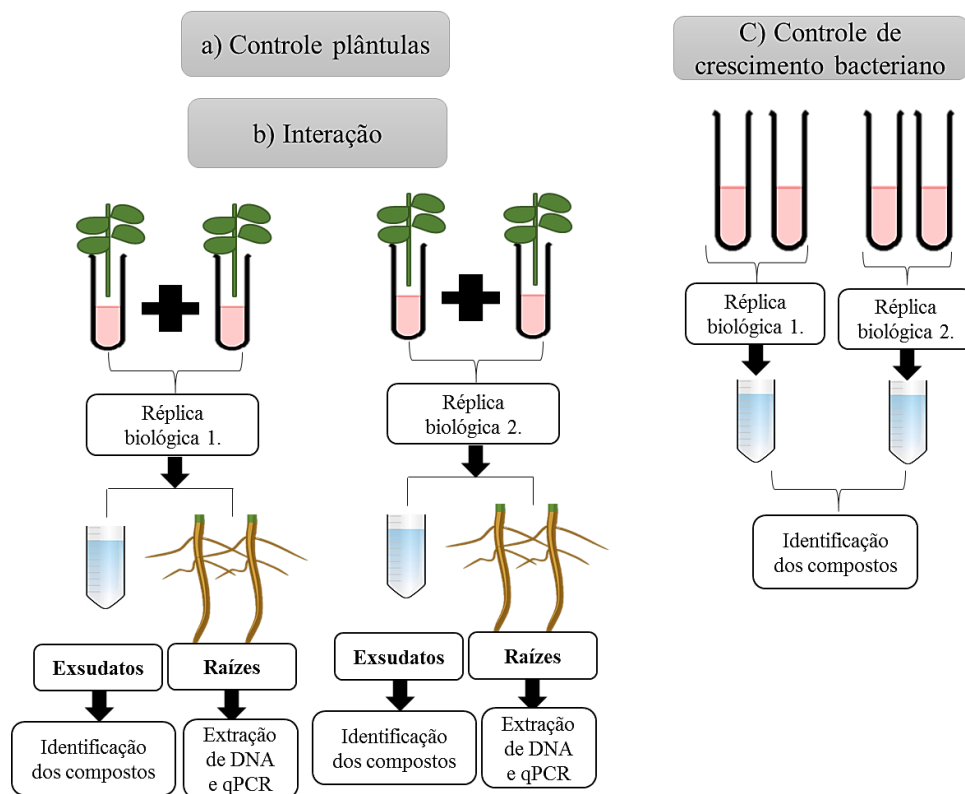
Após os quatro dias de co-cultura, as soluções dos tratamentos descritos no item 4.9.2 foram coletadas e transferidas para tubos cônicos de 50 mL previamente tratados com metanol. Foram reunidas soluções de dois tubos de um mesmo tratamento, para uma réplica, de modo que, cada tratamento foi conduzido com duas réplicas biológicas (Figura 6). Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 1.900xg durante 10 minutos, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante que contém os exsudatos foi recuperado. Os exsudatos de cada réplica; foram esterilizados com filtros de nylon de 0,22 µm, e em seguida foram liofilizados, para as análises de GC-MS que se descrevem no item 4.9.6 (GUO et al., 2017; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; YUAN et al., 2015; ZHALNINA et al., 2018).

As raízes das plântulas (duas raízes por réplica biológica/tratamento) das condições “controle plântulas” e “interação”, foram cortadas com lâminas de bisturi esterilizado e

congeladas a -80°C , para serem utilizadas posteriormente para extração de DNA. Posteriormente, as raízes congeladas foram maceradas em nitrogênio líquido e 50 mg do material macerado foi utilizado para a extração de DNA genômico, com o Kit de extração Wizard® Genomic DNA purification (Promega, Madison, WI, EUA). Dessa forma, obteve-se o DNA genômico de bactérias que colonizam externamente e internamente a raiz das plântulas.

A qualidade do DNA genômico foi analisado em gel de agarose (1% m/v) corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Live Technologies LTD. Kingsland Grange, Warrington, UK), a $3\text{ volts}\cdot\text{cm}^{-1}$. Após a eletroforese, o gel foi foto-documentado sobre luz UV. A concentração de DNA extraído foi determinada por espectrofotometria em BiodropDuo. O DNA recuperado das raízes, foi utilizado para a quantificação das linhagens de *Methylobacterium* spp. (R16E, SR1.6/6 e MP2-3) e *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2 por qPCR (item 4.9.5).

Figura 6 - Fluxograma da recuperação dos exsudatos e do material vegetal.



Fonte: este trabalho

Nas condições **a)** controle plântulas e **b)** interação, os exsudatos vegetais de cada réplica biológica, correspondem soluções de dois tubos de um mesmo tratamento. Também foram recuperadas duas raízes por réplica biológica e tratamento. Na condição **c)** controle de crescimento, foram coletadas as soluções de dois tubos por réplica biológica, para cada tratamento.

4.9.5 Quantificação de *Methylobacterium spp.* e *Methylobacterium extorquens* nas raízes de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) por PCR em tempo real

Para a quantificação das linhagens AR1.6/2, R16E, MP2-3 e SR1.6/6 nas raízes de plântulas de soja e milho, foram realizadas curvas padrão para cada uma das linhagens (Apêndice E), seguindo o descrito no item 4.8.2.1. Posteriormente, a partir do DNA recuperado das raízes das plântulas, foram conduzidas reações de qPCR de 20 µL, como foi relatado no item 4.8.2.2.

A partir das reações de qPCR foi possível determinar o número de cópias de DNA de cada amostra, plotando os valores de C_t , nas curvas padrão. Novamente, foi considerado que uma cópia de DNA corresponde a uma célula bacteriana, permitindo assim, deduzir o número de células de cada linhagem por grama de tecido (raiz) macerado.

Um controle da detecção bacteriana foi realizado, utilizando os *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') e 1378R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG - 3') que amplificam o gene 16S rRNA. Assim, reações de 25µL contendo: DNA genômico extraído das raízes [50ng/µL], 1X de GoTaq® *Reaction Buffer*, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada um dos *primers* e 1,25 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, EUA) foram feitas para garantir que a não detecção de uma linhagem por meio das reações de qPCR fosse devido à ausência dessa linhagem na raiz e não devido à presença de inibidores no material gênico recuperado das raízes das plântulas. A amplificação positiva da PCR com *primers* que amplificam o gene 16S rRNA foi considerada como ausência de inibidores (Apêndice F).

4.9.6 Identificação dos exsudatos bacterianos e das plântulas de soja e milho por GC-MS

A identificação dos exsudatos foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Alberto Labate e da Dra. Thaís Regiani Cataldi do Laboratório de Genética Funcional De Plantas, do departamento de Genética da ESALQ-USP.

4.9.6.1 Preparo das amostras e extração de metabólitos

Para a extração, os exsudatos previamente liofilizados foram ressuspensos em 8 mL de uma mistura de metanol com clorofórmio e água para HPLC, na proporção 6:2:2 (6 mL de metanol:2 mL de clorofórmio:2 mL de água). Alíquotas de 500 µL dos metabólitos ressuspensos nos solventes orgânicos, foram tratadas com 500 µL de acetona gelada (acetona submergida em nitrogênio líquido). Posteriormente, as alíquotas foram centrifugadas a 1.600xg por 10 minutos a 4°C, com a finalidade de precipitar possíveis proteínas residuais do meio de cultura. O sobrenadante recuperado, foi utilizado para o processo de derivatização. Durante o

processo de extração, foram adicionados às amostras os seguintes compostos isotopicamente marcados como padrões internos na concentração de 1 mg.mL⁻¹: ácido succínico (D4, 98% - DLM 584-5), ácido mirístico (1, 2, 3 - ¹³C₃, 99% - CLM 3665- 0.5) e ácido palmítico (1, 2, 3, 4 - ¹³C₄) (BINI, 2016; BONATELLI, 2016).

4.9.6.2 Identificação dos exsudatos por GC-MS

Para análise por GC-MS, alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram transferidos a *vials* de vidro de 1.5 mL e concentrados em liofilizador. Posteriormente, as amostras foram derivatizadas por metoximação e trimetilsililação (WENKE et al., 2019), para o qual, foram ressuspendidas em 30 µL de metoxiamina (15 mg mL⁻¹) em piridina (BINI, 2016; BONATELLI, 2016), e incubadas por 16 h a temperatura ambiente em escuridão. Após esse período, foi realizada a sililação, acrescentando 30 µL de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano), posteriormente as amostras foram incubadas no escuro por 60 minutos a temperatura ambiente (BINI, 2016; BONATELLI, 2016). Finalmente, foram adicionados 30 µL de heptano, e deixadas em repouso por 30 minutos.

A cromatografia GC-MS, foi realizada no equipamento 7890A *Agilent Technologies* (Agilent Technologies, Inc, Wilmington, Delaware, Estados Unidos), o qual estava equipado com duas colunas de sílica fundida, a coluna da primeira dimensão de 20 m comprimento × 0,18 mm diâmetro interno × 0,18 µm de filme (DB-5 Agilent) e a coluna da segunda dimensão de 0,9 m × 0,10 mm diâmetro interno × 0,10 µm de filme (RX-T 17, Restek). Para a análise, 1 µL de cada uma das amostras foi injetado a modo de *splitless* a 280°C, usando como gás carreador hélio, com fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 80°C, a qual foi mantida por 5 minutos, posteriormente a temperatura foi aumentando gradualmente de 15°C em 15°C, até chegar à temperatura final de 305°C, sendo mantida por 10 minutos. Junto às amostras, foram analisados uma série de alcanos (C₁₂ – C₃₆), o que possibilitou o cálculo dos índices e tempo de retenção.

O efluente da coluna, foi introduzido na fonte de íons do equipamento GC x GC-TOFMS (Pegasus 4D, Leco, St. Joseph). A temperatura da fonte de íons foi 250 °C, feixe de elétrons 70-eV, corrente de ionização de 2.0 mA e 20 espectros s⁻¹ sendo registrados na faixa de 45-800 *m/z*, a voltagem do detector foi 1500 V ambiente (BINI, 2016; BONATELLI, 2016).

Os cromatogramas obtidos foram tratados no programa *ChromaTOF* 4.32 (LECO's ChromaTOF®, Saint Joseph, MI, estados Unidos) no qual, foi determinado o *baseline*, retirado o ruído eletrônico e realizada a conversão dos dados para arquivos netCDF. Posteriormente,

com o auxílio do pacote *TargetSearch* no ambiente R (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009), foi realizado o processo de deconvolução dos picos cromatográficos, a obtenção do índice de retenção (RI), a correção do tempo de retenção (RT), o alinhamento de picos e a identificação dos metabólitos. A identificação, foi realizada com a biblioteca *The Golm Metabolome Database*, tendo em conta os critérios: presença de 3 ou mais massas características e um *score* de similaridade igual ou maior a 600. Por último, a intensidade de cada metabólito foi normalizada pela contagem iônica total (*TIC*) de cada amostra.

4.9.6.3 Análise estatística dos metabólitos identificados por GC-MS

A análise estatística foi realizada na plataforma online MetaboAnalyst 4.0 (CHONG et al., 2018), para isso, os dados foram filtrados, transformados (Logaritmo), e escalonados usando o método de Pareto (escalonamento baseado na raiz quadrada do desvio padrão). Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA), com *post-hoc* de *Fisher's least significant difference- LDS* com um valor de $p < 0,05$. Posteriormente, foram conduzidas análises de componentes principais PCA e agrupamentos (*clustering*) em *heatmaps*, usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

4.10 Produção de Biofilme por *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* em meio de cultura SPW

A capacidade das linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* em produzir biofilme foi avaliada, de acordo com o método de microtiter plate (O'TOOLE GA, PRATT LA, WATNICK PI, NEWMAN DK, WEAVER VB, 1999).

Para isso, foram preparadas suspensões bacterianas de cada uma das linhagens (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3) em meio SPW, ajustadas a uma D.O._{600nm} de 0,1 (mesma densidade óptica, na que ficaram as culturas no experimento de interação com plantas), a suspensão do consórcio foi preparada com 2 mL de cada uma das linhagens ajustadas a D.O._{600nm} de 0,1 (aproximadamente 10^7 UFC.mL⁻¹). Seguidamente, 1 mL de cada uma das suspensões foi dispensado em placas de poliestireno de 24 poços de fundo plano Jet Biofil (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd, China), sendo disponibilizados 6 poços para cada um dos tratamentos (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3 e consórcio) e usando meio SPW sem inóculo como controle (modificado de XU et al., 2014). Foram realizados dois experimentos independentes, cada um com duas placas, totalizando 12 réplicas biológicas para cada tratamento. As culturas foram incubadas a 28°C sob agitação (180 rpm) por 4 dias (mesmo tempo das co-culturas de bactérias com plântulas).

Após os quatro dias de crescimento, a cultura bacteriana foi removida, e os remanescentes de meio e células planctônicas foram retirados com três lavagens com água destilada. As placas foram incubadas a 60°C por 30 minutos para secagem, depois, foram adicionados 1,5 mL de uma solução de cristal violeta 0,1% (diluído em água destilada) a cada um dos poços (DJORDJEVIC; WIEDMANN; MCLANDBOROUGH, 2002), então, as placas foram deixadas em agitação (180 rpm) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o cristal violeta foi retirado, e o excesso de corante foi removido com três lavagens de água destilada. As placas foram secadas a 60°C por 15 minutos. Por último, o corante foi dissolvido com a adição de 1,5 mL de etanol 96% a cada um dos poços. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro Epoch 2 – Bio tek (Bio teck Instruments, Inc, Vermont, New England) a D.O. $_{595\text{nm}}$ (DJORDJEVIC; WIEDMANN; MCLANDBOROUGH, 2002).

4.11 Produção de Biofilme por *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* na presença dos exsudatos de plântulas de milho

Com o propósito de observar o efeito dos exsudatos radiculares na produção de biofilme bacteriano, foram preparadas suspensões bacterianas das linhagens AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3 em meio SPW, ajustadas a uma D.O. $_{600\text{nm}}$ de 1.0 (10^8 UFC.mL⁻¹ aproximadamente). Alíquotas de 2mL destas suspensões, foram centrifugadas a 16.000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspendido em 2 mL de meio SPW esterilizado. Para o consórcio, foram preparadas alíquotas de 2 mL contendo: 500µL de cada linhagem em uma D.O. $_{600\text{nm}}$ =1.0. Cada alíquota, foi colocada em um tubo contendo 18 mL da solução contendo exsudatos de plântulas de milho, (item 4.8.1). A produção de biofilme foi analisada em placas de poliestireno de 24 poços de fundo plano Jet Biofil (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd, China), em que 1 mL dos exsudatos inoculados foi adicionado em cada poço. Foram montadas quatro placas, totalizando 16 poços por tratamento avaliado (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3 e consórcio), os quais corresponderam as réplicas biológicas. Exsudatos misturados com meio SPW numa concentração final de 10%, foram usados como branco. A coração e quantificação do biofilme gerado, foi feita como descrito anteriormente (numeral 4.10).

4.12 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico Graphpad Prism versão 5.3.(GraphPad Software, La Jolla California USA) seguindo os seguintes critérios: quando as variáveis a serem estudadas apresentaram uma distribuição normal, foi feita uma análise de variância (ANOVA) para avaliar as diferenças entre as médias de mais de 2 grupos. Essas análises, foram complementadas com uma análise de comparação múltipla de *Tukey* ou *Dunnet*.

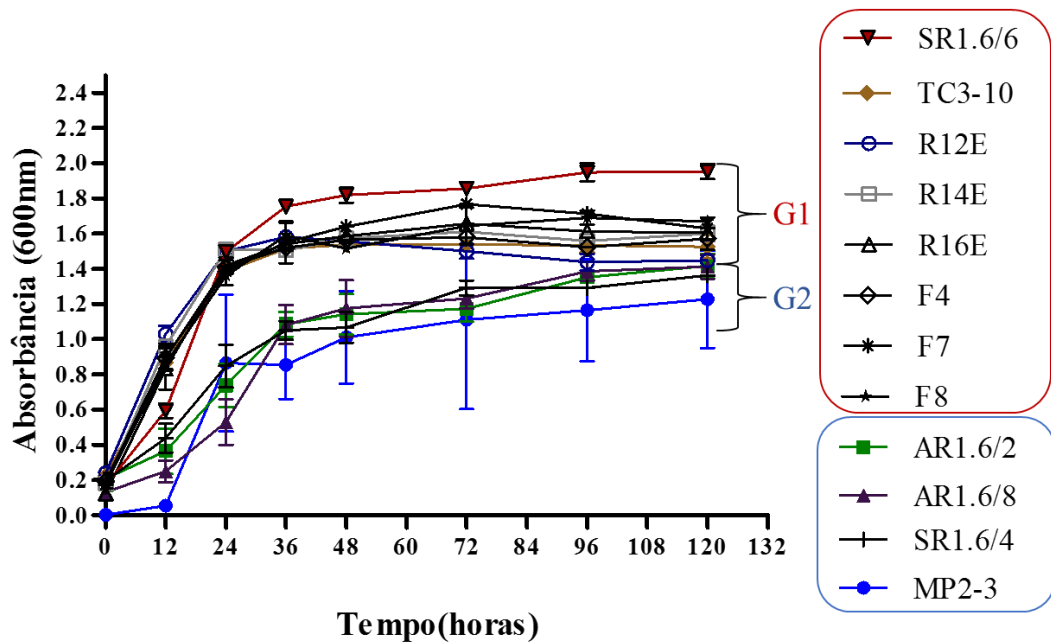
Para comparação entre dois grupos foi realizado um *t-test* para amostras não pareadas. Em todos os casos, um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Curvas de crescimento de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*

O crescimento de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* em meio SPW foi avaliado por até 120 h, o que permitindo obter as curvas de crescimento para cada um dos isolados (Apêndice G). Baseado nas curvas de crescimento obtidas os isolados bacterianos foram separados em dois grupos (Figura 7): O grupo G1, formado pelas linhagens que atingiram maiores densidades ópticas (D.O. $_{600\text{nm}}$) e possivelmente tem maior velocidade de crescimento (TC3-10, R12E, R14E, R16E, SR1.6/6, F4, F7 e F8) e o grupo G2, formado pelas linhagens que apresentaram valores de D.O. $_{600\text{nm}}$ menores e possivelmente menor velocidade de crescimento (AR1.6/2, AR1.6/8, SR1.6/4 e MP2-3). Este comportamento diferencial foi melhor observado entre 24h e 72h de cultivo, visto que após 96h não foi possível distinguir as linhagens avaliadas.

Figura 7 - Curvas de crescimento de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*.



Na figura, estão apresentadas as médias das densidades ópticas a uma absorbância de $\lambda=600\text{nm} \pm$ o desvio padrão. Observa-se que as linhagens exibem uma aparente divisão em dois grupos G1 (fonte vermelha) no qual encontram-se aquelas linhagens que atingiram D.O. $_{600\text{nm}}$ maiores e provavelmente têm maior velocidade de crescimento e o G2 (fonte azul), onde se agruparam linhagens que atingiram menores D.O. $_{600\text{nm}}$ e possivelmente apresentam menor velocidade de crescimento.

Os genomas (*Core* genoma) dos 12 isolados do presente estudo foram comparados por meio da análise de ANI (*Average Nucleotide Identity*) com auxílio do Dr. Deibs Barbosa (Instituto de Química-USP). Assim, foram observados no gráfico *heatmap* (Anexo B.), 2 grupos

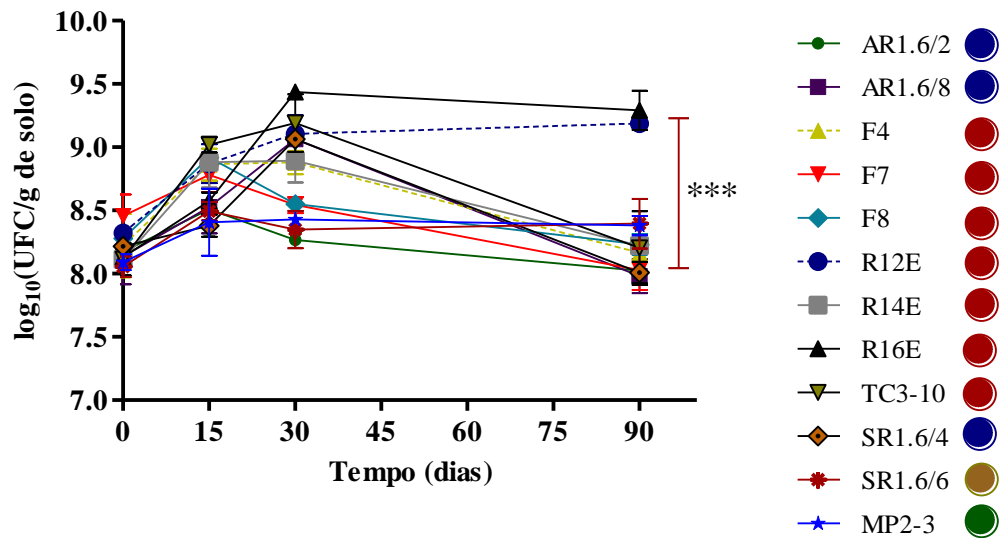
(A e B). No grupo A, estão os isolados F4, F7, F8, R12E, R14E, R16 e, TC3-10 (subgrupo A1) e a linhagem SR1.6/6 (Subgrupo A2), que apresentaram um maior crescimento *in vitro* (grupo G1, das curvas de crescimento). Por sua vez, o grupo B, é formado pelos isolados MP2-3 (Subgrupo B1 no *heatmap*), AR1.6/2, AR1.6/8 e SR1.6/4 (Subgrupo B2), os quais, mostraram um menor crescimento *in vitro* (G2) (Figura 7).

Considerando o agrupamento com base nos dados do ANI (Anexo B), as linhagens pertencentes a o subgrupo A₁ serão destacadas na cor vermelha, enquanto a linhagem SR1.6/6, pertencente ao subgrupo A2 será destacada na cor amarela; a linhagem MP2-3 (B1) será destacada pela cor verde e, finalmente, as linhagens do subgrupo B2 serão destacadas na cor azul. Essa forma de identificação gráfica dos grupos/linhagens será utilizada ao longo do presente documento

5.2 Sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* em solo esterilizado

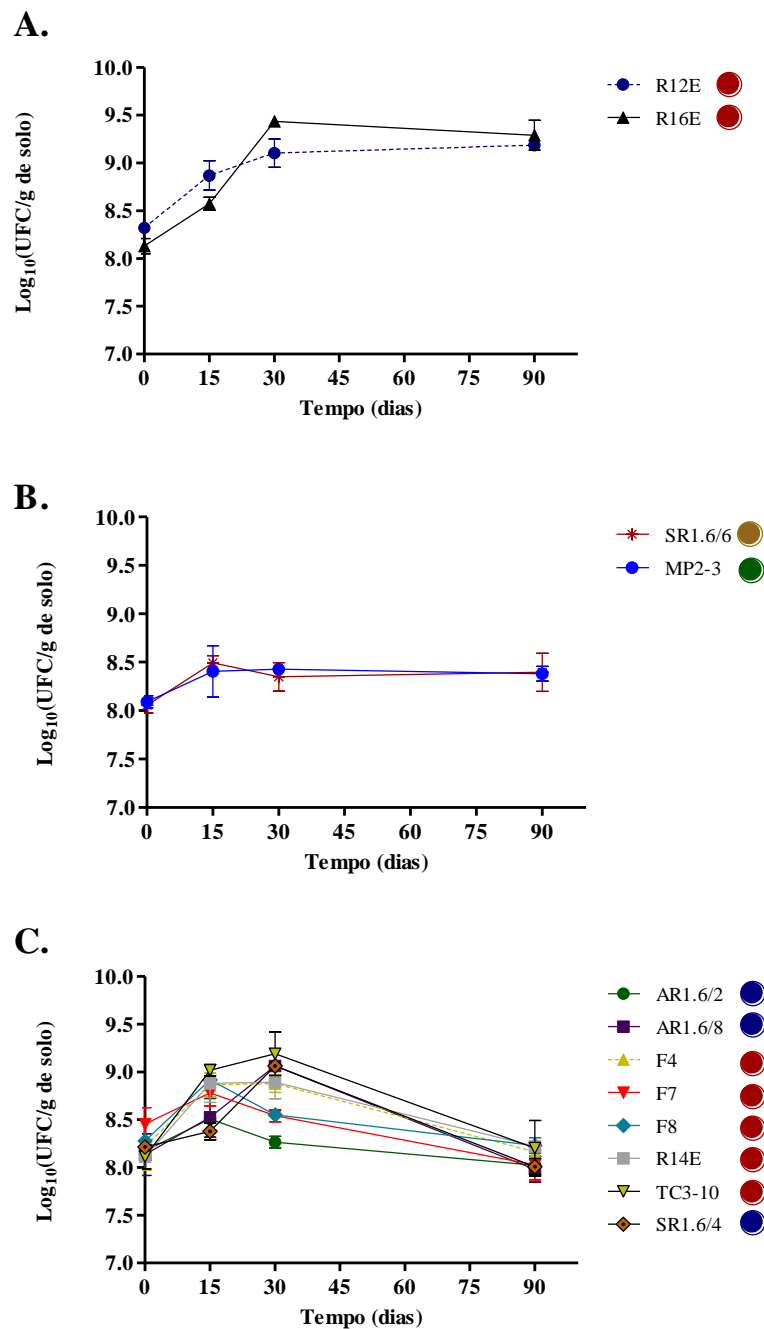
O segundo teste de caracterização fisiológica realizado foi o experimento de sobrevivência em solo esterilizado. Nesse experimento, foi observado que todos os isolados de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* avaliados sobreviveram no solo esterilizado por até 90 dias após a inoculação (Figura 8 e Apêndice H). Com base na abundância determinada a partir da contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC.g solo⁻¹), em cada um dos tempos de amostragem, foi observado qualitativamente, que as curvas de sobrevivência obtidas apresentaram três padrões diferentes (Figura 9). Padrão S1, formado pelas linhagens R12E e R16E, as quais se destacaram, pois cresceram até os 30 dias após inoculação e conseqüentemente mostraram significativamente ($p < 0,001$) maior abundância ao final do experimento (90 dias). O padrão S2, constituído pelas linhagens SR1.6/6 e MP2-3, que cresceram ativamente no solo até o 15º dia, mantendo a sua população estável após este período, até o final do experimento (Figura 9). E por último, o padrão S3 constituído pelos isolados AR1.6/2, AR1.6/8, F4, F7, F8, R14E, SR1.6/4 e TC3-10, os quais apresentaram uma redução na sua abundância (UFC.g solo⁻¹) nos tempos avaliados, sendo que, as linhagens AR1.6/2, F7 e F8, mostraram essa redução na abundância após 15 dias, enquanto os demais isolados, após 30 dias.

Figura 8 - Sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* em solo esterilizado



Na figura estão apresentados em escala logarítmica as médias das UFC.g solo⁻¹ ± desvio padrão em 0, 15, 30 e 90 dias após inoculação. As linhagens R12E e R16E apresentaram maior sobrevivência ($p < 0,001$) no solo, no final do experimento (90 dias). As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltiplo de TUKEY. $p^{***} < 0,001$. Os círculos de cores se referem ao agrupamento da análise comparativa dos genomas (ANI) descrito no item 3.1, sendo que círculos vermelhos indicam linhagens pertencentes ao subgrupo A₁, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e círculos azuis a linhagens do subgrupo B₂.

Figura 9 - Diferenciação dos padrões de sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* em solo esterilizado.



Na figura, estão apresentadas as médias das UFC.g solo⁻¹ ± desvio padrão (escala logarítmica) em 0, 15, 30 e 90 dias após inoculação. [A.] Padrão de sobrevivência S1, agrupando as linhagens R12E e R16E, as quais apresentaram a maior sobrevivência no solo, 90 dias após inoculação. [B.] S2, conformado pelas linhagens SR1.6/6 e MP2-3, as quais crescem ativamente até o dia 15 e mantém a sua população estável até os 90 dias. [C.] Padrão de sobrevivência S3, formado pelas linhagens AR1.6/2, AR1.6/8, F4, F7, F8, R14E, SR1.6/4 e TC3-10, que mostraram uma redução na sua abundância durante o experimento. Os círculos de cores refletem o agrupamento da comparação dos genomas (ANI), os círculos vermelhos indicam linhagens pertencentes ao subgrupo A₁, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e círculos azuis a linhagens do subgrupo B₂.

5.3 Promoção do crescimento radicular de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), por *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*

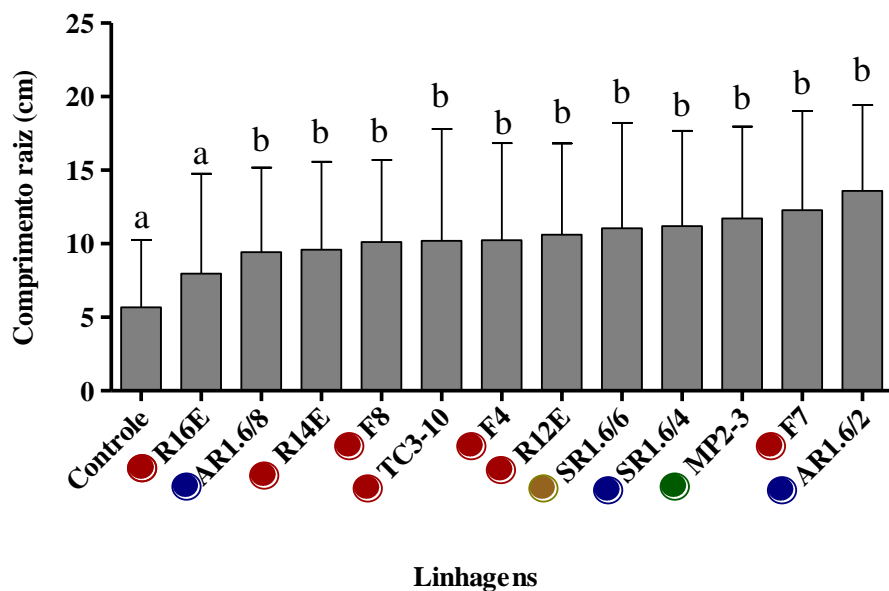
O último experimento de caracterização fisiológica realizado, foi a avaliação da promoção do crescimento radicular de plântulas de soja e milho. A promoção de crescimento, foi avaliada em plântulas de soja 7 dias após inoculação, enquanto para milho a avaliação foi feita 3 dias após inoculação. Foi observado que 11 das 12 linhagens avaliadas, promoveram significativamente ($p < 0,05$) um aumento no comprimento da raiz de plântulas de soja, quando comparadas ao tratamento controle (Figura 10). A linhagem R16E foi a única que não induziu um aumento no comprimento das raízes de plântulas de soja.

No entanto, nenhuma das linhagens de *Methylobacterium* spp. nem de *Methylorubrum extorquens*, mostraram efeito sobre o comprimento da raiz de plântulas de milho (Figura 10.). Durante a análise das plântulas, nenhuma lesão foi observada nas plântulas avaliadas.

Figura 10 - Influência de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* no comprimento da raiz de plântulas.

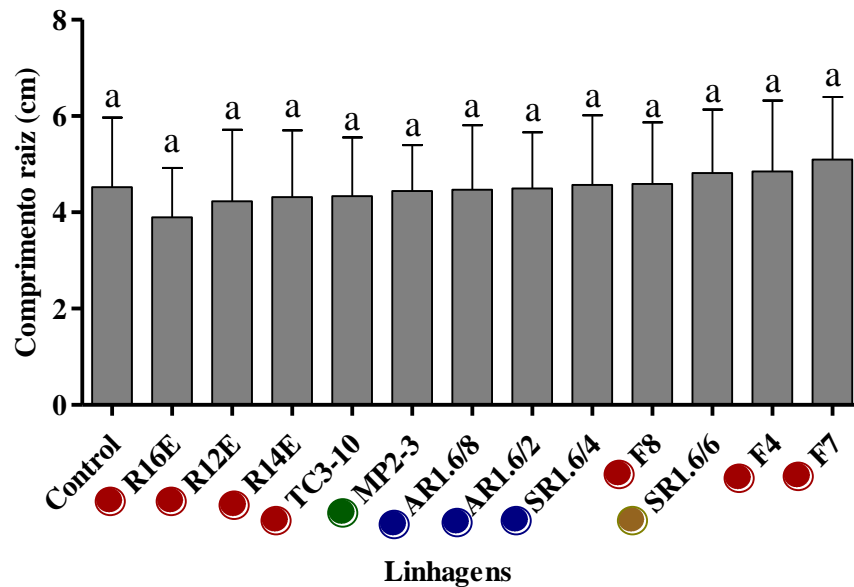
(Continua)

A.



(conclusão)

B.



[A.] Plântulas de soja (*Glycine max*). [B.] Plântulas de milho (*Zea mays*). Nos gráficos, os dados são apresentados como a média do comprimento da raiz \pm desvio padrão. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de DUNNETT com um valor de $p < 0,05$. Os dados mostrados no gráfico correspondem à combinação de três experimentos independentes. Os círculos de cores refletem o agrupamento da comparação dos genomas (ANI), círculos vermelhos indicam linhagens pertencentes ao subgrupo A₁, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e círculos azuis a linhagens do subgrupo B₂.

5.4 Seleção de linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*

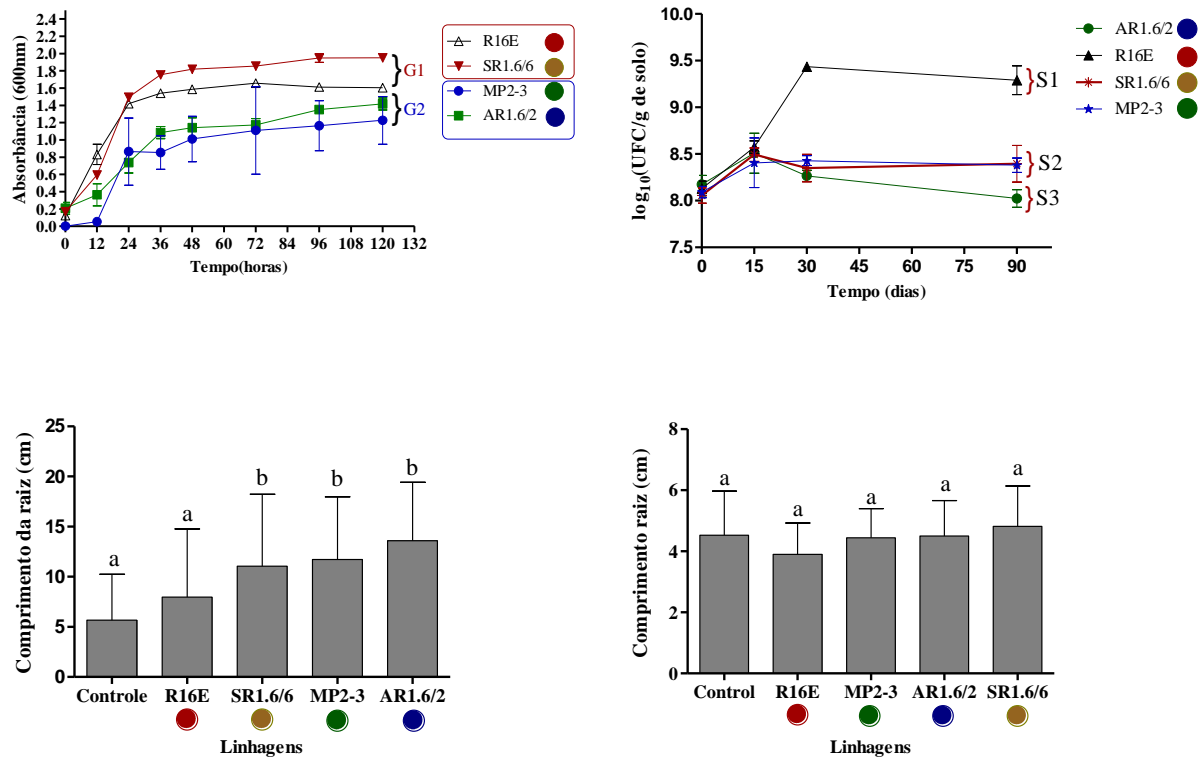
A partir dos resultados obtidos por meio dos experimentos de caracterização fisiológica (itens 3.1, 3.2 e 3.3), foram selecionadas quatro linhagens (Figura 11), as quais foram usadas para desenvolver os experimentos de sobrevivência em solo, interação com plântulas e formação de biofilme. As linhagens selecionadas e os critérios de seleção utilizados estão descritos a seguir

- Methylobacterium extorquens* AR1.6/2, foi selecionada, porque promoveu o crescimento radicular de plântulas de soja com um valor de $p < 0,05$. Adicionalmente pertence ao G2 da análise das curvas de crescimento obtida nesse trabalho e no subgrupo B2 da comparação dos genomas. Esta linhagem também foi selecionada porque num estudo prévio, foi reportado que esta linhagem pode inibir a germinação de sementes de *Citrus limonia* (BOGAS et al., 2016).

- b) *Methylobacterium fujiwaense* R16E, foi selecionada, porque embora não tenha apresentado promoção de crescimento em plântulas de soja e nem de milho, esta linhagem apresentou uma abundância significativa no experimento de sobrevivência em solo esterilizado na amostragem de 90 dias após inóculo.
- c) *Methylobacterium hispanicum* MP2-3, foi selecionada por ser geneticamente diferentes das demais linhagens (Anexo B.), sendo agrupado no subgrupo B1 da análise de ANI. Adicionalmente, a mesma apresentou a capacidade de promoção de crescimento em plântulas de soja ($p < 0,05$) e manteve uma abundância estável no solo esterilizado até 90 dias após inoculação.
- d) *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6, foi selecionada por ser capaz de induzir um aumento significativo ($p < 0,05$) no comprimento da raiz de plântulas de soja e porque esta linhagem se agrupou dentro do grupo G1, das curvas de crescimento. Adicionalmente esta linhagem mantém uma abundância estável no solo estéril até os 90 dias após inoculação.

A seleção desta linhagem se deve também ao fato de que, promove o crescimento vegetal de plântulas de *Citrus limonia* após germinação (BOGAS et al., 2016). Além disso, estudos prévios mostraram o potencial biotecnológico desta linhagem como possível agente de controle de *Xylella. fastidiosa* em plantas de *Catharanthus roseus* (LACAVA et al., 2004)

Figura 11 - Características fisiológicas das linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* selecionadas



Na figura, observa-se os resultados dos diferentes experimentos de caracterização fisiológica das quatro linhagens selecionadas. [A.] Curvas de crescimento. [B.] Sobrevivência no solo esterilizado. [C.] Promoção do crescimento radicular de plântulas de soja (*Glycine max*). [D.] Promoção do crescimento radicular de plântulas de milho (*Zea mays*). Em todos os gráficos, os círculos de cores refletem o agrupamento resultante da comparação dos genomas (ANI), círculos vermelhos indicam que as linhagens pertencem ao subgrupo A₁, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e círculos azuis a linhagens do subgrupo B₂.

5.5 Desenho de *primers* para a detecção e quantificação de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*

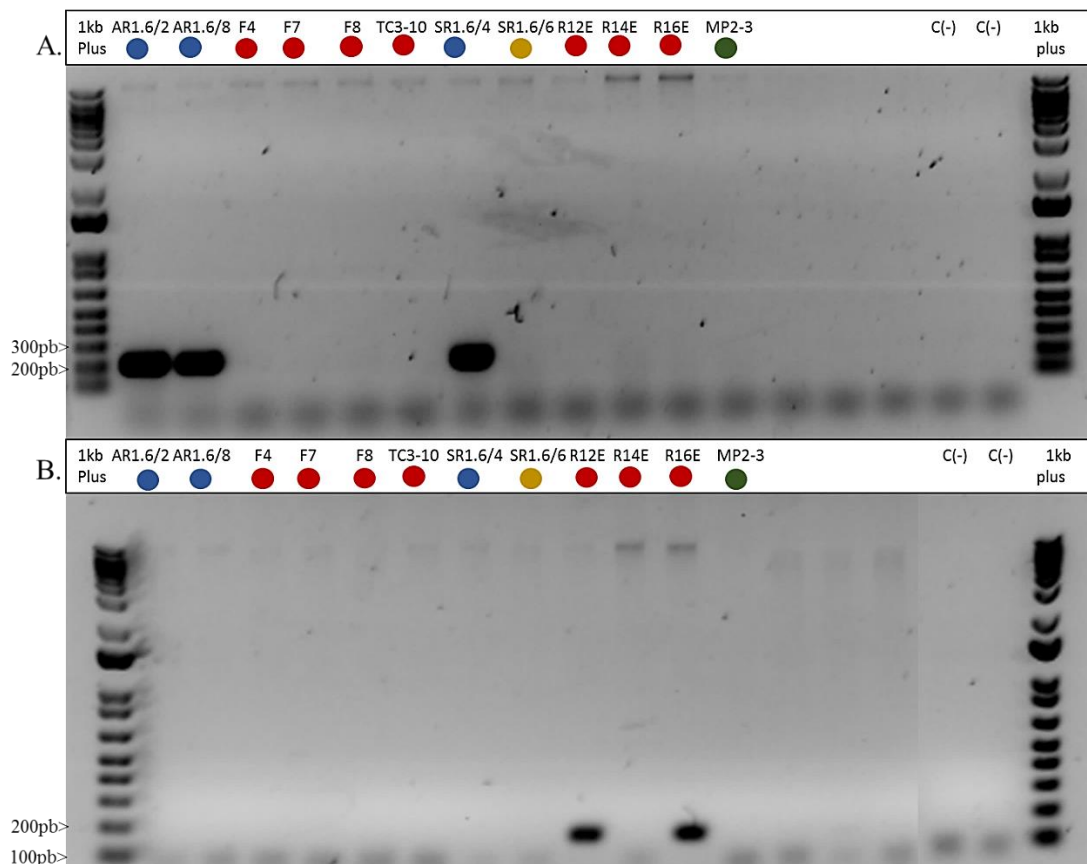
Foram desenhados *primers* específicos para as quatro linhagens selecionadas (AR1.6/2; R16E; SR1.6/6 e MP2-3), os quais foram usados posteriormente para a quantificação destas bactérias no solo e nas raízes das plântulas. A especificidade dos *primers* foi testada com o DNA genômico das 12 linhagens utilizadas inicialmente na primeira etapa do trabalho. Dada a similaridade genômica entre os isolados (Anexo B), os *primers* foram desenhados para grupos de isolados geneticamente similares (análise de ANI). Dessa forma, os *primers* MEX1-F e

MEX1-R (desenhados para a detecção da linhagem AR1.6/2) amplificaram o fragmento esperado de 213 pb para as linhagens AR1.6/2; AR1.6/8 e SR1.6/4 (Figura 12 A), que de acordo com o agrupamento do ANI (*Average Nucleotide Identity*) se encontram no subgrupo B2 e apresentam uma similaridade de aproximadamente 100% (Anexo B). Da mesma forma, os *primers* MF5-R16-F e MF6-R16E-R amplificaram o fragmento esperado de 169 pb para as linhagens R12E e R16E (Figura 12 B), que apresentam uma similaridade entre 95 e 100% (Anexo B).

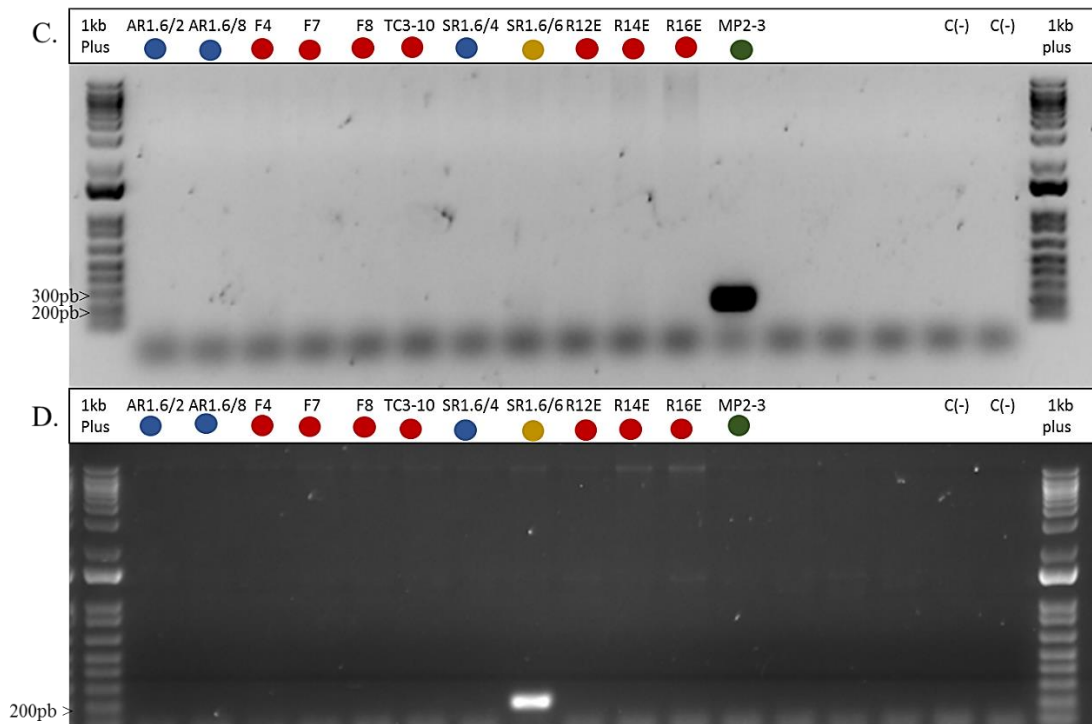
Os *primers* MHP1-F e MHP2-R foram específicos e exclusivos para a linhagem, resultando na amplificação de um produto esperado de 208 pb (Figura 12 C). De forma similar, o par de *primers* SR1.6/6-F e SR1.6/6-R desenhado a partir de uma possível região exclusiva do genoma, foi específico para a linhagem SR1.6/6, resultando na amplificação de um produto esperado de 208 pb (Figura 12 D.).

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose de PCR com *primers* desenhados para a detecção de linhagens específicas de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*.

(Continua)



(Conclusão)

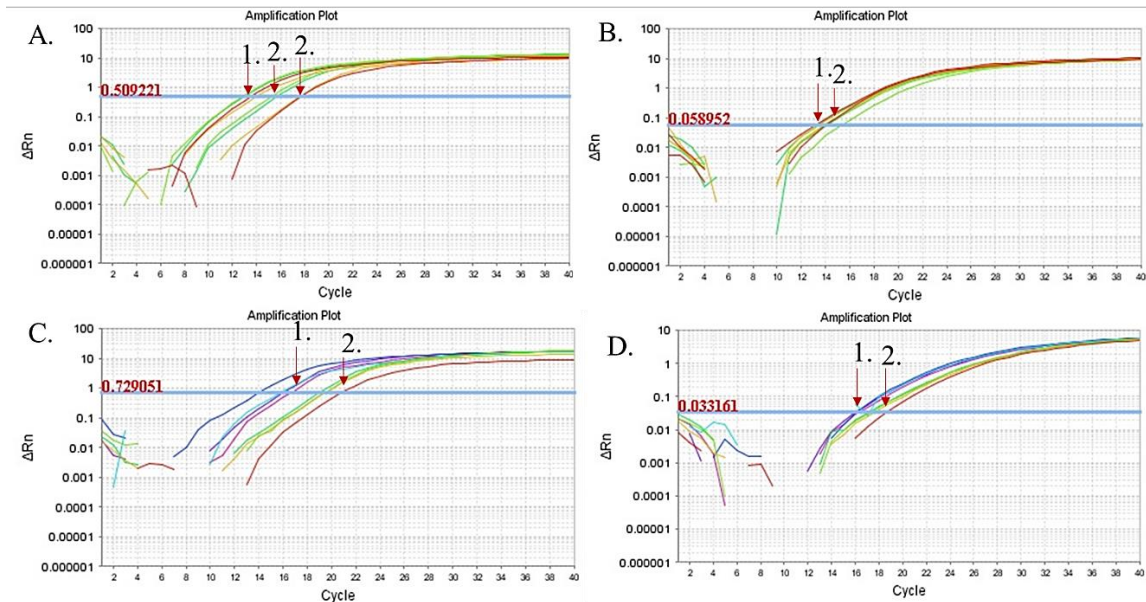


[A.] Produtos de PCR de 213 pb gerados com os *primers* MEX1-F e MEX1-R para as linhagens AR1.6/2, AR1.6/8 e SR1.6/4. [B.] Produtos de PCR de 169 pb para as linhagens R12E e R16E [C.] Produto de PCR de 208 pb para a linhagem MP2-3 com os *primers* MHP1-F e MHP2 [D.] Produto de 208 pb para a linhagem SR1.6/6, o marcador molecular 1kb plus (Invitrogen); [C(-)] controle negativo da reação. Os círculos de cores refletem o agrupamento da comparação dos genomas (*ANI*), círculos vermelhos representam as linhagens pertencentes ao subgrupo A₁, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e os círculos azuis representam as linhagens do subgrupo B₂.

5.6 Ensaio de *primers* específicos para linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* por PCR em tempo real

Com a finalidade de confirmar se os *primers* desenhados e validados por PCR convencional amplificavam as amostras de DNA na técnica de qPCR (PCR quantitativo), foram conduzidas reações com amostras de DNA genômico de cada uma das linhagens e com o consórcio (mistura das quatro linhagens). As curvas de amplificação obtidas (Figura 13) mostraram que os pares de *primers* desenhados para as três linhagens de *Methylobacterium* spp. selecionadas e para *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2, foram eficazes para a amplificação dos produtos desejados. Foram observadas curvas de amplificação tanto para as reações que continham somente o DNA alvo (identificadas como 1.), como para o consórcio (identificadas como 2.). A confirmação e validação dos *primers* em qPCR permitiu dar continuidade aos ensaios de sobrevivência no solo e os experimentos de interação com plântulas.

Figura 13 - Curvas de amplificação obtidas a partir das reações de qPCR com *primers* específicos para *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*.



[A.] *Primers* MEX1-F/MEX1-R; [B.] *Primers* MF5-R16E-F/MF6-R16E-R; [C.] *Primers* MHP1-F/MHP2-R; [D.] *Primers* SR1.6/6-F/ SR1.6/6-R. O número [1.] indica as curvas de amplificação com o DNA da linhagem alvo de cada par de *primers* e o número [2.] indica a curva de amplificação obtiva do DNA da linhagem alvo presente no consórcio.

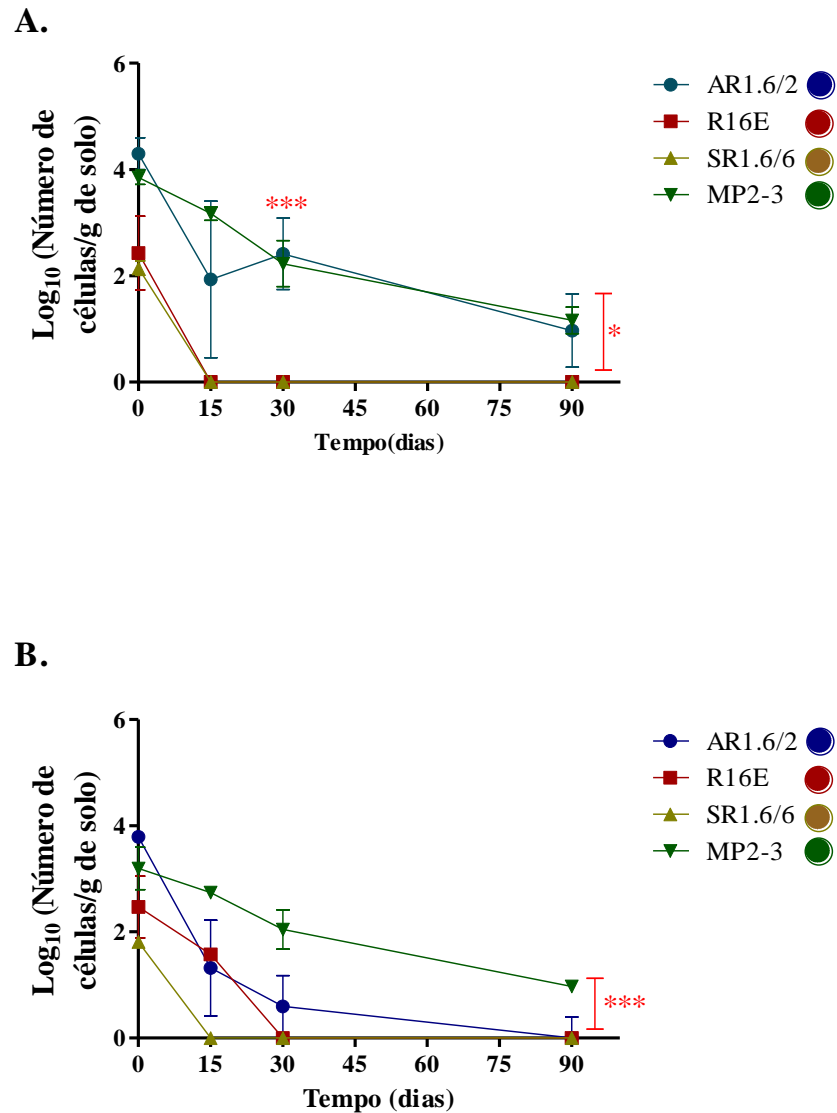
5.7 Sobrevivência de linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* no solo

Considerando que o solo é o ambiente no qual a bactéria se estabelece antes de colonizar a planta, a sobrevivência das bactérias selecionadas foi avaliada no solo não esterilizado, quando inoculadas individualmente e no consórcio, mediante a quantificação por qPCR.

Desta maneira, foi observado que quando inoculadas individualmente, as linhagens AR1.6/2 e MP2-3 sobreviveram no solo por até 90 dias, mostrando uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de células/g de solo, em relação as outras linhagens, nesse tempo de amostragem (Figura 14). Em contraste, as linhagens R16E e SR1.6/6 apresentaram sobrevivência inferior a 15 dias, visto que não foram detectadas no solo a partir deste tempo de amostragem. Por outro lado, no tratamento com o consórcio bacteriano, foi observado que só a linhagem MP2-3 conseguiu sobreviver até os 90 dias, exibindo uma diferença significativa ($p < 0,001$) na sua abundância em relação aos outros isolados. A linhagem R16E foi detectada aos 15 dias no consórcio, enquanto quando inoculada sozinha não foi possível a sua detecção nesse tempo de amostragem. De forma similar a linhagem AR1.6/2, sobreviveu no solo até 30 dias,

não sendo mais detectada no consórcio. Por último, a linhagem SR1.6/6 não conseguiu se desenvolver no solo na presença de competidores, sendo a linhagem que reduziu mais rapidamente sua população quanto inoculada sozinha como no consórcio, visto que a sua sobrevivência no solo foi inferior a 15 dias.

Figura 14 - Curvas de sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* no solo.

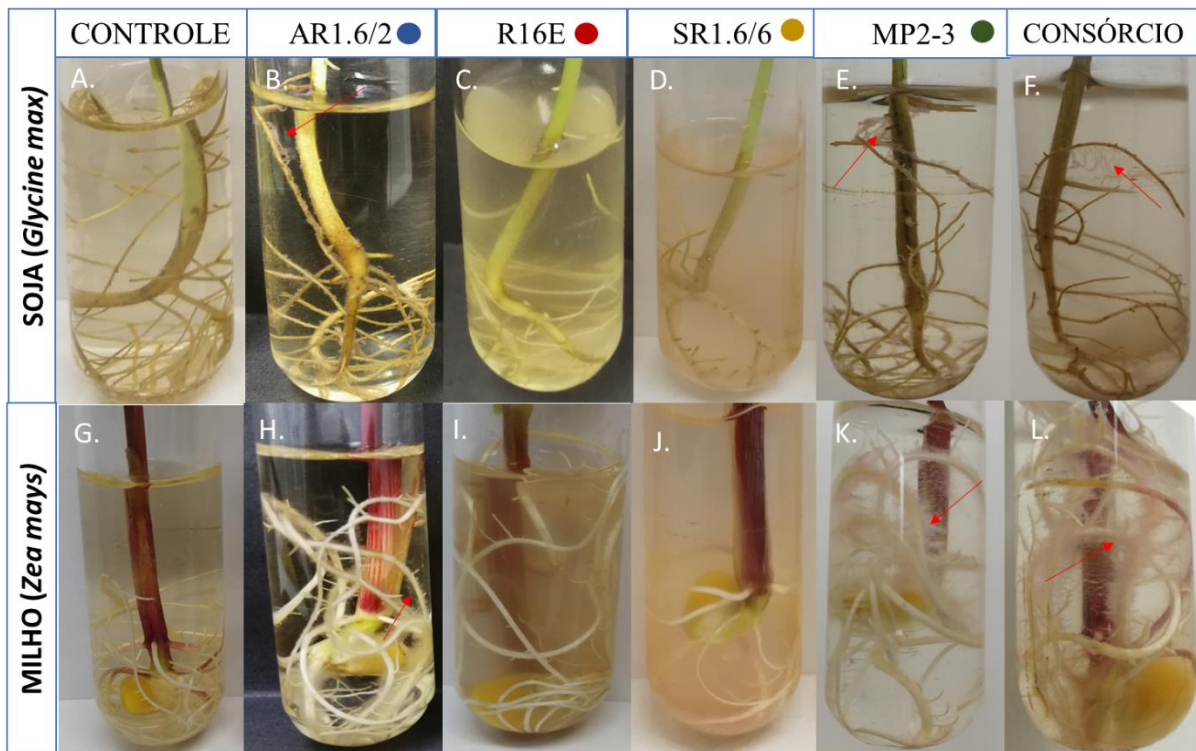


Na figura estão apresentadas as médias do número de células/g de solo \pm desvio padrão (escala logarítmica). [A.] Sobrevivência das linhagens quando inoculadas individualmente no solo. [B.] Sobrevivência das linhagens no consórcio. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltiplo de TUKEY. $p^{***} < 0,001$; $p^* < 0,05$. Os círculos de cores do lado dos nomes, referem-se ao agrupamento da comparação dos genomas (ANI), o círculo vermelho indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₁, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e o círculo azul a linhagem é do subgrupo B₂.

5.8 Interação de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* com plântulas de milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*)

Nos experimentos de interação, todas as linhagens avaliadas conseguiram se desenvolver na presença das plântulas. Foi observado que as linhagens SR1.6/6 e R16E apresentaram crescimento planctônico intenso (meio turvo) na presença das raízes de soja e de milho (Figura 15 C, D, I e J). Em contraste, as linhagens AR1.6/2 e MP2-3 mostraram uma preferência pela raiz, sendo observada a formação de biofilme na superfície da mesma e menor crescimento planctônico (Figura 15 B, E, H e K). No consórcio bacteriano, foi observado tanto o crescimento planctônico como a formação do biofilme nas raízes das plantas.

Figura 15 - Interação de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* com plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).

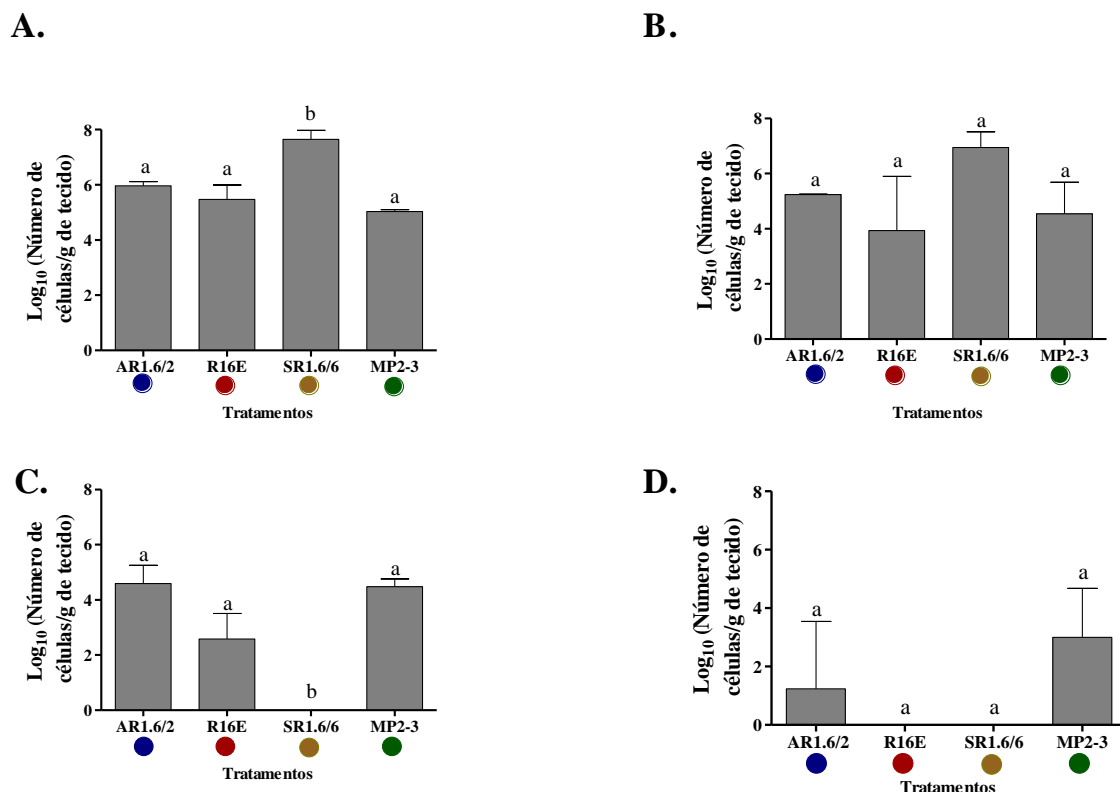


[A.] Controle plântulas de soja; [B.] Plântulas de soja inoculadas com *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2; [C.] Plântulas inoculadas com *Methylobacterium fujisawaense* R16E; [D.] Plântulas de soja inoculadas com *Methylobacterium mesophilicum* SR 1.6/6 [E.] Plântulas de soja inoculadas com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3; [F.] Plântulas de soja inoculadas com consórcio; [G.] Controle plântulas de milho; [H.] Plântulas de milho inoculadas com *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2; [I.] Plântulas de milho inoculadas com *M. fujisawaense* R16E; [J.] Plântulas de milho inoculadas com *M. mesophilicum* SR1.6/6 [K.] Plântulas de milho inoculadas com *M. hispanicum* MP2-3; [L.] Plântulas de milho inoculadas com consórcio. Os círculos de cores do lado dos nomes, refletem o agrupamento da comparação dos genomas (ANI), o círculo vermelho indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₁, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e o círculo azul a linhagem é do subgrupo B₂.

5.9 Quantificação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* na raiz de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*)

Durante a interação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2 com plântulas de soja e milho, foi observado que quando inoculadas individualmente todas as linhagens colonizaram as raízes de soja (Figura 16A) e milho (Figura 16B). Em soja foi observado que *M. mesophilicum* SR1.6/6 foi a mais abundante ($p < 0,05$), em relação as outras linhagens (Figura 16A). Entretanto, quando inoculada no consórcio, *M. mesophilicum* SR1.6/6 não foi capaz de colonizar as raízes de soja (Figura 16C) sendo significativamente ($p < 0,05$) menos abundante que as outras linhagens. De forma geral, quando inoculadas em consórcio, todas as bactérias apresentaram menor abundância nas raízes das plantas avaliadas. Não foi observada diferença significativa na abundância das linhagens em raízes de plântulas de milho tanto quando inoculadas individualmente, como no consórcio.

Figura 16 - Quantificação de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* na raiz de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).



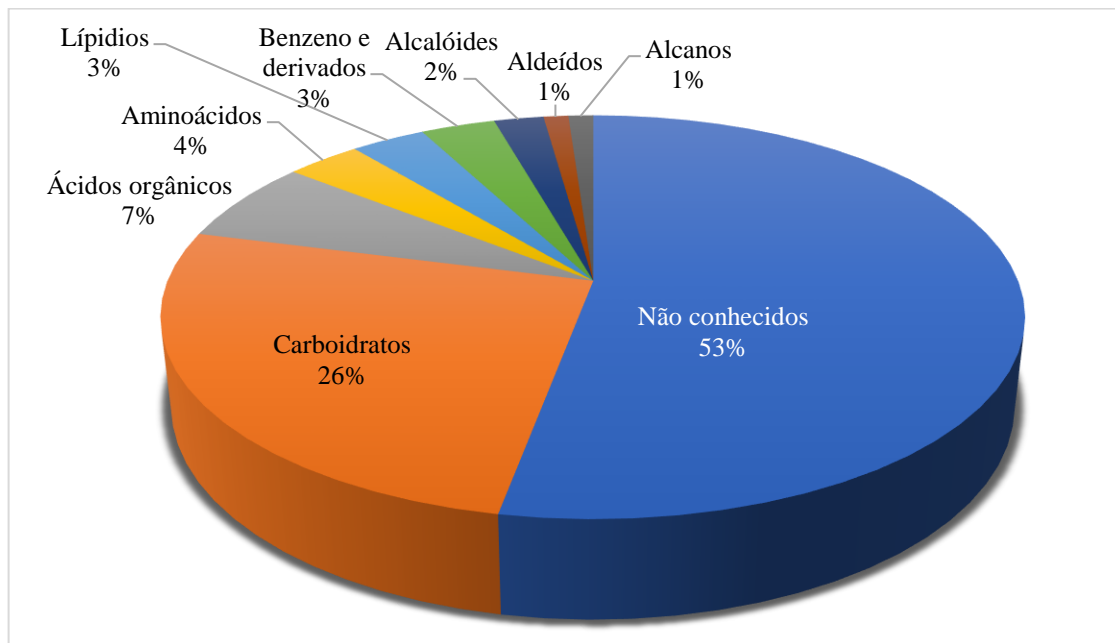
No gráfico estão apresentadas as médias do número de células/g de tecido vegetal macerado \pm desvio padrão em escala logarítmica. [A.] quantificação de cada linhagem na raiz de plântulas de soja (*Glycine max*); [B.] quantificação de cada linhagem na raiz de plântulas de milho (*Zea mays*); [C.] quantificação de cada linhagem no consórcio na raiz de plântulas de soja (*Glycine max*); [D.] quantificação de cada linhagem no consórcio na raiz de plântulas de milho (*Zea mays*). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos com um $p < 0,05$. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparação

múltiplo de TUKEY. O círculo vermelho embaixo do nome da linhagem, refere-se ao subgrupo A₁ do ANI, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e círculos azul ao subgrupo B₂

5.10 Identificação dos exsudatos vegetais e bacterianos por GC-MS

A partir dos 11 tratamentos avaliados nos experimentos de interação de *Methylobacterium* e *Methylorubrum* com plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), foram detectados pela técnica de GC-MS um total de 91 metabólitos. Os metabólitos não conhecidos foram predominantes com abundância de 53%, seguidos por carboidratos (26%) e ácidos orgânicos com 7% (Figura 17). Também, foram detectados aminoácidos, lipídios, benzeno e derivados do benzeno, alcaloides, aldeídos e alcanos.

Figura 17 - Metabólitos identificados nos tratamentos avaliados com plântulas de soja (*Glycine max*) e plântulas de milho (*Zea mays*).



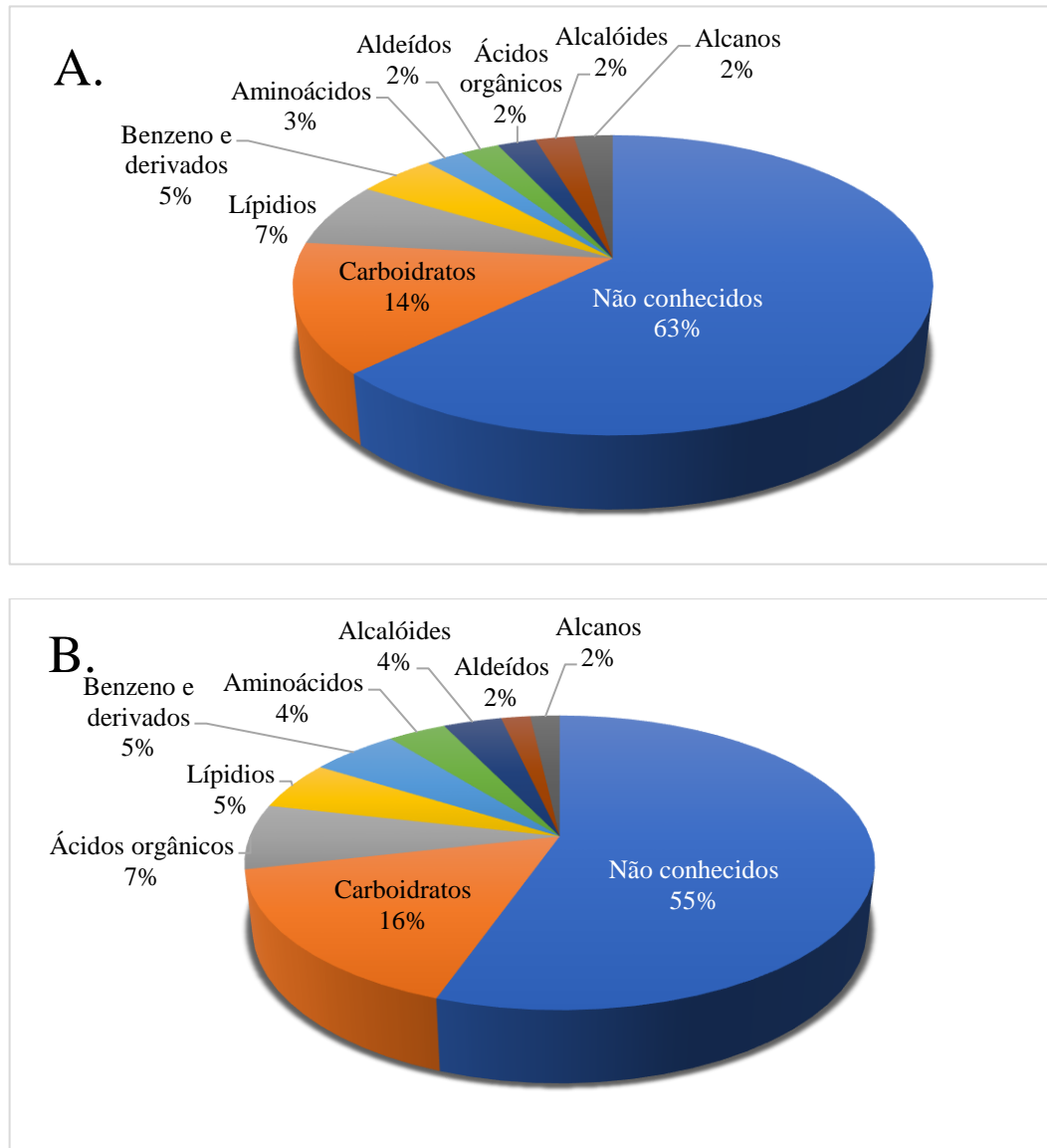
No gráfico, estão apresentados a porcentagem dos diferentes tipos de metabólitos detectados na totalidade dos tratamentos avaliados com soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), sendo que os 91 metabólitos correspondem a somatória de todos os tratamentos.

5.10.1 Identificação dos exsudatos de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*)

Primeiramente, os perfis dos metabólitos presentes nos exsudatos de cada uma das plântulas hospedeiras, sem a presença da bactéria, foram analisados individualmente. Assim, foi possível comparar os exsudatos de plântulas de soja e milho (Figura 18). Foi observado que 63% dos exsudatos de soja foi composto por metabólitos desconhecidos, seguido de 14% de carboidratos, 7% de lipídios, 3% de aminoácidos e 2% de ácidos orgânicos, enquanto o

exsudato de milho foi composto por 55% de metabólitos desconhecidos, seguido de 16% de carboidratos, 7% de ácidos orgânicos, 5% de lipídios e 4% de aminoácidos.

Figura 18 - Metabólitos identificados nos exsudatos radiculares de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).

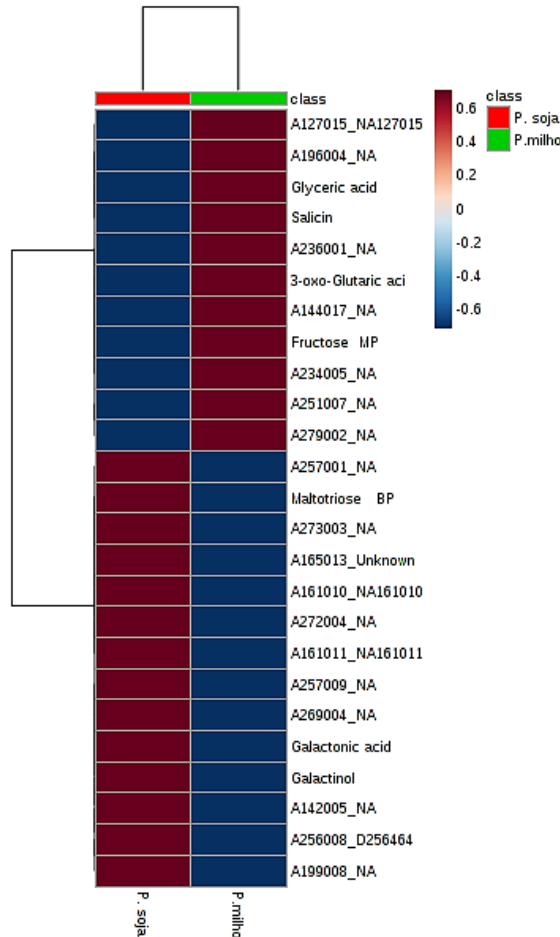


[A.] Classificação dos metabólitos detectados em exsudatos radiculares de plântulas de soja (*Glycine max*). Na figura, estão apresentadas as porcentagens das classes de metabólitos [B.] Classificação dos metabólitos detectados em exsudato radicular de plântulas de milho (*Zea mays*).

A diferença na composição dos exsudatos vegetais, entre as duas plantas hospedeiras, foi observada por meio das análises estatísticas realizadas na plataforma online MetaboAnalyst 4.0 (CHONG et al., 2018). Foram encontrados 26 metabólitos com diferença significativa entre as duas plantas (Apêndice J). Dentre os metabólitos conhecidos, os mais abundantes foram a *salicin*, o *glyceric acid*, *fructose* e o *3-oxo-glutaric acid* em milho, enquanto em soja foram

mais abundantes a *maltotriose*, o *galactonic acid* e o *galactinol* (Figura 19). Além de 7 e 11 metabólitos não identificados que apresentaram maior abundância em milho e soja respectivamente.

Figura 19 *Heatmap* dos 25 metabólitos significativamente diferentes entre plântulas de soja e milho

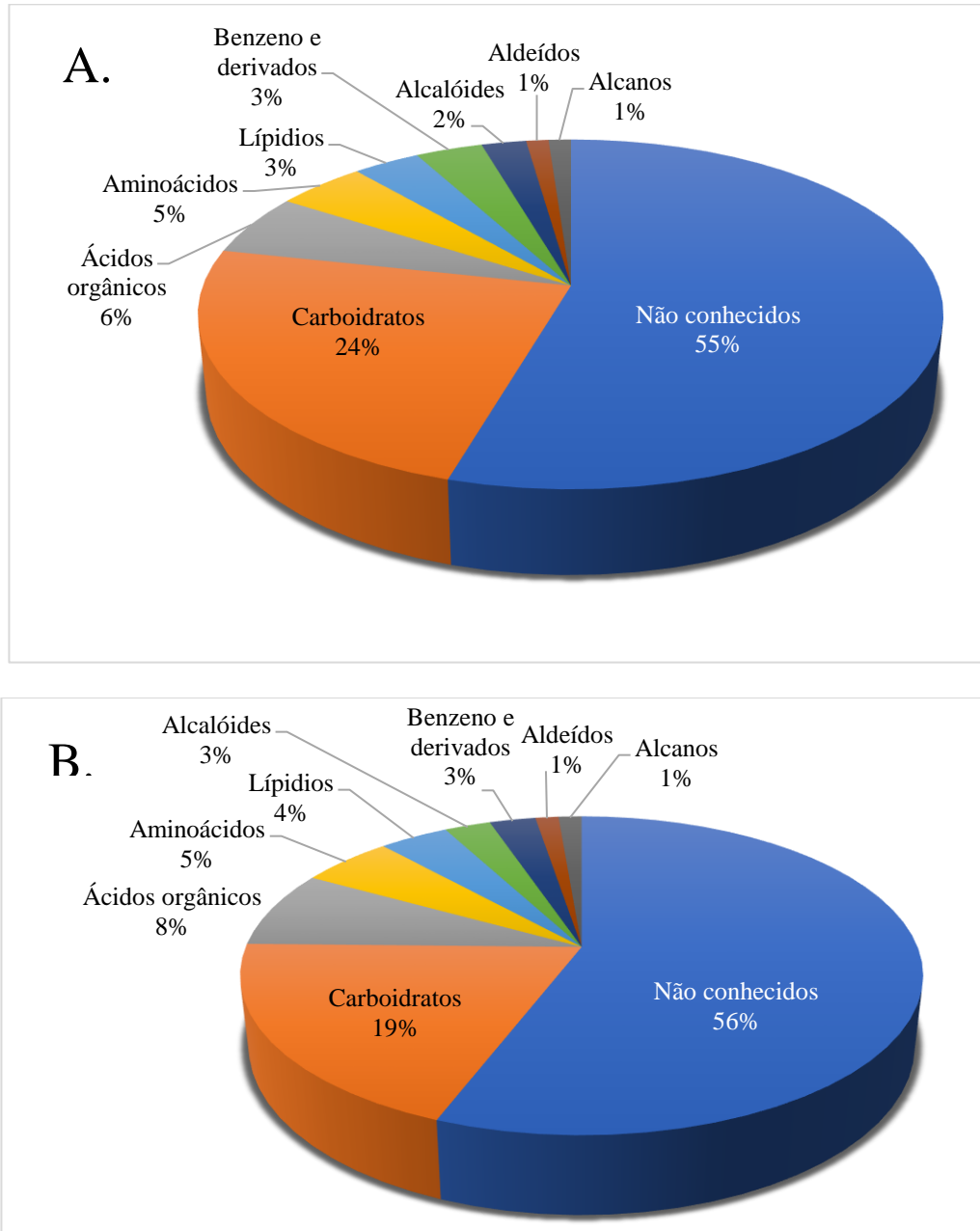


Heatmap dos 25 metabólitos significativamente diferentes entre plântulas de soja e milho. No gráfico, estão apresentadas a média da intensidade dos picos. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*. As diferenças entre os tratamentos foram determinadas por um teste *t*.

5.10.2 Identificação dos exsudatos de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) durante a interação com *Methylobacterium spp.* e *Methylorubrum extorquens*

A análise do perfil dos metabólitos presentes no sobrenadante das interações de *Methylobacterium spp.* e *Methylorubrum extorquens* com as plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) permitiu observar um aumento na quantidade de carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos, em comparação às plântulas sozinhas (Figura 20).

Figura 20 - Metabólitos identificados nos exsudatos de plântulas de soja e milho durante a interação com *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*.



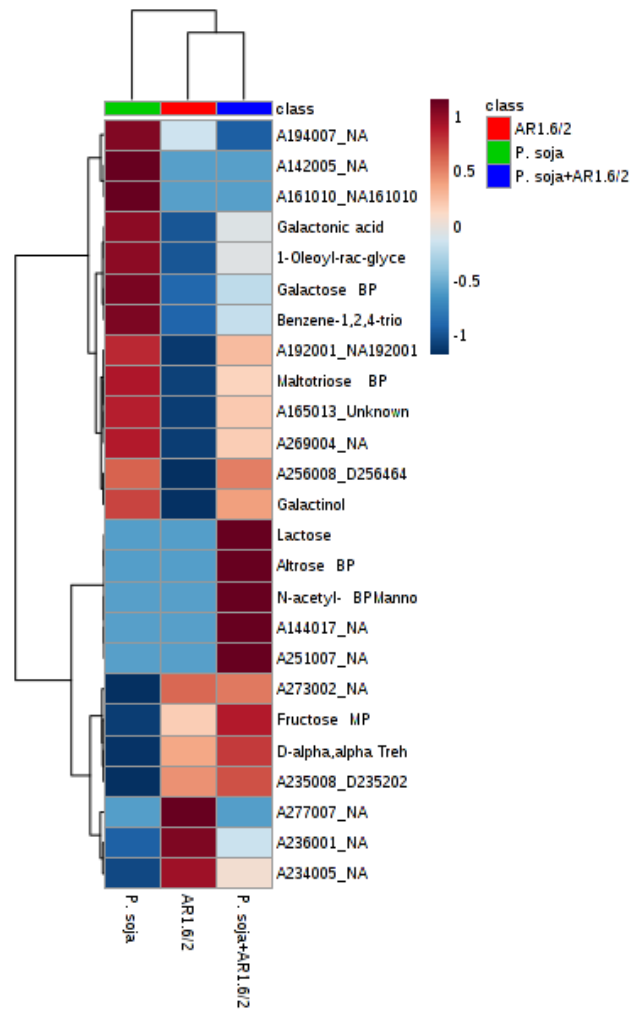
Na figura, estão apresentadas as porcentagens das classes de metabólitos encontrados nos exsudatos de plântulas de soja [A.] (*Glycine max*) e [B.] milho (*Zea mays*) durante a interação com *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*.

Para as análises estatísticas, foram comparados 3 tratamentos: plântulas controle, as plântulas em interação com a bactéria (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6, MP2-3) ou com o consórcio e o controle de crescimento da bactéria (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6, MP2-3) ou do consórcio. Os resultados de cada comparação são apresentados a seguir:

5.10.2.1 Plântulas de soja em interação com *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2

Foi observado que durante a interação de *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2 com a raiz de plântulas de soja, foram produzidos compostos específicos tais como: *lactose*, *altrose*, *N-acetyl-BPMannosamine*, e os compostos não conhecidos A144017 e A251007 (Figura 21 e Tabela 3). Adicionalmente, foi evidenciado que compostos como: A194007, A142005, A161010, *galactonic acid*, *1-oleoyl-rac-glycerol*, *galactose* e *benzene-1,2,4-triol* foram detectados somente em exsudatos da planta sem a bactéria, enquanto compostos como *maltotriosa*, *galactinol*, e os compostos não conhecidos: A165013, A269004, A256008 e A192001 foram detectados tanto nos exsudatos da planta controle como na interação com AR1.6/2, sendo neste último tratamento encontrados em menor quantidade.

Figura 21 - *Heatmap* dos exsudatos identificados durante a interação de *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2 com plântulas de soja



Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

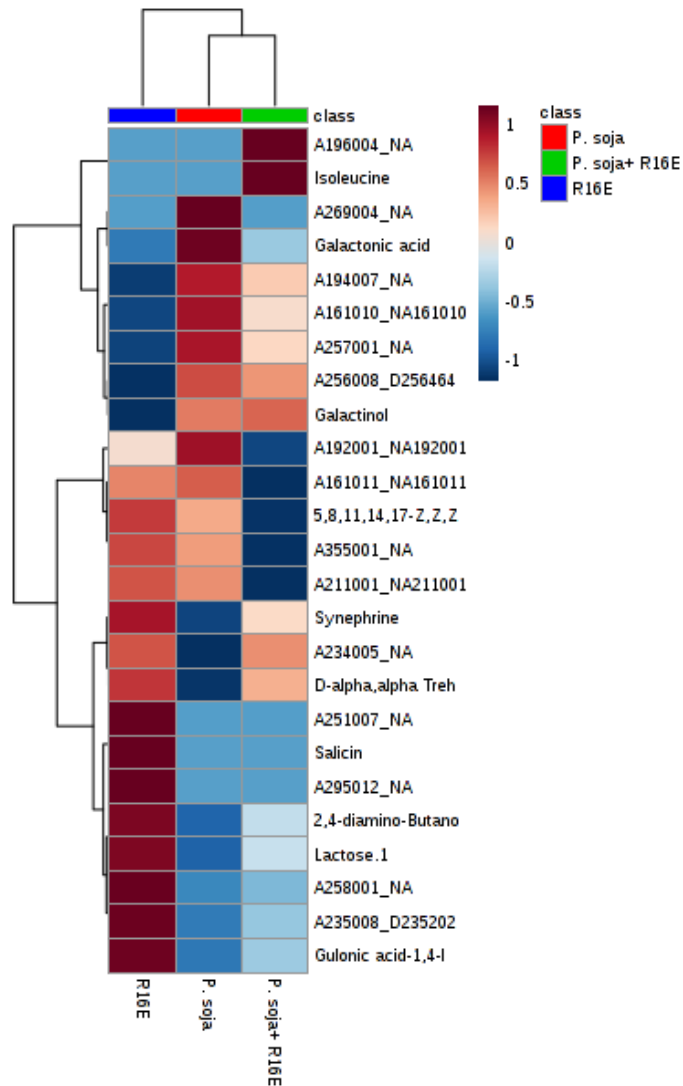
Por último, foi possível identificar que a *fructose*, a *D-alpha, alpha trehalose* e o composto não conhecido A235008 são produzidos por *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2, pois foi presente na cultura dessa bactéria, e a sua abundância aumenta durante a interação com as raízes de plântulas de soja (Figura 21 e Tabela 3).

5.10.2.2 Plântulas de soja em interação com *Methylobacterium fujisawaense* R16E

Foi observado que os compostos isoleucina e A196004 são produzidos exclusivamente durante a interação de plântulas de soja com a linhagem R16E (Figura 22 e Tabela 3), enquanto os metabólitos *galactonic acid* e A269004 são detectados apenas nos exsudatos das plântulas de soja sem inoculação. Foi observado que o *galactinol* é exsudado pelas raízes das plântulas de soja e a sua abundância aparentemente se mantém durante a interação. A partir das análises estatísticas, também foi possível observar que os compostos não conhecidos A194007, A161010, A257001 e A256008 apresentam uma menor abundância durante a interação.

Foram identificados compostos, tais como *salicin*, *2,4-diamino-Butanoic acid*, *lactose*, *gulonic acid-1,4-lactone* e outros compostos não conhecidos (Figura 22 e Tabela 3) que foram produzidos apenas pela linhagem R16E. A *D-alpha, alpha trehalose*, também foi produzida pela linhagem R16E, e a diferente do que foi observado para a linhagem AR1/6/2 sua abundância diminui durante a interação.

Figura 22 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de *Methylobacterium fujisawaense* R16E com plântulas de soja



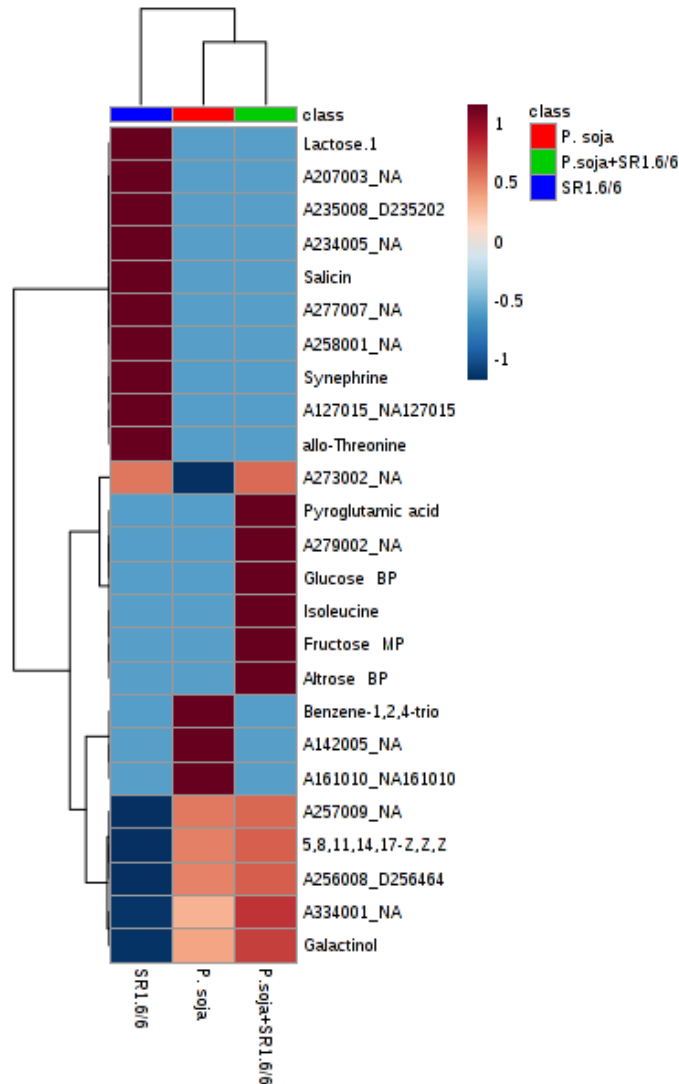
Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

5.10.2.3 Plântulas de soja em interação com *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

Na interação das plântulas de soja com a linhagem SR1.6/6 foram observados os metabólitos *pyroglutamic acid*, *glucose*, *isoleucine*, *fructose*, *altrose*. e o composto não conhecido A279002 (Figura 23 e Tabela 3). De forma similar, foi evidenciado que o *benzene-1,2,4-triol* e os compostos não conhecidos A142005 e A161010 são somente detectados na plântula sem inoculação.

Adicionalmente, foram detectados os compostos *galactinol*, *5,8,11,14,17-(Z,Z,Z,Z)-n-ecosapentaenoic acid*, A256008, A334001 e A257009 nos exsudatos de plântulas de soja e em maior abundância durante a interação. Dentre os compostos produzidos pela linhagem SR1.6/6, encontraram-se *Lactose*, *Salicin*, *allo-threonine* e outros compostos não conhecidos.

Figura 23 - *Heatmap* dos exsudatos identificados durante a interação de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com plântulas de soja

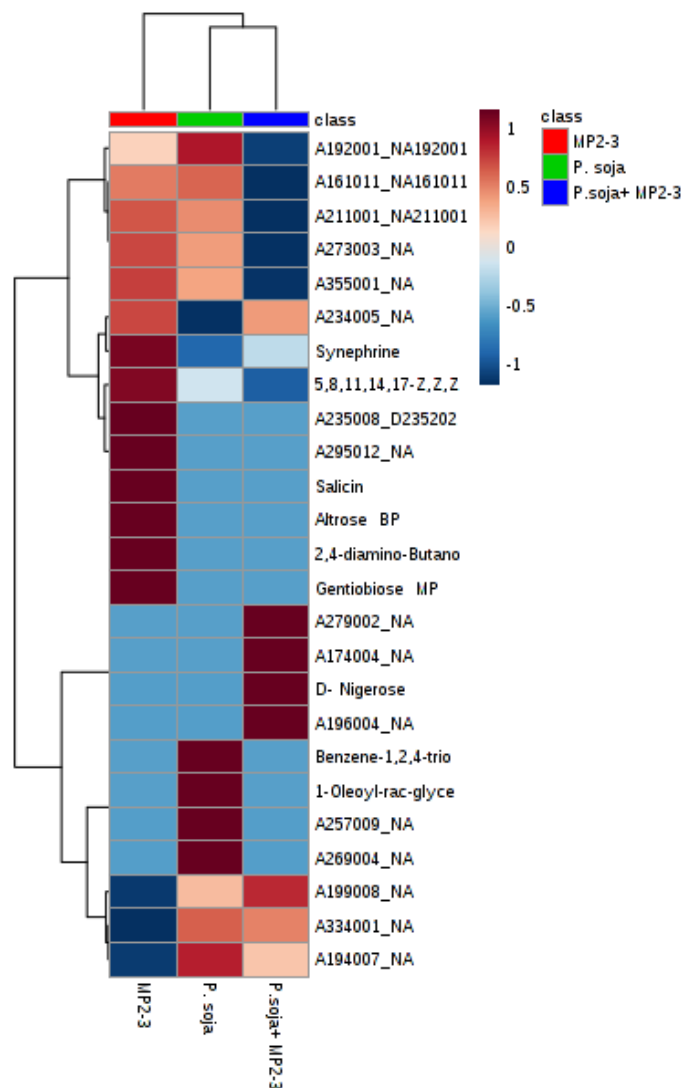


Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

5.10.2.4 Plântulas de soja em interação com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3

Durante a interação da linhagem MP2-3 com raízes de plântulas de soja, foi evidenciada a presença do açúcar *nigerose* e dos compostos não conhecidos A279002, A174004e A196004. Adicionalmente, as análises de agrupamento, permitiram observar que os metabólitos *benzene-1,2,4-triol*, *1-oleoyl-rac-glycerol*, A257009, A269004 e A194007 somente são detectados nas plantas sem a presença da bactéria (Figura 24 e Tabela 3).

Figura 24 - *Heatmap* dos exsudatos identificados durante a interação de *Methylobacterium hispanicum* MP2-3 com plântulas de soja



Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

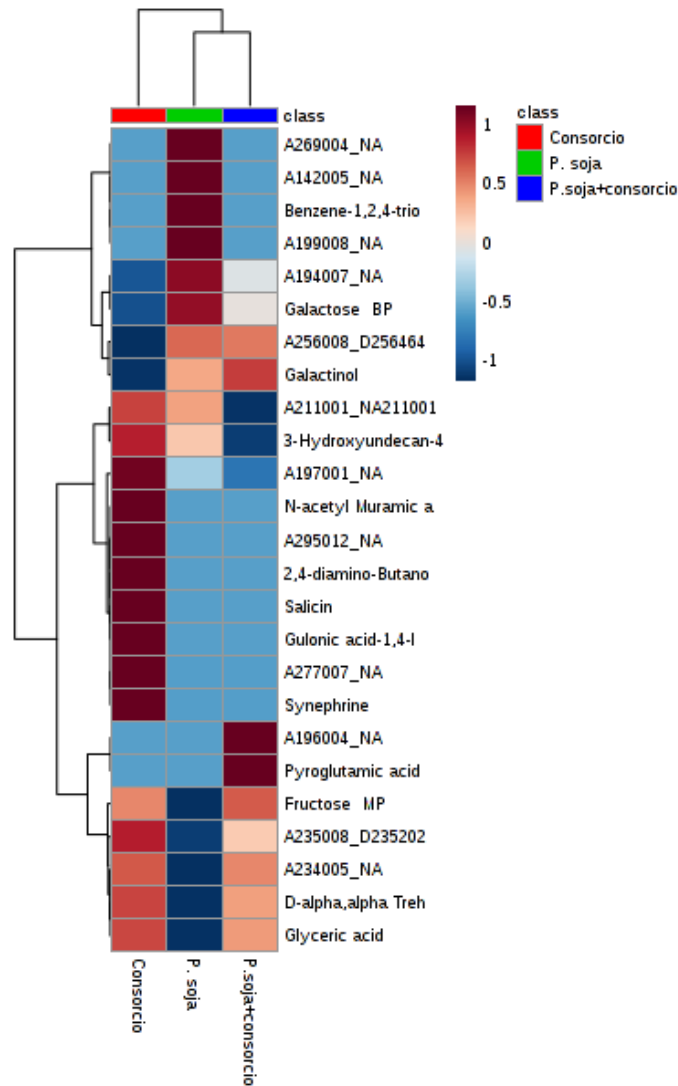
Por outro lado, foi possível identificar alguns compostos produzidos pela linhagem MP2-3, entre eles, *salicin*, *altrose* e *gentibiose*,(carboidratos) o *5,8,11,14,17-(Z,Z,Z,Z,Z)-n-eicosapentaenoic acid* (lipídio) e o ácido carboxílico *2,4-diamino-Butanoic acid*, além disso foram detectados outros compostos não conhecidos (Figura 24 e Tabela 3).

5.10.2.5 Plântulas de soja em interação com o consórcio bacteriano

Durante a interação do consórcio bacteriano com raízes de plântulas de soja, foi identificado o aminoácido *pyroglutamic acid* e o composto A196004, moléculas que somente são detectadas na interação (Figura 25 e Tabela 3). Adicionalmente, foram identificados os compostos *benzene-1,2,4-triol*, *galactose*, A269004, A142005, A199008 e A194007 que só são detectados nas plântulas sem inoculação. Também, foi observado que o *galactinol* é exsudado pela planta e a sua abundância aumenta na presença da bactéria (interação).

Da mesma forma, foram identificados os compostos *2,4-diamino-Butanoic acid*, *Salicin* *Gulonic acid-1,4-lactone*, e outras moléculas não conhecidas que são produzidas pelo consórcio, assim como a *fructose* que aumenta durante a interação com a planta. Também, foi observado que a *D-alpha,alpha trehalose* e o *Glyceric acid* são produzidos pelo consórcio e a sua abundância diminui durante a interação com plântulas de soja (Figura 25 e Tabela 3).

Figura 25 - *Heatmap* dos exsudatos identificados durante a interação do consórcio bacteriano com plântulas de soja



Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

Tabela 3 - Resumo dos metabólitos com diferença significativa nos exsudatos de plântulas de soja (*Glycine max*) durante a interação com *Methylobacterium extorquens* e *Methylobacterium* spp.

Condição	Plântulas de soja inoculadas com				
	AR1.6/2	R16E	SR1.6/6	MP2-3	Consórcio
Compostos detectados só na interação	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactose</i> • <i>Altrose</i> • <i>N-acetyl-BPMannosamine</i> • <i>A144017</i> • <i>A251007</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A196004</i> • <i>Isoleucine</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pyroglutamic acid</i> • <i>A279002</i> • <i>Glucose</i> • <i>Isoleucine</i> • <i>Fructose</i> • <i>Altrose</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A279002</i> • <i>A174004</i> • <i>D-nigerose</i> • <i>A196004</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pyroglutamic acid</i> • <i>A196004</i>
Compostos detectados só nas plântulas de soja e que não são detectados durante a interação	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A194007</i> • <i>A142005</i> • <i>A161010</i> • <i>Galactonic acid</i> • <i>1-Oleoyl-rac-glycerol</i> • <i>Galactose</i> • <i>Benzene-1,2,4-triol</i> • 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A269004</i> • <i>Galactonic acid</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Benzene-1,2,4-triol</i> • <i>A142005</i> • <i>A161010</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Benzene-1,2,4-triol</i> • <i>1-Oleoyl-rac-glycerol</i> • <i>A257009</i> • <i>A269004</i> • <i>A194007</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A269004</i> • <i>A142005</i> • <i>Benzene-1,2,4-triol</i> • <i>A199008</i> • <i>A194007</i> • <i>Galactose</i>
Compostos exsudados pelas plântulas que diminuem sua abundância na interação	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A192001</i> • <i>Maltotriose</i> • <i>A165013</i> • <i>A269004</i> • <i>A256008</i> • <i>Galactinol</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A194007</i> • <i>A161010</i> • <i>A257001</i> • <i>A256008</i> • <i>Galactinol*</i> 	N.A	N.A	N.A

(continua)

Condição	Plântulas de soja inoculadas com				
	AR1.6/2	R16E	SR1.6/6	MP2-3	Consórcio
Compostos exsudados pelas plântulas que aumentam sua abundância durante a interação	N.A	N.A	<ul style="list-style-type: none"> A257009 5,8,11,14,17-(Z,Z,Z,Z)-n-Eicosapentaenoic acid A256008 A334001 Galactinol 	<ul style="list-style-type: none"> A199008 	<ul style="list-style-type: none"> Galactinol
Compostos produzidos pela bactéria	<ul style="list-style-type: none"> A277007 A236001 A234005 	<ul style="list-style-type: none"> A251007 Salicin A295012 2,4-diamino-Butanoic acid Lactose A258001 A235008 Gulonic acid-1,4-lactone 	<ul style="list-style-type: none"> Lactose A207003 A235008 A234005 Salicin A277007 A258001 A127015 allo-Threonine 	<ul style="list-style-type: none"> 5,8,11,14,17-(Z,Z,Z,Z)-n-Eicosapentaenoic acid A235008 A295012 Salicin Altrose 2,4-diamino-Butanoic acid Gentibiose 	<ul style="list-style-type: none"> N-acetyl muramic acid A295012 2,4-diamino-Butanoic acid Salicin Gulonic acid-1,4-lactone A277007
Compostos produzidos pela bactéria que aumentam na interação	<ul style="list-style-type: none"> Fructose D-alpha,alpha Trehalose A235008 	N.A	N.A	N.A	<ul style="list-style-type: none"> Fructose

(Conclusão)

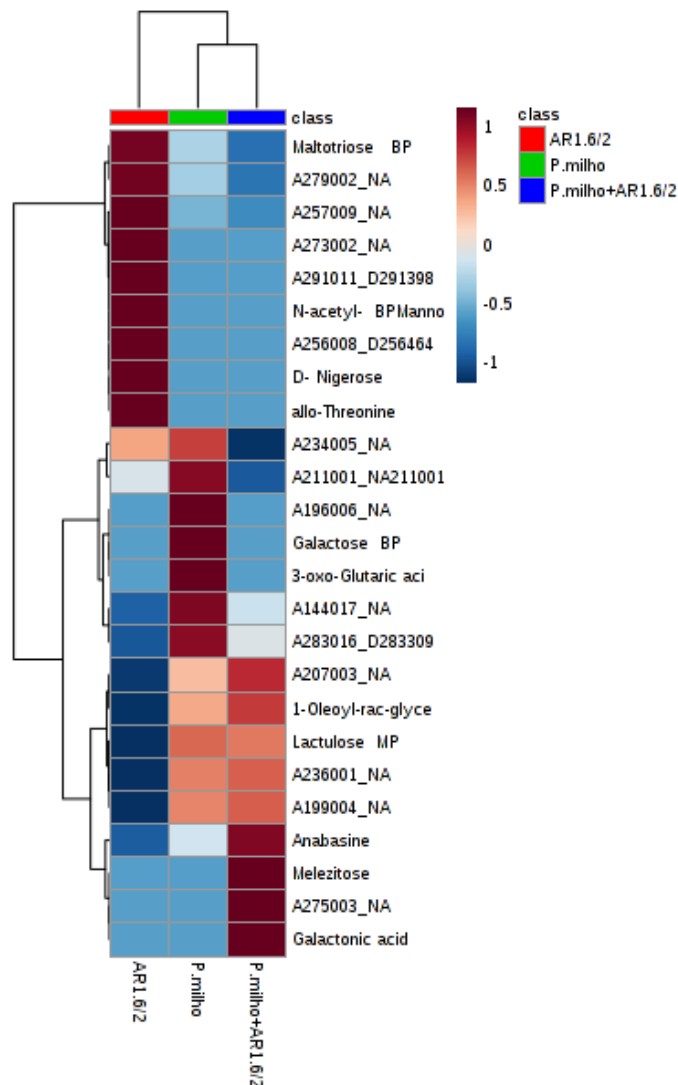
Condição	Plântulas de soja inoculadas com				
	AR1.6/2	R16E	SR1.6/6	MP2-3	Consórcio
Compostos produzidos pela bactéria que diminuem durante a interação	N.A	<ul style="list-style-type: none">• <i>Syneprine</i>• <i>A234005</i>• <i>D-alpha,alpha Trehalose</i>	N.A	N.A	<ul style="list-style-type: none">• <i>D-alpha,alpha Trehalose</i>• <i>Glyceric acid</i>

[N.A] Não aplica; [*] Metabólitos sem variação na abundância durante a interação

5.10.2.6 Plântulas de milho em interação com *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2

Os compostos *melezitose*, *galactonic acid* e *anabasine*, foram detectados exclusivamente durante a interação de *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2 com plântulas de milho. Também, foi observado que a *galactose*, o *3-oxo-glutaric acid*, e outras moléculas não conhecidas foram detectadas apenas nos exsudatos das raízes das plântulas de milho. O composto *1-oleoyl-rac-glycerol* foi detectado tanto nos exsudatos de plântulas sem inocular como durante a interação, sendo que nesta última se encontrou em maior abundância (Figura 26 e Tabela 4).

Figura 26 - *Heatmap* dos exsudatos identificados durante a interação de *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2 com plântulas de milho.



Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

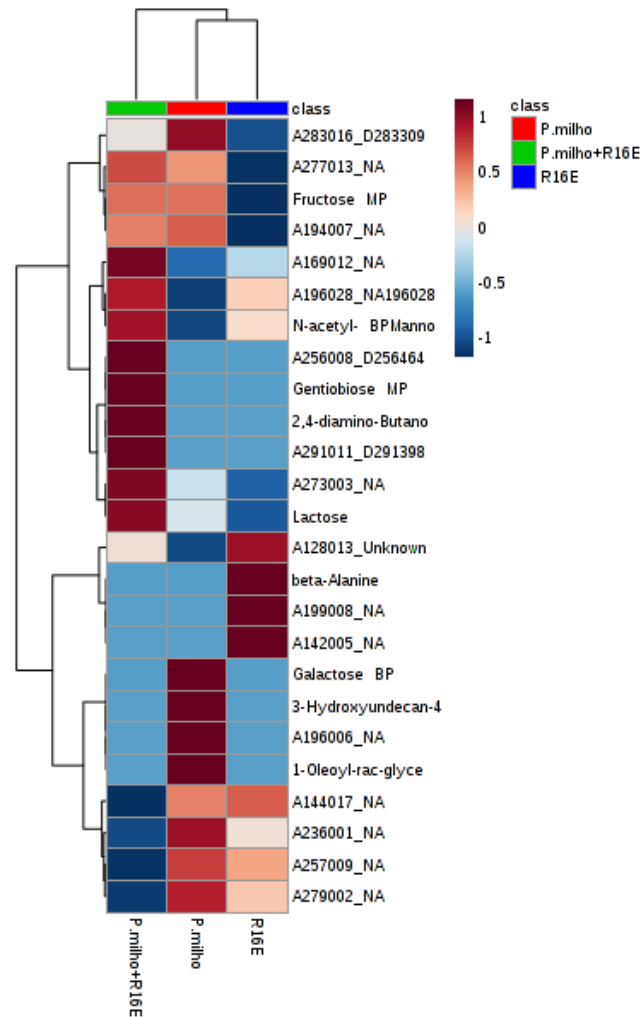
Os metabólitos *maltotriose*, *D-nigerose*, *N-acetyl-BP mannosamine* (carboidratos), *allo-threonine* (aminoácido) e outras moléculas não conhecidas (Figura 26 e Tabela 4) foram observados na cultura da bactéria *M. extorquens* AR1.6/2.

5.10.2.7 Plântulas de milho em interação com *Methylobacterium fujisawaense* R16E

Foram identificados metabólitos presentes exclusivamente na interação de *Methylobacterium fujisawaense* R16E com plântulas de milho, os quais incluem: *gentiobiose*, *2,4-diamino-butanoic acid*, *lactose*, e as moléculas não conhecidas A169012, A256008, A2901011, A273003. O carboidrato *fructose*, foi observado nos exsudatos de plântulas sem a presença da bactéria, assim como durante a interação, com uma abundância similar nos dois tratamentos (Figura 27 e Tabela 4).

No tratamento das plântulas de milho sem inoculação, foram identificados os compostos *galactose*, *3-hydroxyundecan-4-one*, *1-oleoyl-rac-glycerol*, A283016 e A196006. Da mesma forma, o aminoácido *beta-alanine* e o carboidrato *N-acetyl- BP mannosamine*, foram detectados nos exsudatos da linhagem R16E, sendo que o último foi detectado em maior abundância durante a interação (Figura 27 e Tabela 4).

Figura 27 - Heatmap dos exsudatos identificados durante a interação de *Methylobacterium fujisawaense* R16E com plântulas de milho.



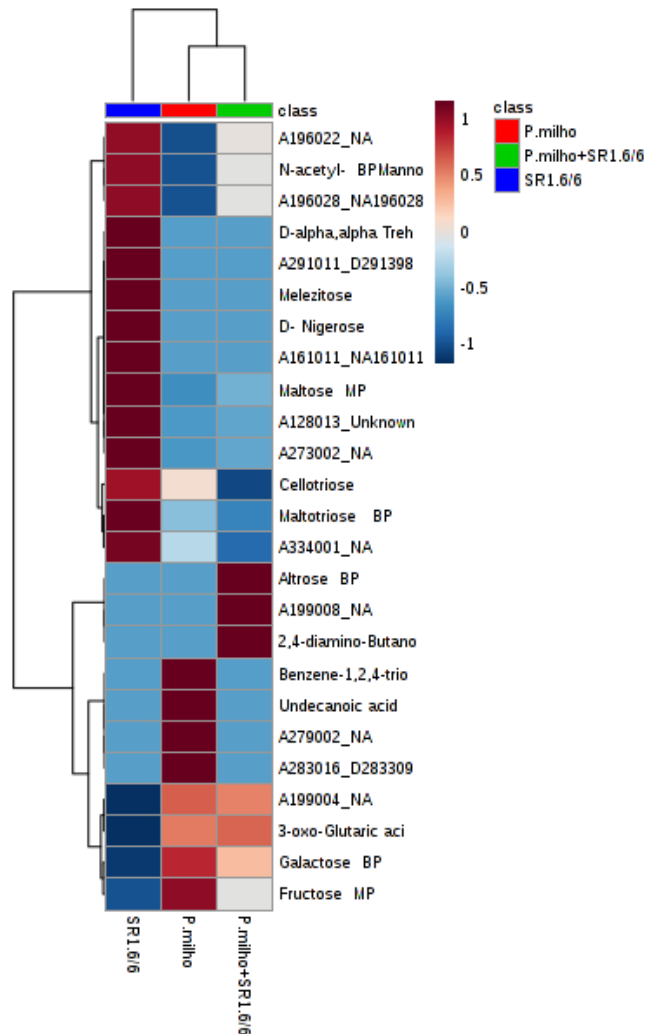
Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

5.10.2.8 Plântulas de milho em interação com *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

Foram identificados os compostos *altrose*, *2,4-diamino-butanoic acid* e A199008, exclusivamente durante a interação das raízes de plântulas de milho com a linhagem SR1.6/6. De forma semelhante, foram detectados compostos como *benzene 1,2,4 triol*, *undecanoic acid* e *fructose*, que só estavam presentes em plântulas de milho. Adicionalmente, foi observado que a *galactose* é exsudada pelas plântulas de milho e a sua abundância diminui durante a interação com a linhagem SR1.6/6. Contrariamente o *3-oxo-glutaric acid* é exsudado pelas raízes e a sua abundância é maior durante a interação (Figura 28 e Tabela 4).

Alguns dos compostos produzidos pela linhagem SR1.6/6 foram identificados. Dentre eles destacam-se: *N-acetyl-BPMannosamine*, *D-alpha,alpha trehalose*, *melezitose*, *D-nigerose*, *maltose*, *maltotriose*, e outras moléculas não conhecidas (Figura 28 e Tabela 4).

Figura 28 - *Heatmap* dos exsudatos identificados durante a interação de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 com plântulas de milho.



Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

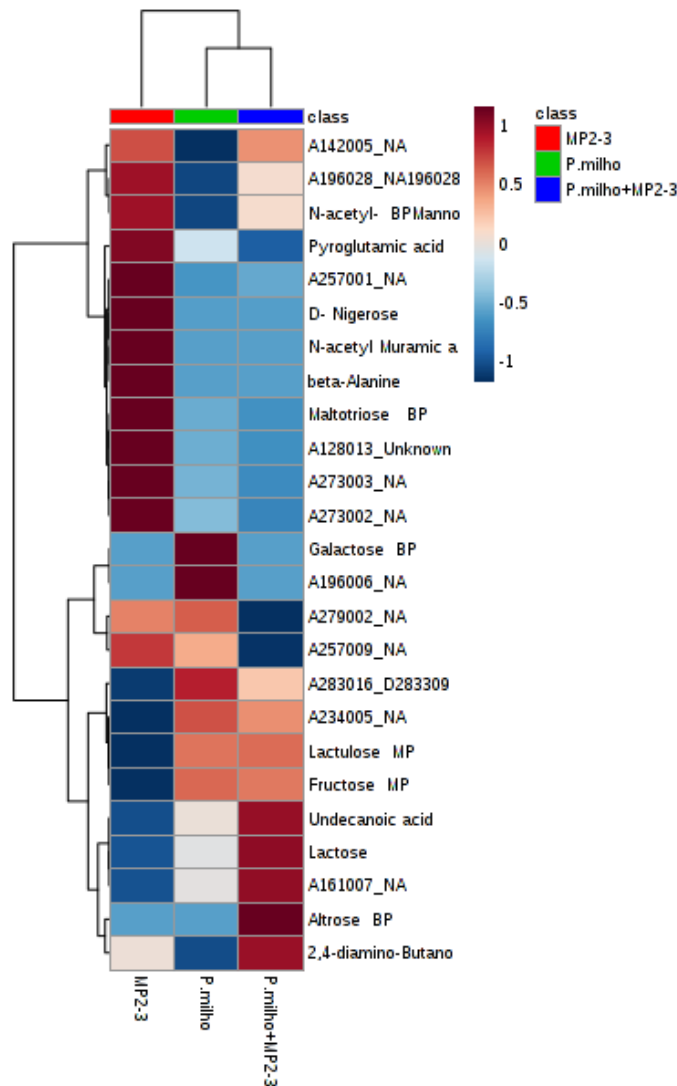
5.10.2.9 Plântulas de milho em interação com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3

Foi observado que os metabólitos *undecanoic acid*, *lactose*, *altrose*, *2,4-diamino-butanoic acid* e A161007 foram detectados exclusivamente durante a interação das plântulas de milho com a linhagem MP2-3. O carboidrato *galactose* foi identificado somente no tratamento das plântulas de milho, enquanto os carboidratos *fructose* e *lactulose* foram detectados tanto

nas plântulas de milho quanto na interação, aparentemente com a mesma abundância (Figura 29 e Tabela 4).

Somado a isso, foi possível identificar os metabólitos produzidos pela linhagem MP2-3, entre os quais estão, *pyroglutamic acid*, *D-nigerose*, *N-acetyl muramic acid*, *beta-alanine* e *maltotriose*. Além disso, o carboidrato *N-acetyl-BP mannosamine* foi detectado no tratamento da linhagem MP2-3 e com menor abundância durante a interação (Figura 29 e Tabela 4).

Figura 29 - *Heatmap* dos exsudatos identificados durante a interação de *Methylobacterium hispanicum* MP2-3 com plântulas de milho.



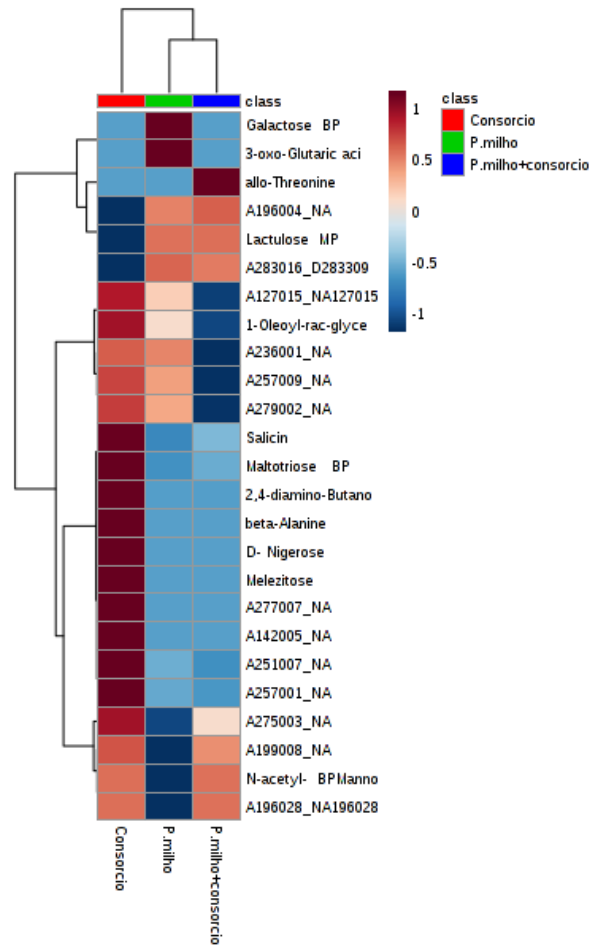
Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

5.10.2.10 Plântulas de milho em interação com o consórcio bacteriano

Foi evidenciado, que o aminoácido *allo-threonine* está presente unicamente no tratamento da interação do consórcio bacteriano com as plântulas de milho. Também foi observado que os metabólitos *galactose*, *3-oxo-Glutaric acid* e outras moléculas não identificadas, foram mais abundantes ou exclusivas nos exsudatos de plântulas de milho sem bactéria (Figura 30 e Tabela 4).

Os compostos *salicin*, *maltotriose*, *d-nigerose*, *melezitose*, *2,4-diamino-butanoic acid* e *beta alanine* foram detectados no consórcio bacteriano. Além disso, os metabólitos A275003, A199008, A196028 e o carboidrato *N-acetyl-BP mannosamine* foram detectados apenas na presença do consórcio, não sendo detectados nos exsudatos exclusivos planta. Por outro lado, os metabólitos A127015, A236001, A257009, A279002 e 1-Oleoyl-rac-glycerol foram detectados na cultura do consórcio e nos exsudatos da planta, mas foram ausentes na interação consórcio-plântulas (Figura 30)

Figura 30 - *Heatmap* dos exsudatos identificados durante a interação do consórcio bacteriano com plântulas de milho.



Na figura, estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos 25 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e teste *Fisher's* LDS. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do *Heatmap* foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de *clustering* o *Ward's linkage*.

Tabela 4 - Resumo dos metabólitos com diferença significativa nos exsudatos de plântulas de milho (*Zea mays*) durante a interação com *Methylobacterium extorquens* e *Methylobacterium* spp.

(Continua)

Condição	Plântulas de milho inoculadas com				
	AR1.6/2	R16E	SR1.6/6	MP2-3	Consórcio
Compostos detectados só na interação	<ul style="list-style-type: none"> • Melezitose • Galactonic acid • Anabasine 	<ul style="list-style-type: none"> • Gentiobiose • 2,4-diamino-Butanoic acid • Lactose • A169012 • A256008 • A2901011 • A273003 • Fructose * • 	<ul style="list-style-type: none"> • Altrose • 2,4-diamino-Butanoic acid • A199008 	<ul style="list-style-type: none"> • Undecanoic acid • Lactose • Altrose • 2,4-diamino-Butanoic acid • A161007 	<ul style="list-style-type: none"> • allo-Threonine
Compostos detectados só nas plântulas de milho e que não são detectados durante a interação	<ul style="list-style-type: none"> • Galactose • 3-oxo-Glutaric acid • A211001 • A196006 • A144017 • A283016 	<ul style="list-style-type: none"> • Galactose • 3-Hydroxyundecan-4-one • 1-Oleoyl-rac-glycerol • A283016 • A196006 	<ul style="list-style-type: none"> • Benzene 1,2,4 triol • Undecanoic acid • A279002 • A283016 • Fructose 	<ul style="list-style-type: none"> • Galactose • A196006 • Lactulose * • Fructose* • A234005 • A283016 	<ul style="list-style-type: none"> • Galactose • 3-oxo-Glutaric acid • A196004* • Lactulose* • A283016*
Compostos exsudados pelas plântulas que diminuem sua abundância na interação	N.A	N.A	<ul style="list-style-type: none"> • Galactose 	N.A	N.A

(Continua)

Condição	Plântulas de milho inoculadas com				
	AR1.6/2	R16E	SR1.6/6	MP2-3	Consórcio
Compostos exsudados pela planta que aumentam sua abundância durante a interação	<ul style="list-style-type: none"> • <i>1-Oleoyl-rac-glycerol</i> • A207003 	N.A	<ul style="list-style-type: none"> • <i>3-oxo-Glutaric acid</i> 	N.A	N.A
Compostos produzidos pela bactéria	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Maltotriose</i> • <i>N-acetyl-BPMannosamine</i> • <i>D-nigerose</i> • <i>allo-Threonine</i> • A279002 • A257009 • A273002 • A291011 • A256008 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Beta alanine</i> • A128013 • A199008 • A142005 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>N-acetyl-BPMannosamine</i> • <i>D-alpha,alpha-Trehalose</i> • <i>Melezitose</i> • <i>D-nigerose</i> • <i>Maltose</i> • <i>Maltotriose</i> • A196022 • A196028 • A291011 • A161011 • A128013 • A273002 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pyroglutamic acid</i> • <i>D-nigerose</i> • <i>N-acetyl Muramic acid</i> • <i>Beta alanine</i> • <i>Maltotriose</i> • A128013 • A273002 • A273003 • A142005 • A196028 • A257001 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salicin</i> • <i>Maltotriose</i> • <i>2,4-diamino-Butanoic acid</i> • <i>Beta alanine</i> • <i>D-nigerose</i> • <i>Melezitose</i> • A277007 • A142005 • A251007 • A257001
Compostos produzidos pela bactéria que aumentam na interação	N.A	<ul style="list-style-type: none"> • <i>N-acetyl- BP Mannosamine</i> • A196028 	N.A	N.A	N.A

Condição	Plântulas de milho inoculadas com				
	AR1.6/2	R16E	SR1.6/6	MP2-3	Consórcio
Compostos produzidos pela bactéria que diminuem durante a interação	N.A	N.A	N.A	<ul style="list-style-type: none"> • <i>N-acetyl- BP</i> • <i>Mannosamine</i> • <i>A142005</i> • <i>A192008</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>N-acetyl- BP</i> • <i>Mannosamine</i> • <i>A275003</i> • <i>A196028*</i> • <i>A199008*</i>

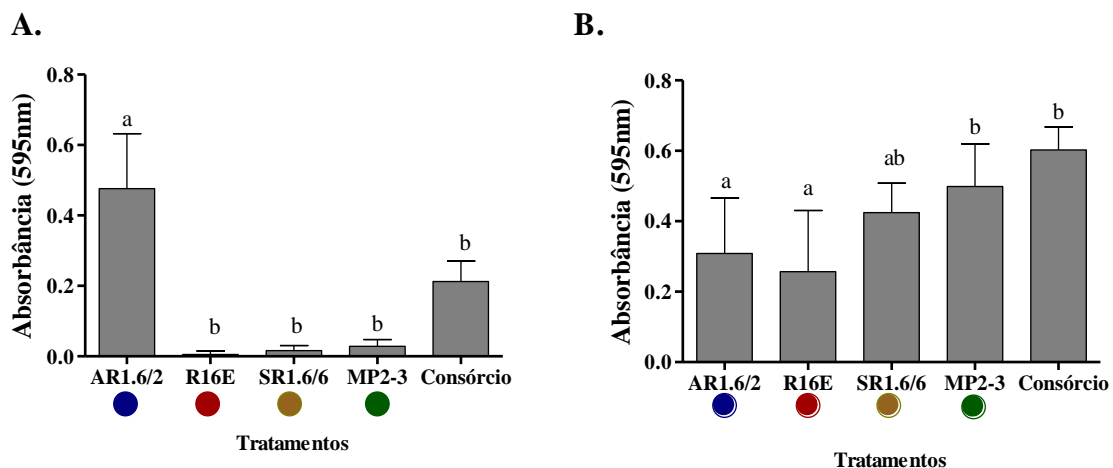
[N.A] Não aplica; [*] Metabólitos sem variação na abundância durante a interação

5.11 Produção de biofilme por *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* *in vitro*

Com base no padrão de crescimento observado das linhagens de *Methylobacterium* e de *Methylobacterium extorquens* nas raízes de plântulas de soja e milho (item 5.8), foi formulada a hipótese de que a produção de biofilme poderia estar relacionada com a colonização da planta e que os exsudatos vegetais podem afetar a sua produção. Assim, a produção de biofilme por *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* foi avaliada após 4 dias de crescimento no meio SPW. Foi observado que a linhagem AR1.6/2 produziu a maior quantidade de biofilme ($p < 0,05$), em relação às outras linhagens e ao consórcio (Figura 31 A).

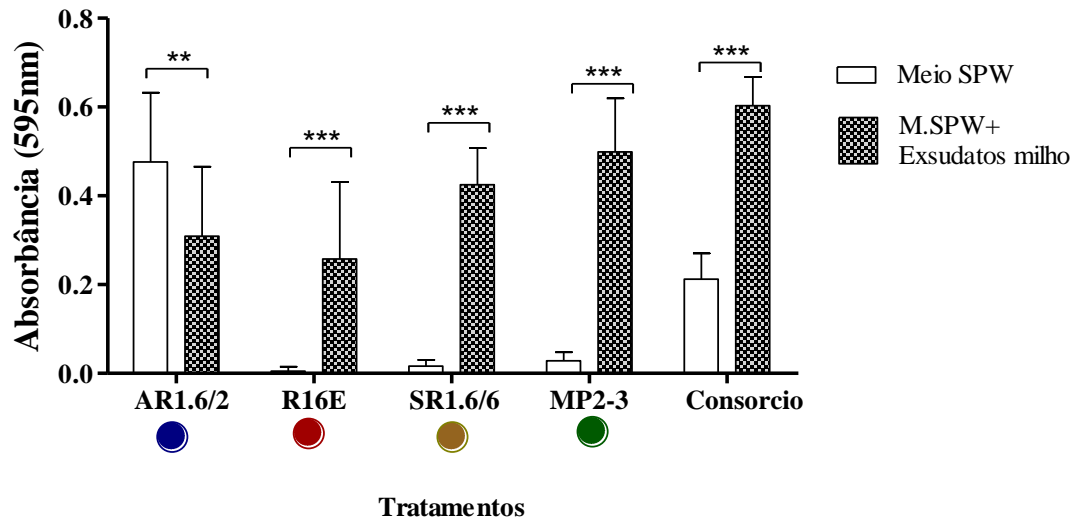
Por outro lado, quando foi avaliada a produção de biofilme das linhagens em meio SPW suplementado com os exsudatos de plântulas de milho. Foi observado que todas as linhagens produziram biofilme, sendo que a linhagem MP2-3 e o consórcio foram os que apresentaram a maior produção ($p < 0,05$) em relação às outras linhagens (Figura 31, B). De forma geral, as bactérias avaliadas apresentaram uma maior produção de biofilme no meio de cultura suplementado com os exsudatos de milho (Figura 31). Entretanto, embora *M. extorquens* AR1.6/2 tenha sido a linhagem que produziu mais biofilme em meio SPW, a suplementação com os exsudatos das raízes de plântulas de milho, reduziu significativamente a sua capacidade de formação de biofilme (Figura 32).

Figura 31 - Produção de biofilme por *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*.



[A.] Produção de biofilme em meio de cultura SPW. [B.] Produção de biofilme na presença de exsudatos de plântulas de milho (*Zea mays*). No gráfico observa-se a produção de biofilme como a média da absorbância a D.O. $595\text{nm} \pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos com um $p < 0,05$. As diferenças foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltiplo de *TUKEY*. O círculo vermelho embaixo do nome da linhagem, refere-se ao subgrupo A₁ do ANI, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e círculos azul ao subgrupo B₂

Figura 32 - Comparação da produção de biofilme por *Methylobacterium* spp., e *Methylorubrum extroquens* em meio SPW e em meio suplementado com exsudatos de plântulas de milho.



Na figura apresenta-se produção de biofilme como a média da absorbância a D.O. 595nm \pm desvio padrão. A diferenças, foram determinadas por um *t-test* para amostras não pareadas. $p^{**}<0,01$; $p^{***}<0,001$. O círculo vermelho embaixo do nome da linhagem, refere-se ao subgrupo A₁ do ANI, círculo amarelo indica que a linhagem pertence ao subgrupo A₂, círculo verde indica que pertence ao subgrupo B₁ e círculos azul ao subgrupo B₂

5 DISCUSSÃO

As espécies do gênero *Methylobacterium*, podem ser encontradas em associação com diferentes espécies vegetais (ARAÚJO et al., 2002; OMER; TOMBOLINI; GERHARDSON, 2004) com as quais podem estabelecer uma interação do tipo endofítica ou epifítica (ARAÚJO et al., 2015). Durante essa interação, *Methylobacterium* pode promover o crescimento vegetal, proteger a planta contra patógenos, aumentar a taxa de fotossíntese, reduzir o estresse e outros benefícios (BOGAS et al., 2016; DOURADO et al., 2015; LACAVALA et al., 2006; POONGUZHALI; MADHAIYAN; YIM, 2008).

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento da interação entre os membros do gênero *Methylobacterium* e a planta hospedeira ainda não são muito bem entendidos, mas acredita-se que é um processo ativo (HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008), no qual os exsudatos vegetais desenvolvem um papel fundamental na atração de linhagens específicas de *Methylobacterium* (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012). Assim, o presente trabalho foi realizado com a finalidade de identificar possíveis estratégias utilizadas por *Methylobacterium* e *Methylorubrum extorquens*, durante a interação com plântulas de soja (*Glycine max*) e de milho (*Zea mays*), assim como, identificar compostos presentes nos exsudatos radiculares que são afetados pela interação

Assim, considerando que, durante as interações microbianas existe uma competição por recursos nutricionais, onde, taxas de crescimento rápido podem estar relacionadas com a assimilação eficiente de substratos limitantes, deixando-os indisponíveis para outros microorganismos (HIBBING et al., 2010; LITCHMAN; EDWARDS; KLAUSMEIER, 2015), espera-se que bactérias com maior taxa de crescimento, explorando de forma mais eficiente os recursos nutricionais, sejam mais competitivas no ambiente e consigam se estabelecer na rizosfera da planta hospedeira.

Nesse contexto, foi avaliado o crescimento *in vitro* de diferentes linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* (Figura 7). Foram observados 2 grupos com comportamento diferente no meio de cultura, os quais estão de acordo com o agrupamento obtido pela análise genômica realizada por ANI (*Average Nucleotide Identity*). O grupo A (G1 das curvas de crescimento) é formado pelos isolados SR1.6/6, R12E, R14E, R16E, F4, F7, F8 e TC3-10 com maior crescimento *in vitro* e o grupo B (G2 das curvas de crescimento) constituído pelo isolados AR1.6/2, AR1.6/8, MP2-3 e SR1.6/4 que apresentam menor crescimento em meio de cultura.

O sucesso da colonização da raiz por bactérias promotoras do crescimento vegetal, tais como *Methylobacterium* está diretamente associada a competição e sobrevivência no solo (DE SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015), onde a disponibilidade de nutrientes e a capacidade de obtê-los dependem da sua disponibilidade (aspectos físico-químico) e da competição com outras espécies (aspectos bióticos) (YAN et al., 2019). Nesse cenário, para avaliar a capacidade de obter nutrientes no solo, a sobrevivência de *Methylobacterium* e *Methylorubrum* foi analisada em solo esterilizado. Nesse experimento foi evidenciado que as 12 linhagens de estudo sobreviveram no solo esterilizado por até 90 dias após inoculação (Figura 8), sendo que as linhagens R16E e R12E (grupo G1 de análises genômica ANI) apresentaram uma maior abundância em relação as outras linhagens ($p < 0,001$), aos 90 dias de amostragem. Estes resultados sugerem que uma maior taxa de crescimento poderia favorecer a sobrevivência. Não entanto, este não é o único fator, visto que a linhagem SR1.6/6 que pertence ao grupo das linhagens que apresentaram maior crescimento *in vitro*, apresentou juntamente como a linhagem MP2-3 uma menor abundância no solo, em relação à linhagem R16E.

De fato, a composição nutricional do solo é um fator importante para a seleção de grupos taxonômicos específicos que compõem a microbiota do solo. Num estudo que comparou o efeito da adubação orgânica e inorgânica no solo, os autores observaram que a combinação da adubação orgânica e inorgânica aumentou a quantidade de carbono e nitrogênio total no solo resultando em uma alteração da comunidade microbiana, enquanto somente a adubação inorgânica apresentou pouco efeito sobre esta microbiota (LI et al., 2017), mostrando que a qualidade e quantidade de nutrientes (carbono e nitrogênio) podem favorecer grupos taxonômicos específicos, os quais podem se estabelecer no solo e posteriormente colonizar a planta hospedeira. Em outro estudo que comparou o genoma de espécies de *Methylobacterium*, foi observado que *M. oryzae* CBMB20 apresenta uma maior quantidade de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e aminoácidos, em comparação a outras espécies de *Methylobacterium* (KWAK et al., 2014), sugerindo que a capacidade de utilizar estes nutrientes pode variar entre as diferentes espécies.

Membros do gênero *Methylobacterium* podem promover o crescimento vegetal (DOURADO et al., 2015) por diferentes mecanismos, tais como produção de fito-hormônios (OMER et al., 2004), redução de níveis de etileno (FEDOROV et al., 2013; MADHAIYAN et al., 2006a) e disponibilização de nutrientes como fósforo (KUMAR et al., 2016) e ferro (LACAVA et al., 2008). Nesse trabalho, foi observado que 11, das 12 linhagens avaliadas, promoveram significativamente ($p < 0,05$) o crescimento radicular de plântulas de soja (*Glycine max*) (Figura 10.). Entretanto, nenhuma linhagem promoveu o crescimento radicular de

plântulas de milho. A partir desses resultados, foi demonstrado que a capacidade de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* em sobreviver no solo esterilizado e em meio de cultura, parece não interferir na capacidade de beneficiar a planta hospedeira, visto que todos os isolados promoveram o crescimento radicular de plântulas de soja, com exceção da linhagem R16E, que juntamente com a R12E, apresentou a maior abundância no solo.

Baseado nessas observações, quatro linhagens (AR1.6/2, R16E, SR1.6/6 e MP2-3) foram selecionadas para análises de sobrevivência no solo não esterilizado, formação de biofilme, colonização da raiz e competição *in vitro* durante a interação com a planta hospedeira (Figura 11).

Considerando que o solo é o ambiente no qual a bactéria se estabelece antes de colonizar a planta, foi avaliada a sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* em solo não esterilizado. Foi observado que após inoculação individualmente das bactérias, as linhagens *M. extorquens* AR1.6/2 e *M. hispanicum* MP2-3 foram as únicas que sobreviveram em solo, por até 90 dias, mostrando uma abundância significativamente maior ($p < 0,05$) em relação às linhagens R16E e SR1.6/6 que apresentaram sobrevivência inferior a 15 dias, visto que não foram detectadas no solo aos 15 dias de amostragem (Figura 14). Embora as linhagens AR1.6/2 e MP2-3 não tenham apresentado as maiores abundâncias no solo esterilizado, nesta condição onde além de explorar os recursos nutricionais do solo, a bactéria precisa também competir como outros membros da comunidade, estas duas linhagens foram as únicas a se estabelecerem no solo. De fato, Delgado-Baquerizo et al. (2017) observaram que embora a relação estequiométrica dos nutrientes (C:N:P total) seja o principal fator que controla a diversidade e composição microbiana em escala regional, o pH do solo, clima, espécies vegetais e a biomassa microbiana (interações micro-organismos-micro-organismos no solo) também afetam a composição da microbiota do solo.

Foi observado também que a inoculação das 4 linhagens em consórcio aumentou a sobrevivência da linhagem R16E, visto que quando inoculada sozinha apresentou sobrevivência <15 dias, mas quando inoculada em consórcio a sua sobrevivência foi >15 dias. A maior sobrevivência dessa linhagem quando co-inoculada com outras linhagens de *Methylobacterium* ou *Methylobacterium*, sugerem que ela pode se beneficiar de metabólitos produzidos por estas outras bactérias do consórcio, aumentando o seu *fitness* (FREILICH et al., 2011; GERMERODT et al., 2016) e como sugerido anteriormente, foi demonstrado que não somente a relação estequiométrica do C:N:P, mas também as interações microbianas no solo afetam a diversidade e composição microbiana do solo (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2017).

Foi observado que as linhagens MP2-3 e AR1.6/2 que sobreviveram no solo, por até 90 dias, não foram encontradas em maior abundância nas raízes de plântulas de soja e milho. Entretanto, *M. mesophilicum* SR1.6/6, que apresentou sobrevivência <15 dias no solo, quando inoculada individualmente, foi a linhagem mais abundante ($p < 0,05$) nas raízes de plântulas de soja (Figura 16). Embora não tenha sido observada diferença significativa ($p < 0,05$) nas raízes de milho, este resultado sugere que não existe relação entre a sobrevivência no solo e a colonização da planta hospedeira. Isso pode ser confirmado pelo fato de que bactérias que apresentaram diferença na sobrevivência no solo como a linhagem MP2-3 e AR1.6/2 apresentaram os mesmos níveis de colonização das raízes de milho e soja.

O sucesso da colonização de uma bactéria ao sistema radicular da planta hospedeira pode estar relacionado com o reconhecimento e metabolismo preferencial das fontes de carbono presentes nos exsudatos vegetais (ZHALNINA et al., 2018), além de outros fatores que podem induzir a expressão de genes essenciais para a colonização da planta hospedeira. Nesse contexto, a maior abundância de *M. mesophilicum* SR1.6/6 nas raízes de soja, sugere que esta linhagem possivelmente está sendo selecionada pelas plântulas de soja mediante a disponibilização de fontes de nutrientes preferenciais para esta bactéria, como glicose e frutose (identificados por GC-MS durante a interação).

A colonização de raízes de plântulas de soja por *M. mesophilicum* SR1.6/6, já tinha sido descrita em estudo anterior realizado por Araújo et al. (2015). Neste estudo, os autores, observaram que 24 h após inoculação, esta bactéria coloniza o sistema radicular da planta hospedeira, e após 72h já pode ser observado biofilme sobre o sistema radicular. No entanto, os resultados observados no presente trabalho, sugerem que esta linhagem apresenta uma baixa competitividade frente a micro-organismos autóctones do solo, assim como frente a outros isolados de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*. Visto que, esta linhagem apresentou a menor abundância no consórcio durante a interação com as raízes de soja (Figura 16 C), assim como, baixa sobrevivência no solo tanto no consórcio, como quando inoculada individualmente (Figura 14). Deste modo, os resultados obtidos sugerem que possivelmente *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 no ambiente (condições não axênicas), coloniza preferencialmente outros órgãos vegetais, como o xilema, uma vez que *M. mesophilicum* SR1.6/6 pode chegar diretamente a ele sendo transmitida pelo inseto *Bucephalagonia xanthophis*, o qual já foi observado em plantas de *Catharanthus roseus* (GAI et al., 2009). *M. mesophilicum* SR1.6/6 pode também ter uma preferência por colonizar ramos de plântulas de soja e milho, visto que, já foi observada a colonização de folhas e ramos de *Catharanthus roseus* e *Nicotiana clevelandii* (ANDREOTE et al., 2006).

Outra forma pela qual *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 pode colonizar a planta hospedeira, pode ser através da filosfera, a qual pode ser alcançada por meio de partículas de solo transportadas pelo ar. A capacidade de *M. mesophilicum* de colonizar folhas de milho foi avaliada em estudo prévio (ROMANOVSKAYA et al., 2001), em que foi observado que a colonização dos tecidos foliares da planta hospedeira somente ocorreu por meio da inoculação de uma suspensão bacteriana neste tecido. A colonização via sistema radicular não resultou em sucesso na colonização de folhas.

No presente trabalho, foi evidenciado que tanto os exsudatos de plântulas de soja como de milho estão compostos principalmente por carboidratos, os quais mostraram uma abundância de 14 e 16 %, respectivamente (Figura 18.), adicionalmente em plântulas de milho os ácidos orgânicos foram os compostos secundariamente mais abundantes (7%). Estudos anteriores demonstram que as plantas exsudam majoritariamente compostos de baixo peso molecular, relacionados com o metabolismo primário como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos (CANARINI et al., 2019; KLOEPPER, 2019). De fato, durante a interação de *Methylobacterium* e *Methylorubrum extorquens* com as plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) foi observado um aumento na porcentagem de carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos com relação as plântulas controle (Figura 20.). Mediante as análises realizadas na plataforma Metaboanalyst 4.0, foi observado que o aumento desses compostos pode ser gerado por uma indução na produção de exsudatos vegetais pela presença da bactéria, ou porque a bactéria está produzindo estes compostos (Tabelas 3 e 4). O aumento nas porcentagens de carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos, sugere que os exsudatos vegetais atuam como mediadores no processo de colonização de *Methylobacterium* spp., provendo um ambiente rico em nutrientes no ambiente próximo à raiz, os quais podem ser usados pelos micro-organismos como principal fonte de carbono e energia (BAIS et al., 2006; PII et al., 2015). Neste aspecto, os resultados sugerem que *M. mesophilicum* SR1.6/6 é a bactéria que melhor utiliza estes exsudatos em soja, aumentando de forma significativa a sua abundância no sistema radicular desta planta.

O papel dos exsudatos como mediadores do processo de colonização mediante a disponibilização de nutrientes, também se suporta nas abundâncias das linhagens R16E e SR1.6/6 nas raízes de soja e milho, linhagens com sobrevivência < 15 dias em solo não esterilizado, quando inoculas individualmente. Esses resultados, demonstram que o sucesso da colonização destas linhagens pode estar associado ao reconhecimento e possível consumo dos compostos exsudados pela planta. Adicionalmente, sugere que a baixa sobrevivência destas linhagens no solo pode ter sido pela ausência dos exsudatos radiculares, já que é reportado que

são os exsudatos os que modificam a estrutura do solo, proporcionando fontes de carbono para os micro-organismos do solo (BAIS et al., 2006; HAICHAR et al., 2014; LUNDBERG; TEIXEIRA, 2018). Para confirmar essa hipótese, serão necessários experimentos futuros para avaliar a sobrevivência no solo de cada uma das bactérias na presença e na ausência das plântulas de soja e milho.

Da mesma forma, as análises de GC-MS, mostraram que alguns compostos identificados nas plântulas de soja e milho sem inoculação, não foram detectados durante a interação com *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*. Este resultado sugere que as diferentes linhagens podem utilizar essas moléculas como fonte de carbono, visto que, em plântulas de soja foram detectados carboidratos como o *galactonic acid* e a *galactose*, e em plântulas de milho foram encontrados os carboidratos *galactose* e *fructose* e ácidos orgânicos como *3-oxo-Glutaric acid* e *undecanoic acid* (Tabela 3 e 4). Todos esses compostos, provavelmente podem ser usados como fonte de carbono e energia por *Methylobacterium* e *Methylorubrum*.

A capacidade de metabolizar os compostos presentes em exsudatos vegetais, já foi observado com anterioridade, em estudo no qual foram desenvolvidas curvas de crescimento das bactérias endofíticas *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium* sp. em um meio que continha exsudatos radiculares de *Arabidopsis thaliana* (JACOBY; MARTYN; KOPRIVA, 2018). Os autores observaram que os exsudatos dessa espécie vegetal suportaram o crescimento das bactérias avaliadas. Em outro estudo, Zalinha et al. (2018) observaram que bactérias isoladas do solo onde cresce *Avena barbata*, com resposta positiva ao crescimento radicular da planta, podem metabolizar preferencialmente ácidos orgânicos e aminoácidos presentes nos exsudatos dessa espécie vegetal, mostrando a estratégia que a planta utiliza para selecionar bactérias específicas para a sua rizosfera.

Adicionalmente, Salguero-Londoño (2015) observou que *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 apresentou um maior crescimento na presença de exsudatos de milho (*Zea mays*) e citros (*Citrus sinensis*). A autora observou que na ausência de outra fonte de carbono, os exsudatos destas espécies vegetais permitiram o crescimento desta bactéria (SALGUERO-LONDOÑO, 2015). As evidências citadas, demonstram que *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* podem usar como fontes de carbono os compostos presentes nos exsudatos de plântulas de soja e milho. Além disso, o presente estudo propõe, que no futuro, seja desenvolvido um estudo para avaliar o crescimento de cada linhagem em fontes de carbono identificadas nesse trabalho.

Por outro lado, os metabólitos produzidos pela plântula, mas ausentes na interação, sugerem que a presença de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* nas raízes da

planta hospedeira pode induzir a planta a reduzir a produção de determinados compostos, os quais poderiam alterar o padrão de colonização da planta hospedeira. Um exemplo, é o *benzene-1,2,4-triol* detectado nas plantas de soja e milho sem bactéria, mas ausente durante a interação (Tabela 3 e 4). Compostos *benzentiols*, como o *pyrogallol (benzene-1,2,3-triol)* podem inibir o *quorum sensing* de bactérias como *V. harveyi* (NI et al., 2008). Nesse contexto, pode ser sugerido que as plântulas de soja e milho podem reprimir a via de síntese deste composto em resposta à presença da bactéria, permitindo a formação de biofilme (que é dependente do *quorum sensing*) na raiz da planta por *Methylobacterium* (MOHAN et al., 2018) .

Adicionalmente, foi observado que plântulas de soja e milho exsudam um conjunto de metabólitos específicos em resposta à presença de cada isolado inoculado. Visto que, durante a interação de plântulas de soja com a linhagem AR1.6/2, foram detectados os compostos *lactose*, *altrose*, *N-acetyl-BPMannosamine*, e os compostos não conhecidos A144017 e A251007, enquanto na interação das plântulas de soja com a linhagem SR1.6/6 foram detectados os compostos *pyroglutamic acid*, *glucose*, *isoleucine*, *fructose*, e *altrose*. Esse resultado sugere que, a planta não só regula a composição do seu exsudato em resposta à presença da bactéria, mas também apresenta especificidade em relação à presença de genótipos bacterianos específicos.

Esta especificidade na resposta pode ser observada pela análise de outros metabólitos, como se mostra a continuação. Dentre os metabólitos exsudados por plântulas de soja, foi observado que o *galactinol* apresentou uma redução na sua abundância durante a interação com a linhagem AR1.6/2, enquanto teve um aumento na abundância durante a interação com a linhagem SR1.6/6 e com o consórcio bacteriano, já durante a interação com as linhagens R16E e MP2-3 manteve a mesma abundância (Figura 21, 22, 23 e 25). O *galactinol* é o precursor da família de oligossacarídeos da rafinose, os quais protegem as plantas frente a dessecação, a estresse por calor e congelamento (CHALIHA et al., 2018), sugerindo que a presença desta bactéria poderia induzir a sínteses deste composto pela planta e dessa forma melhorar a sua resistência ao estresse hídrico. Adicionalmente, em um estudo foi mostrado que a indução da resposta sistêmica de plantas de pepino por *Pseudomonas chlororaphis* O6, está relacionada com a expressão do gene da *galactinol sintetase* na planta, de forma que, um acúmulo de *galactinol* nos tecidos vegetais confere resistência frente a ataque de patógenos como *Corynespora cassiicola*, (KIM et al., 2008). Também, foi mostrado que plantas transgênicas de tabaco com superexpressão do gene *CsGolS1*, relacionado com a sínteses de *galactinol*, mostraram resistência constitutiva contra os patógenos *Botrytis cinerea* e *Erwinia carotovora* e um aumento no acúmulo de *galactinol* (KIM et al., 2008). Nesse contexto, provavelmente

Methylobacterium e *Methylobacterium extorquens* induziram a resposta sistêmica das plântulas de soja, as quais iniciaram uma modulação nas sínteses do *galactinol* na raiz, permitindo assim a colonização da raiz por parte destas linhagens bacterianas.

No presente trabalho, foi possível observar que *Methylobacterium* e *Methylobacterium extorquens* produzem também diferentes tipos de compostos, dentre os quais podem ser encontrados uma grande variedade de carboidratos como *maltotriose*, *D-nigerose*, *N-acetyl-BP mannosamine* e alguns ácidos orgânicos como *2,4-diamino-butanoic acid* e *gulonic acid-1,4-lactone*. A abundância destes compostos é alterada durante a sua interação com a planta hospedeira, sugerindo que podem estar envolvidas na comunicação ativa com a planta (*cross talking*) durante o processo de colonização, como já sugerido por Bais et al. (2006) e Hardoim, Van Overbeek, Elsas (2008).

Dentre os compostos produzidos pelas linhagens de *Methylobacterium* e *Methylobacterium extorquens*, a *D-alpha,alpha trehalose*, chamou a atenção, por ter a sua abundância alterada durante a interação das linhagens AR1.6/2, R16E e do consórcio bacteriano com plântulas de soja (Figura 21, 22 e 25). Também foi detectado nos exsudatos produzidos por a SR1.6/6 no experimento com plântulas de milho (Figura 28). A *trehalose* é um dissacarídeo formado por duas unidades de glicose unidas por uma ligação glicosídica e em bactérias atua como osmoprotetor, protegendo-as frente a dessecação (FEOFILOVA et al., 2014). De forma semelhante, foi descrito que o acúmulo de *trehalose* está relacionado com a proteção de *B. japonicum* e *R. leguminosarum* contra o estresse osmótico por dessecação (REINA-BUENO et al., 2012). Assim, provavelmente a *trehalose* pode desenvolver um papel importante na proteção frente ao estresse osmótico ou outro tipo de estresse de *Methylobacterium* durante a colonização da planta.

O efeito dos exsudatos da planta hospedeira também foi avaliada sobre o biofilme de *Methylobacterium* spp. e *M. extorquens*. O biofilme, é definido como agregados bacterianos nos quais as células estão aderidas a uma superfície biótica o abiótica, e protegidas por uma matriz autoproduzida de exopolissacarídeos (EPS), DNA e proteínas (CASTIBLANCO; SUNDIN, 2016; RAMEY et al., 2004). A formação do biofilme ocorre em diversos passos: primeiramente ocorre o primeiro contato e adesão à raiz, posteriormente a formação de micro colônias, logo a maturação e formação de macro colônias e finalmente a geração do exopolissacarídeo e formação do biofilme maduro (JAMAL et al., 2018). O processo de formação de biofilme é regulado por *quorum sensing*, um mecanismo de comunicação química que permite o diálogo célula a célula e que confere à bactéria a capacidade de perceber a densidade da população (ABISADO et al., 2018; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014). A

percepção é possível, mediante a secreção de pequenas moléculas que pertencem a uma grande variedade de classes dentre as que se encontram as *acyl homoserine lactones* (AHLs), *furanosyl borate diesters* (AI2), ácidos graxos insaturados e peptídeos (SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014). A concentração dessas moléculas aumenta à medida que aumenta a população, de modo que as bactérias podem responder ao aumento do sinais, alterando a expressão de genes necessários (MOHAN et al., 2018) .

O sucesso da colonização da planta, envolve não só a capacidade de reconhecer e assimilar os compostos presentes nos exsudatos radiculares, mas também na capacidade de aderir-se à superfície da raiz e formar biofilme (SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018). No presente trabalho foi observado que os exsudatos de plântulas de milho aumentaram a produção de biofilme em todas as linhagens, com exceção da linhagem AR1.6/2 que apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) (Figura 32). A indução da formação de biofilme por exsudatos de plântulas de milho foi observada recentemente, em trabalho no qual a bactéria *Bacillus velezensis*, aumentou a sua produção de biofilme na presença de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos dos exsudatos de plantas de milho (JIN et al., 2019). Neste trabalho, os autores observaram que a prolina e o ácido oxálico foram os maiores indutores da formação de biofilme por essa bactéria promotora de crescimento vegetal (JIN et al., 2019). De forma similar, Yuan et al. (2015) observaram a indução de biofilme em *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6, por ácidos orgânicos existentes nos exsudatos de plantas de banana, especialmente o ácido fumárico, o qual promoveu a formação de biofilme e aumentou a expressão dos genes *epsD* e *yqxM* relacionados com a síntese de EPS. No presente trabalho, foram identificados nos exsudatos de milho ácidos orgânicos, tais como *undecanoic acid* e o *2,4-diamino-butanoic acid*, assim como o aminoácido *allo-treonina*, os quais poderiam estar associados à indução de biofilme por *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* na superfície das raízes das plântulas de milho.

Além disso, foi observado que *Methylobacterium hispanicum* MP2-3 e o consórcio bacteriano apresentaram a maior produção de biofilme ($p < 0,05$), sendo que estes dos tratamentos não mostraram uma produção significativa em meio SPW. Embora, os exsudatos radiculares de milho induziram a maior produção *in vitro* de biofilme pela linhagem MP2-3, esta linhagem não apresentou a maior abundância nas raízes de plântulas de milho. Sugerindo que a planta pode controlar a colonização de *Methylobacterium* por outros mecanismos não elucidados neste trabalho.

Adicionalmente, a maior produção de biofilme do consórcio bacteriano no meio SPW suplementado com os exsudatos vegetais, em relação as linhagens AR1.6/2, R16E e SR1.6/6,

pode estar relacionada com as interações intraespecíficas que podem ocorrer no consórcio. Estas interações poderiam levar a uma melhor estrutura do biofilme, visto que em estudo anterior foi observado que biofilmes mistos de diferentes espécies de *Methylobacterium* apresentam maior espessura e resistência física e fisiológica, quando é comparado com biofilmes de uma única espécie (XU et al., 2014).

Dessa forma, o presente trabalho mostra que as plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) apresentam a capacidade de selecionar genótipos específicos de *Methylobacterium* spp., provavelmente mediante a disponibilização de metabólitos específicos nos exsudatos radiculares. De modo que, o sucesso da colonização de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* depende da flexibilidade em responder as diversas fontes de carbono disponibilizadas pela planta hospedeira nos exsudatos radiculares. Este trabalho, também ilustra o papel dos exsudatos vegetais como mediadores da colonização de *Methylobacterium* spp., ao induzir a produção de biofilme, o qual é indispensável para a aderência e colonização da planta hospedeira. Por último, os resultados obtidos sugerem que a planta responde positivamente a presença de *Methylobacterium* regulando a exsudação de moléculas que podem regular a abundância da bactéria na raiz. Além disso, foi observado que a sobrevivência de *Methylobacterium* no solo está relacionada à capacidade destas bactérias em competir com outras espécies, e possivelmente com a presença de nutrientes disponibilizados pelos exsudados radiculares.

6 CONCLUSÕES

- a) As plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) exsudam um conjunto de metabólitos específicos em resposta à presença de cada isolado inoculado;
- b) O sucesso da colonização da planta hospedeira por *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* depende da capacidade de responder aos exsudatos da planta e competir com outras bactérias associadas;
- c) A sobrevivência no solo não está associada à capacidade de colonizar a planta hospedeira.

REFERÊNCIAS¹

- ABANDA-NKPWATT, D. et al. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: Growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 15, p. 4025–4032, 2006.
- ABISADO, R. G. et al. crossm Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. **American society for Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2018.
- AFZAL, M.; KHAN, Q. M.; SESSITSCH, A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. **Chemosphere**, v. 117, n. 1, p. 232–242, 2014.
- AGAFONOVA, N. V et al. Phosphate Solubilizing Activity of Aerobic Methylobacteria. v. 82, n. 6, p. 28–32, 2014.
- ANDREOTE, F. D. et al. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 419–426, 2006.
- ANDREOTE, F. D. et al. Culture-independent assessment of rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 1, p. 82–93, 2009.
- ANKATI, S.; RANI, T. S.; PODILE, A. R. Changes in Root Exudates and Root Proteins in Groundnut–*Pseudomonas* sp. Interaction Contribute to Root Colonization by Bacteria and Defense Response of the Host. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 2, p. 523–538, 2019.
- ARAUJO, W. L. et al. Genes related to antioxidant metabolism are involved in *Methylobacterium mesophilicum*-soybean interaction. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 108, n. 4, p. 951–963, 2015.
- ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology** v. 68, n. 10, p. 4906–4914, 2002.
- ARAÚJO, W. L. et al. Genes related to antioxidant metabolism are involved in *Methylobacterium mesophilicum*-soybean interaction. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 108, n. 4, p. 951–963, 2015.
- ARDANOV, P. et al. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Biological Control**, v. 56, n. 1, p. 43–49, 2011.
- BADRI, D. V. et al. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. **Current**

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Opinion in Biotechnology, v. 20, n. 6, p. 642–650, 2009.

BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, n. 6, p. 666–681, 2009.

BAETZ, U.; MARTINOIA, E. Root exudates : the hidden part of plant defense Trends in Plant Science Root exudates - the hidden part of plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 2, p. 90–98, 2014.

BAIS, H. P. et al. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006.

BARROS ROSSETTO, P. **Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas** 2008.148f. Tese de Doutorado em agronomia (Genética e melhoramento de plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478–486, 2012.

BINI, A. P. **Estudo molecular do desenvolvimento de Puccinia psidii Winter in vitro e no processo de infecção em Eucalyptus grandis** Andressa Peres Bini Piracicaba. 2016. 145p. Tese Doutorado em Ciências (Genética e melhoramento de plantas) Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ”, Piracicaba, 2016.

BOGAS, A. C. et al. Effects of growth-promoting endophytic *Methylobacterium* on development of Citrus rootstocks. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 19, p. 646–653, 2016.

BONATELLI, M. L. **Caracterização da comunidade bacteriana contaminante do processo fermentativo para produção de etanol e o impacto no metaboloma da fermentação** 2016. 129p Tese Doutorado em Ciências (Genética e melhoramento de plantas). Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ”, Piracicaba, 2016.

BRADLEY, A. S. et al. Hopanoid-free *Methylobacterium extorquens* DM4 overproduces carotenoids and has widespread growth impairment. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2017.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 155–194, 2005.

BROUGHTON, W. J. et al. Signals exchanged between legumes and *Rhizobium* : agricultural uses and perspectives. p. 129–137, 2003.

CANARINI, A. et al. Corrigendum: Root Exudation of Primary Metabolites: Mechanisms and Their Roles in Plant Responses to Environmental Stimuli. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, 2019.

CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009.

- CASTIBLANCO, L. F.; SUNDIN, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 362–372, 2016.
- CHALIHA, C. et al. Glycans as modulators of plant defense against filamentous pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. July, p. 1–16, 2018.
- CHAUHAN, H. et al. Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 38–53, 2015.
- CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W486–W494, 2018.
- COMPANT, S. et al. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29–37, 2019.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.
- CONTRERAS-MOREIRA, B.; VINUESA, P. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7696–7701, 2013.
- CUADROS-INOSTROZA, Á. et al. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. v. 12, p. 1–12, 2009.
- DAZZO, F. B.; GANTER, S.; LANSING, E. Rhizosphere. **Encyclopedia of Microbiology**, p. 335–349, 2009.
- DE SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401–419, 2015.
- DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. It is elemental : soil nutrient stoichiometry drives bacterial diversity. v. 19, p. 1176–1188, 2017.
- DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Society**, v. 68, n. 6, p. 2950–2958, 2002.
- DONOVAN, P. K.; MCDONALD, A. P. .; WOOD, A. P. The Family Methylobacteriaceae. In: **The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. p. 313
- DOORNBOS, R. F.; LOON, L. C. VAN. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere . A review. p. 227–243, 2012.
- DOURADO, M. N. et al. The diversity of endophytic methylotrophic bacteria in an oil-contaminated and an oil-free mangrove ecosystem and their tolerance to heavy metals. **Biotechnology research international**, v. 2012, p. 759865, 2012a.
- DOURADO, M. N. et al. Analysis of 16s rRNA and mxaF genes revealing insights into

Methylobacterium niche-specific plant association. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 142–148, 2012b.

DOURADO, M. N. et al. Interaction genes regulated by plant exudate and quorum sensing molecules. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 1339, p. in press, 2013.

DOURADO, M. N. et al. Biotechnological and Agronomic Potential of Endophytic Pink-Pigmented Methylophilic *Methylobacterium* spp. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014.

FEDOROV, D. N. et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from *Methylobacterium radiotolerans* and *Methylobacterium nodulans* with higher specificity for ACC. **FEMS Microbiology Letters**, v. 343, n. 1, p. 70–76, 2013.

FEOFILOVA, E. P. et al. Trehalose: Chemical Structure, Biological Functions. **Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 184–194, 2014.

FERREIRA, A. et al. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, n. 1, p. 8–14, 2008.

FREILICH, S. et al. Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 587–589, 2011.

GAI, C. S. et al. Transmission of *Methylobacterium mesophilicum* by *Bucephalagonia xanthophis* for paratransgenic control strategy of Citrus variegated chlorosis. **Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 448–454, 2009.

GALBALLY, I. E.; KIRSTINE, W. The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. **Journal of Atmospheric Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 195–229, 2002.

GERMERODT, S. et al. Pervasive Selection for Cooperative Cross-Feeding in Bacterial Communities. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 6, p. 1–21, 2016.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.

GREEN, P. N.; ARDLEY, J. K. Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: A proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 2727–2748, 2018.

GUO, M. et al. The influence of root exudates of maize and soybean on polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and soil bacterial community structure. **Ecological Engineering**, v. 99, p. 22–30, 2017.

GUSTAVO, A. et al. Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes. **Elsevier GmbH**, v. 183, p. 92–99, 2015.

HAICHAR, F. EL Z. et al. Root exudates mediated interactions belowground. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 77, p. 69–80, 2014.

HALL, B. G. et al. Growth rates made easy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 1, p. 232–238, 2014.

HANSEN, H.; GROSSMANN, K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. **Plant Physiology**, v. 124, n. 3, p. 1437–1448, 2000.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008.

HARUN-OR-RASHID, M.; CHUNG, Y. R. Induction of systemic resistance against insect herbivores in plants by beneficial soil microbes. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. October, p. 1–11, 2017.

HAWES, M. C. et al. The role of root border cells in plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 3, p. 128–133, 2000.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121–129, 2001.

HERTENBERGER, G.; ZAMPACH, P.; BACHMANN, G. Plant species affect the concentration of free sugars and free amino acids in different types of soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 165, n. 5, p. 557–565, 2002.

HIBBING, M. E. et al. Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 15–25, 2010.

HILTNER, L.. Über neuere erfahrungen und probleme auf dem debiete der bo denbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundund und brache. *Zbl. Bakteriol*, 2, 14-25, 1904.

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, n. 1, p. 197–209, 1994.

HÖPPENER-OGAWA, S. et al. Specific detection and real-time PCR quantification of potentially mycophagous bacteria belonging to the genus *Collimonas* in different soil ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4191–4197, 2007.

HUANG, X. et al. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities 1. v. 275, n. February, p. 267–275, 2014.

IGUCHI, H.; YURIMOTO, H.; SAKAI, Y. Interactions of Methylophs with Plants and Other Heterotrophic Bacteria. **Microorganisms**, v. 3, n. 2, p. 137–151, 2015.

IVANOVA, E. G.; DORONINA, N. V.; TROTSSENKO, Y. A. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. **Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 392–397, 2001.

JACOBY, R. P.; MARTYN, A.; KOPRIVA, S. Exometabolomic Profiling of Bacterial Strains

as Cultivated Using *Arabidopsis* Root Extract as the Sole Carbon Source. v. 31, n. 8, p. 803–813, 2018.

JAMAL, M. et al. ScienceDirect Bacterial biofilm and associated infections. v. 81, p. 7–11, 2018.

JAYASHREE, S. et al. Evaluation of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria for phosphate solubilization. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 8, p. 543–552, 2011.

JEANDET, P. **Phytoalexins: Current progress and future prospects** *Molecules* MDPI AG, , 1 fev. 2015.

JIN, Y. et al. Role of Maize Root Exudates in Promotion of Colonization of *Bacillus velezensis* Strain S3-1 in Rhizosphere Soil and Root Tissue. **Current Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 855–862, 2019.

JONES, D. L.; NGUYEN, C.; FINLAY, R. D. Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 5–33, 2009.

KESHISHIAN, E. A.; RASHOTTE, A. M. Plant cytokinin signalling. **Essays in Biochemistry**, v. 58, p. 13–27, 2015.

KIM, M. S. et al. Galactinol Is a Signaling Component of the Induced Systemic Resistance Caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 Root Colonization. v. 21, n. 12, p. 1643–1653, 2008.

KLOEPPER, J. W. The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere : A Review. 2019.

KONG, C.-H. et al. Allelochemicals and Signaling Chemicals in Plants. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2737, 2019.

KOVALEVA, J.; DEGENER, J. E.; VAN DER MEI, H. C. *Methylobacterium* and its role in health care-associated infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1317–1321, 2014.

KUMAR, A.; VERMA, J. P. Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? **Microbiological Research**, v. 207, n. November 2017, p. 41–52, 2018.

KUMAR, M. et al. Methylotrophic bacteria in sustainable agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 1–9, 2016.

KUMAR, M. et al. Role of Methylotrophic bacteria in Climate Change Mitigation. In: PREM LAL KASHYAP (Ed.). **Microbes for Climate Resilient Agriculture**., 2018. p. 149–164.

KWAK, M. J. et al. Genome information of *Methylobacterium oryzae*, a plant-probiotic methylotroph in the phyllosphere. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

LACAVA, P. T. et al. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 55–59, 2004.

LACAVA, P. T. et al. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por

isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 637–642, 2006.

LACAVA, P. T. et al. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 521–528, 2008.

LATIF, S.; CHIAPUSIO, G.; WESTON, L. A. **Allelopathy and the Role of Allelochemicals in Plant Defence**. Elsevier Ltd, 2017. v. 82

LI, F. et al. Bacterial Community Structure after Long-term Organic and Inorganic Fertilization Reveals Important Associations between Soil Nutrients and Specific Taxa Involved in Nutrient Transformations. v. 8, n. February, 2017.

LITCHMAN, E.; EDWARDS, K. F.; KLAUSMEIER, C. A. Microbial resource utilization traits and trade-offs: Implications for community structure, functioning, and biogeochemical impacts at present and in the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–10, 2015.

LUNDBERG, D. S.; TEIXEIRA, P. J. P. L. Root-exuded coumarin shapes the root microbiome. v. 115, n. 22, p. 5629–5631, 2018.

MACDONALD, R. C.; Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere. **Atmospheric Environment. Part A**. v. 27, n. 1989, 1993.

MADHAIYAN, M. et al. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, n. 4, p. 315–324, 2004.

MADHAIYAN, M. et al. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 41, n. 5, p. 350–358, 2005.

MADHAIYAN, M. et al. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. **Planta**, v. 224, n. 2, p. 268–278, 2006a.

MADHAIYAN, M. et al. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 270–276, 2006b.

MADHAIYAN, M. et al. *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 57, p. 326–331, 2007.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SA, T. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*). **Planta**, v. 226, n. 4, p. 867–876, 2007.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms.

FEMS Microbiology Reviews, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

MERCIER, A. et al. Decrease of the level of extractable polychlorinated biphenyls in soil microcosms: Influence of granular activated carbon and inoculation by natural microbial consortia. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 105, p. 127–136, 2015.

MHLONGO, M. I. et al. The Chemistry of Plant–Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Potential for Metabolomics to Reveal Signaling Related to Defense Priming and Induced Systemic Resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. February, p. 1–17, 2018.

MOHAN, R. et al. Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence. **Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence**, p. 133–160, 2018.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. Elsevier Editora, 2014.

NI, N. et al. Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 5, p. 1567–1572, 2008.

O'TOOLE GA, PRATT LA, WATNICK PI, NEWMAN DK, WEAVER VB, K. R. to Study of Biofilms A. **Methods in Enzymology**, v. 310, n. 1996, p. 91–109, 1999.

OCHSNER, A. M. et al. *Methylobacterium extorquens*: methylotrophy and biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 517–534, 2014.

OMER, Z. S. et al. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. **Plant Growth Regulation**, v. 43, n. 1, p. 93–96, 2004.

OMER, Z. S.; TOMBOLINI, R.; GERHARDSON, B. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 3, p. 319–326, 2004.

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, n. 2, p. 226–229, 1976.

PECK, S. C.; KENDE, H. Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indole-3-acetic acid in etiolated peas. **Plant Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 293–301, 1995.

PERRET, X.; STAEHELIN, C. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 180–201, 2000.

PII, Y. et al. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 4, p. 403–415, 2015.

POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; YIM, W. Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescent-marked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere. p. 1033–1043, 2008.

PREDIGER, E. **Calculations: Converting from nanograms to copy number**, 2013.

Disponível em: <<https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/calculations-converting-from-nanograms-to-copy-number>> Acesso em: 10 de setem. de 2019.

RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 142–149, 2010.

RAMEY, B. E. et al. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 602–609, 2004.

REINA-BUENO, M. et al. Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. **BMC microbiology**, v. 12, p. 1–17, 2012.

ROMANOVSKAYA, V. A. et al. The ways of plant colonization by *Methylobacterium* strains and properties of these bacteria. **Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 221–227, 2001.

RUDRAPPA, T. et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1547–1556, 2008.

SAHA, M. et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research** p. 3984–3999, 2016.

SALGUERO-LONDOÑO JK. **Análises da Expressão de genes do Sistema de Secreção na Interação *Methylobacterium Mesophilicum* SR 1.6/6 com A Planta Hospedeira**. 2015. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SÁNCHEZ-CAÑIZARES, C. et al. Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 188–196, 2017.

SANTHANAM, R. et al. Specificity of root microbiomes in native-grown *Nicotiana attenuata* and plant responses to UVB increase *Deinococcus* colonization. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2543–2562, 2017.

SASSE, J.; MARTINOIA, E.; NORTHEN, T. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 1, p. 25–41, 2018.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. HISTORICAL commentary NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SHINTARO HARA, MASATOSHI MATSUDA, K. M. Growth Stage-dependent Bacterial Communities in Soybean Plant Tissues: *Methylobacterium* Transiently Dominated in the Flowering Stage of the Soybean Shoot. v. 00, n. 0, 2019.

SINGH, D. et al. Plant microbiome: A reservoir of novel genes and metabolites. **Plant Gene**, v. 18, p. 100177, 2019.

SOBRAL, J. K. **A Comunidade Bacteriana Endofítica e Epifítica De Soja (*Glycine Max*) e Estudo da Interação Endófitos-plantas**. 2003. 174f. Tese Doutorado em Agronomia (Genética e melhoramento de plantas) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current**

Opinion in Microbiology, v. 18, n. 1, p. 96–104, 2014.

STEINAUER, K.; CHATZINOTAS, A.; EISENHAUER, N. Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 20, p. 7387–7396, 2016.

SY, A. et al. Methylo-trophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7245–7252, 2005.

TANI, A. et al. High-throughput identification and screening of novel *methylobacterium* species using whole-cell MALDI-TOF/MS analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

VIVES-PERIS, V. et al. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. **Plant Cell Reports**, n. 0123456789, 2019.

WENKE, K. et al. Volatiles of rhizobacteria *Serratia* and *Stenotrophomonas* alter growth and metabolite composition of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**, v. 21, p. 109–119, 2019.

XU, F.-F. et al. Evaluation of Intraspecies Interactions in Biofilm Formation by *Methylobacterium* Species Isolated from Pink-Pigmented Household Biofilms. **Microbes and Environments**, v. 29, n. 4, p. 388–392, 2014.

YAN, Y. et al. Environmental filtering : A case of bacterial community assembly in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 136, n. February, p. 107531, 2019.

YIM, W. et al. Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 67, p. 95–104, 2013.

YUAN, J. et al. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. **Scientific Reports**, v. 5, n. July, p. 1–8, 2015.

ZHALNINA, K. et al. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 470–480, 2018.

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

APÊNCICES

A – Representação das regiões utilizadas no desenho de *primers* específicos de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens*.

(Continua)

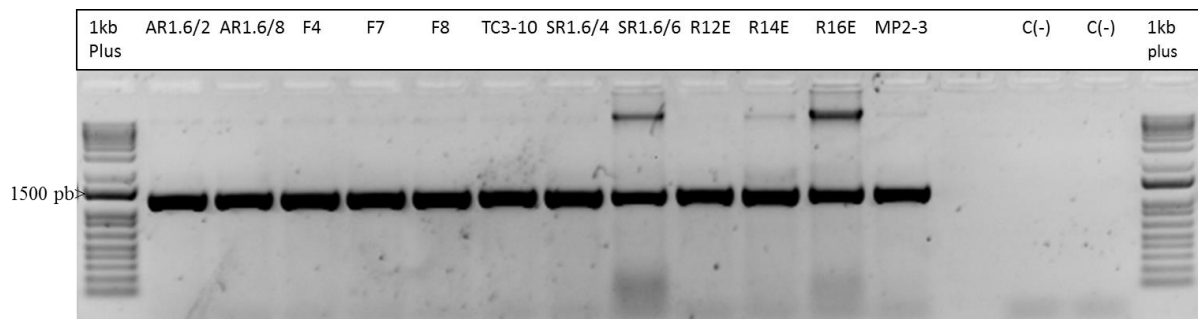
Nome do primer	Gene alvo	Região selecionada para o desenho do primer
MEX1-F	<i>rpoB</i>	
MEX1-R	<i>rpoB</i>	
MHP1-F		
MHP2-R	<i>trpA</i>	

A – Representação das regiões utilizadas no desenho de *primers* específicos de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*.

		(Conclusão)
Nome do <i>primer</i>	Gene alvo	Região selecionada para o desenho do <i>primer</i>
SR1.6/6-F	Proteína hipotética (exclusiva da linhagem)	
MF5-R16-F	Região intergênica do 16S e 23S	
MF6-R16-R		

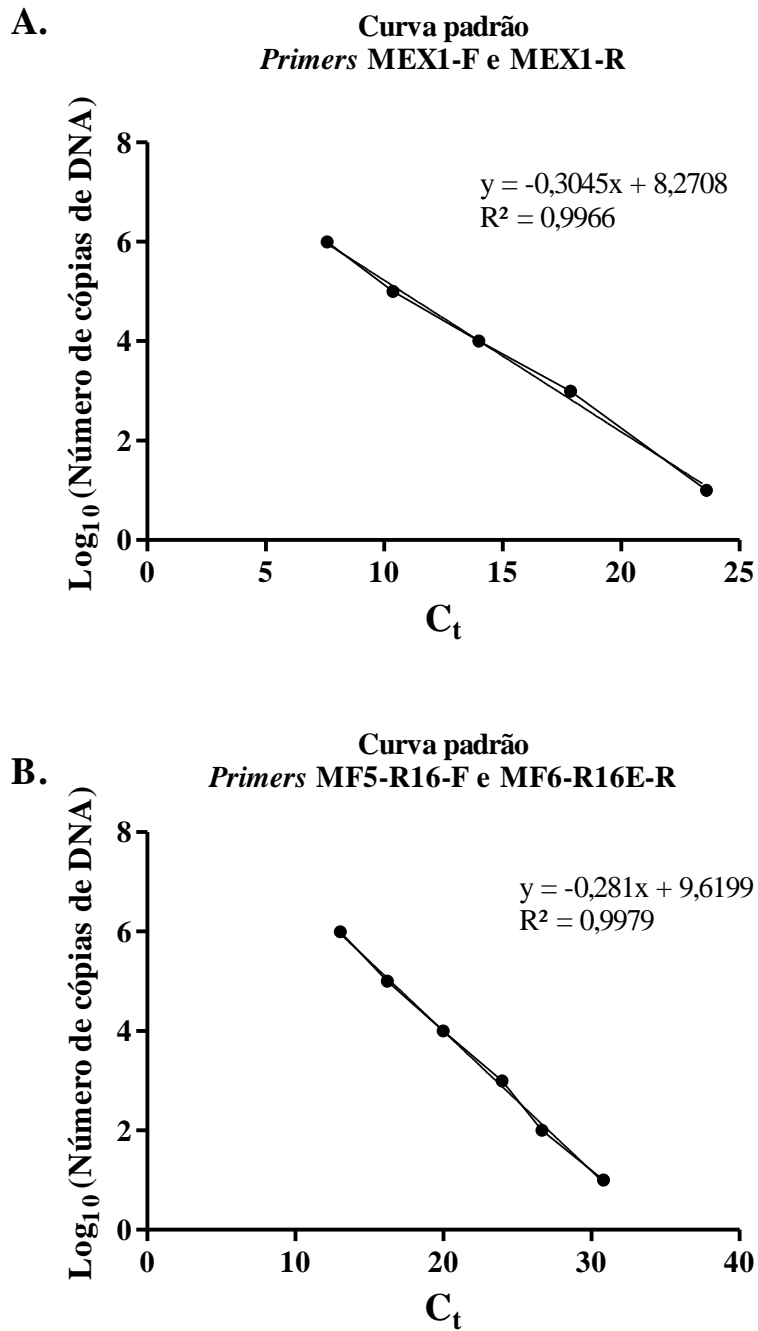
Os alinhamentos realizados no programa Geneious 7.0.6. estão representados com as sequências dos genes alvo selecionados para o desenho de *primers*. Destaca-se em vermelho a sequência escolhida para o desenho de cada *primer*. O par de *primers* SR1.6/6-F/SR1.6/6-R, foi desenhado a partir de uma sequência única que diferencia a linhagem SR1.6/6 das outras linhagens.

B – Eletroforese em gel de agarose de PCR com *primers* para amplificação do gene 16S rRNA com o DNA genômico das diferentes linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* usados para a validação dos *primers* desenhados.



C – Curvas Padrão dos *primers* utilizados para a quantificação das linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2 no solo.

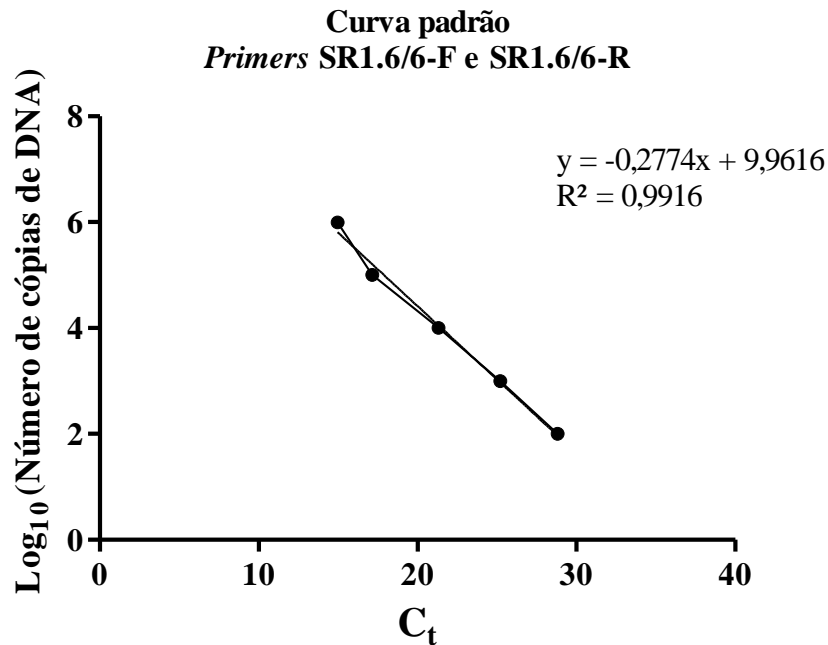
(Continua)



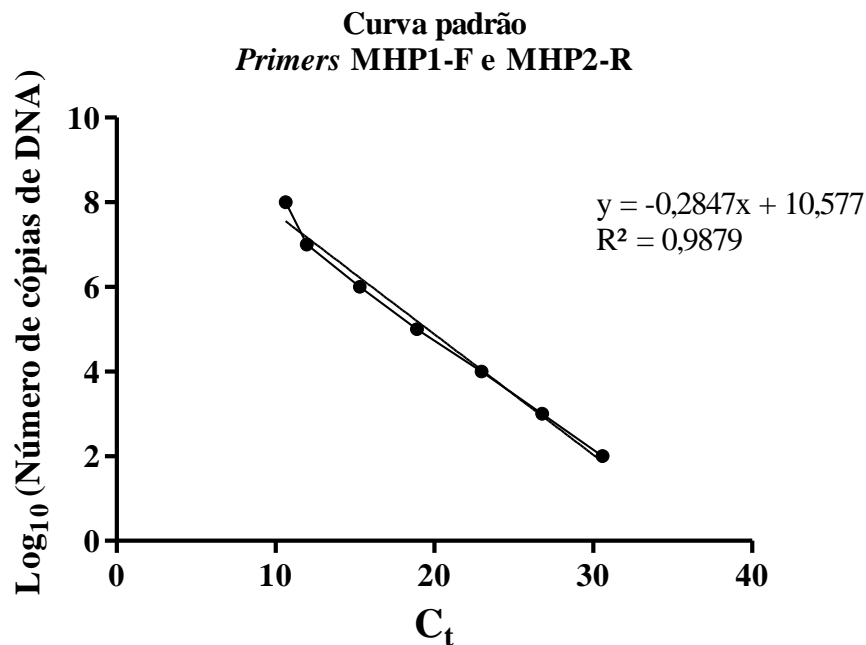
C – Curvas Padrão dos *primers* utilizados para a quantificação das linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2 no solo.

(Conclusão)

C.

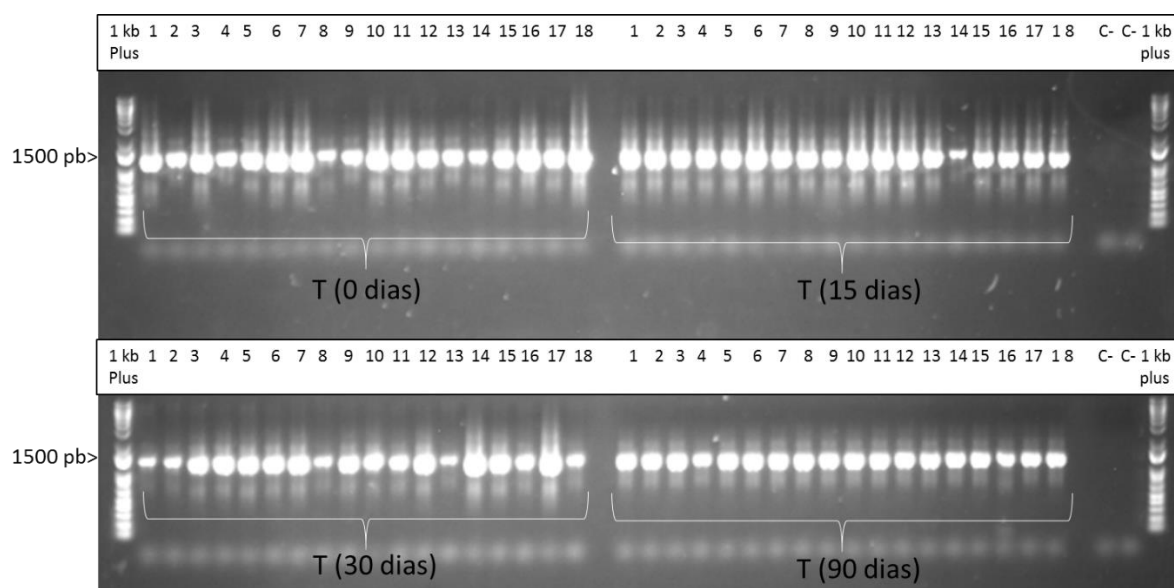


D.



Na figura se mostra em escala logarítmica a média da concentração de DNA (número de cópias) e seu respectivo valor de Ct. Também se mostra a regressão linear de cada um dos *primers* e o valor do R² [A.] *Primers* MEX1-F e MEX1-R; [B.] *Primers* MF5-R16E-F e MF6-R16E-R; [C.] *Primers* SR1.6/6-F e SR1.6/6-R [D.] *Primers* MHP1-F e MHP2

D – Eletroforese em gel de agarose de PCR com *primers* para amplificação do gene 16S rRNA com o DNA extraído das amostras de solo.



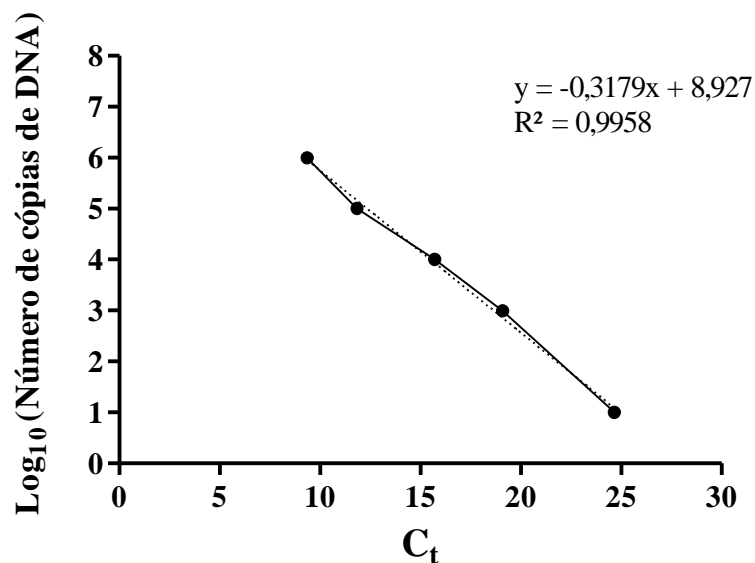
[1-3] controles negativos do experimento de solo; [4-6] Amostras do solo inoculado com *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2 [7-9] Amostras do solo inoculado com *Methylobacterium fujisawaense* R16E; [10-12] Amostras do solo inoculado com *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6; [13-15] Amostras do solo inoculado com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3; [16-18] Amostras do solo inoculado com o consórcio bacteriano; [C-] controles negativos da reação.

E – Curvas Padrão dos *primers* utilizados para a quantificação das linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2 na raiz de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea Mays*)

(Continua)

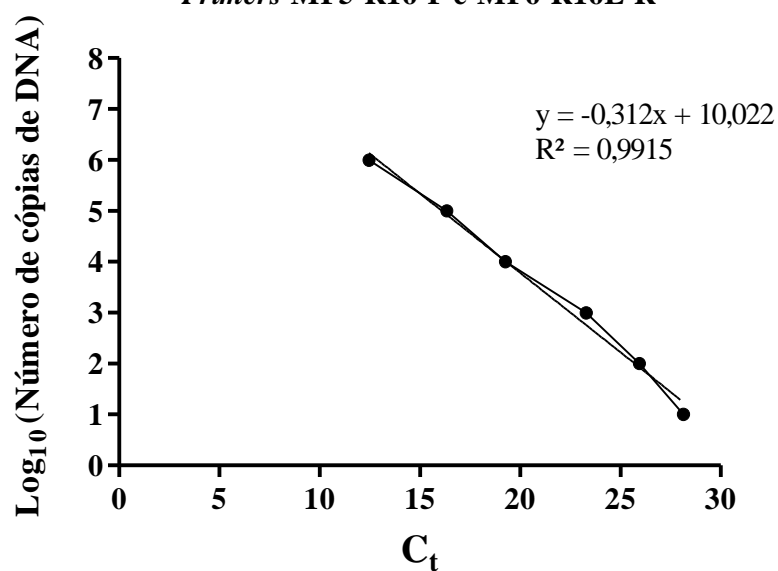
A.

Curva padrão
Primers MEX1-F e MEX1-R



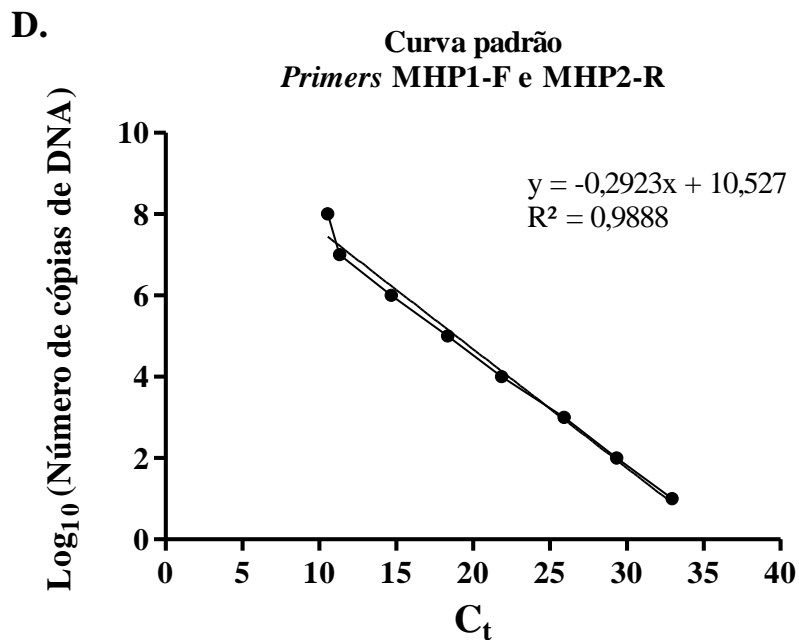
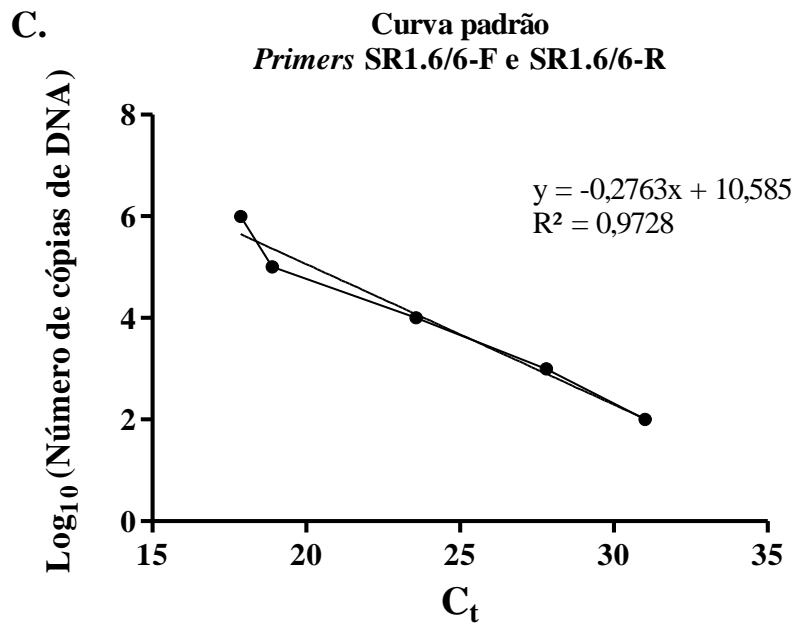
B.

Curva padrão
Primers MF5-R16-F e MF6-R16E-R



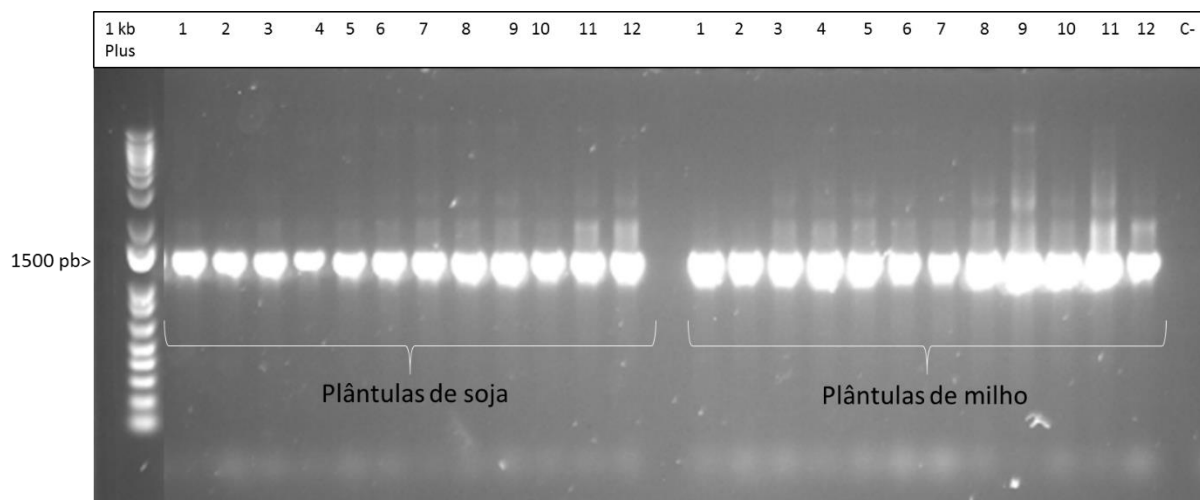
E – Curvas Padrão dos *primers* utilizados para a quantificação das linhagens de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2 na raiz de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea Mays*)

(Conclusão)



Na figura se mostra em escala logarítmica a média da concentração de DNA (número de cópias) e seu respectivo valor de Ct. Também se mostra a regressão linear de cada um dos *primers* e o valor do R² [A.] *Primers* MEX1-F e MEX1-R; [B.] *Primers* MF5-R16E-F e MF6-R16E-R; [C.] *Primers* SR1.6/6-F e SR1.6/6-R [D.] *Primers* MHP1-F e MHP2-R

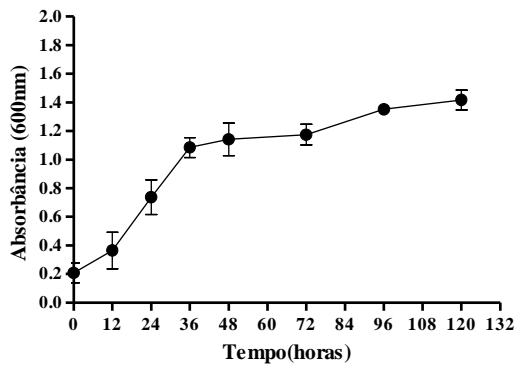
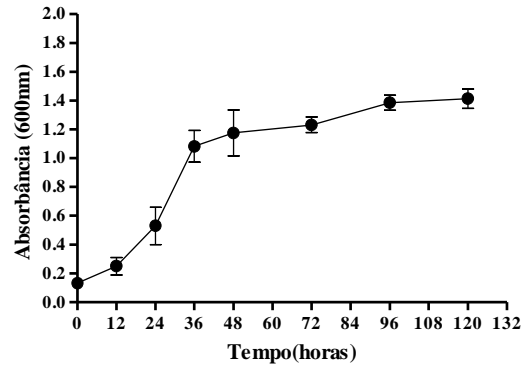
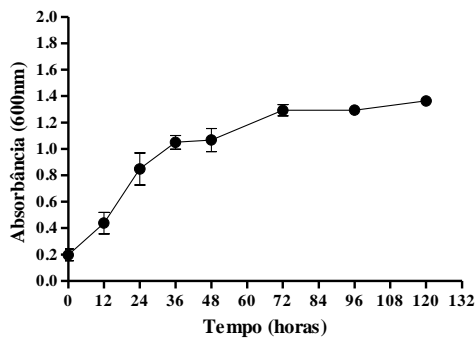
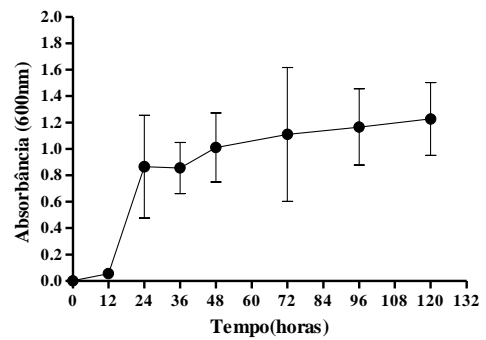
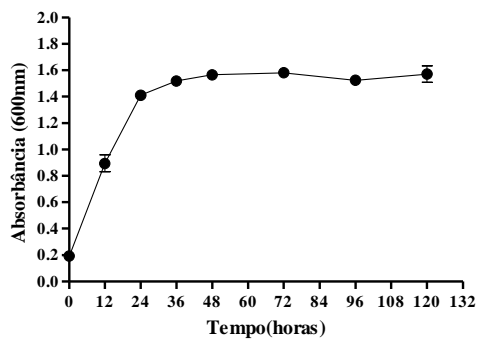
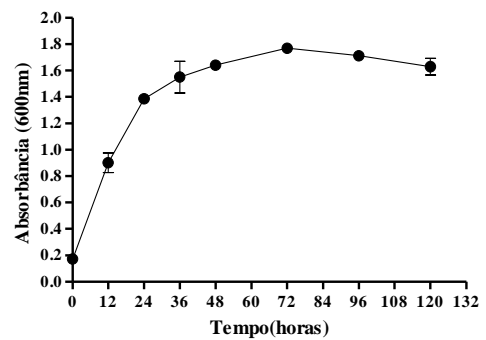
F – Eletroforese em gel de agarose de PCR com *primers* para amplificação do gene 16S rRNA com o DNA extraído das raízes de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).



[1 e 2] controles; [3 e 4] plântulas inoculadas com *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2 [5 e 6] plântulas inoculadas com *Methylobacterium fujisawaense* R16E; [7 e 8] plântulas inoculadas com *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6; [9-10] plântulas inoculadas com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3; [11-12] plântulas inoculadas com o consórcio bacteriano; [C-] controle negativo da reação.

G – Curvas de crescimento *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*

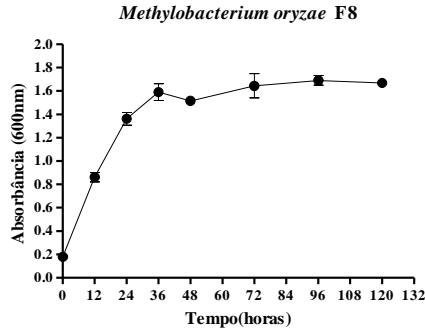
(Continua)

A. *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2**B.** *Methylorubrum extorquens* AR1.6/8**C.** *Methylobacterium radiotolerans* SR1.6/4**D.** *Methylobacterium hispanicum* MP2-3**E.** *Methylobacterium radiotolerans* F4**F.** *Methylobacterium oryzae* F7

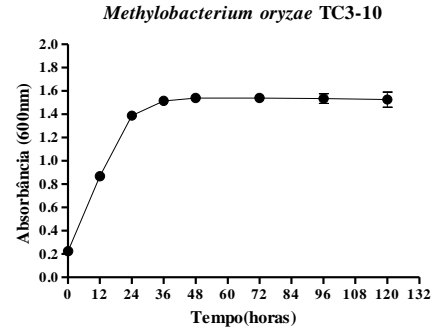
G – Curvas de crescimento *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*

(Conclusão)

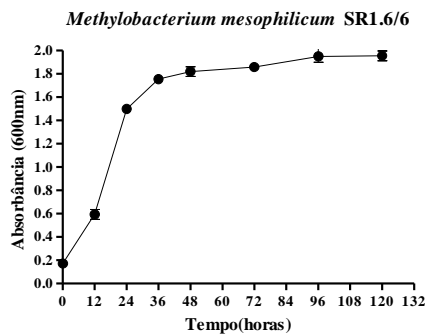
G.



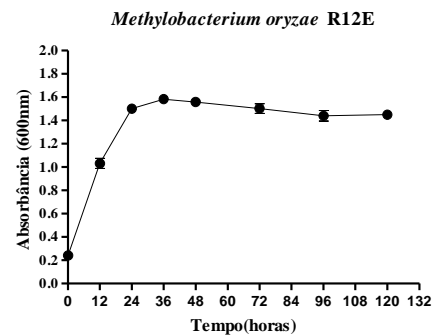
H.



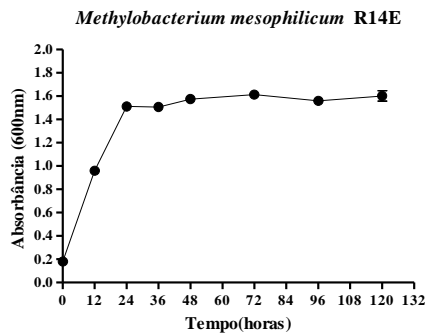
I.



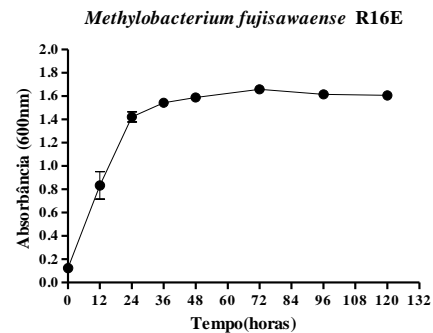
J.



K.



L.

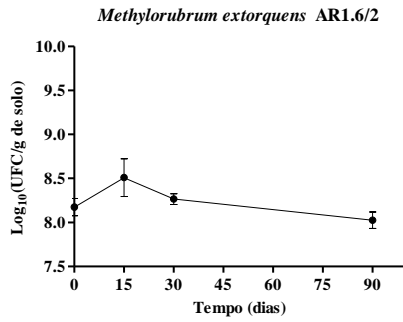


Na figura estão representadas de forma independente as cinéticas de crescimento de cada linhagem. As cinéticas são mostradas como as medias das densidades ópticas a $\lambda=600\text{nm} \pm$ o desvio padrão. [A.] *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2; [B.] *Methylorubrum extorquens* AR1.6/8; [C.] *Methylobacterium radiotolerans* SR1.6/4; [D.] *Methylobacterium hispanicum* MP2-3; [E.] *Methylobacterium radiotolerans* F4; [F.] *Methylobacterium Oryzae* F7; [G.] *Methylobacterium Oryzae* F8; [H.] *Methylobacterium Oryzae* TC3-10; [I.] *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6; [J.] *Methylobacterium Oryzae* R12E; [K.] *Methylobacterium mesophilicum* R14E; [L.] *Methylobacterium fujisawaense*.R16E.

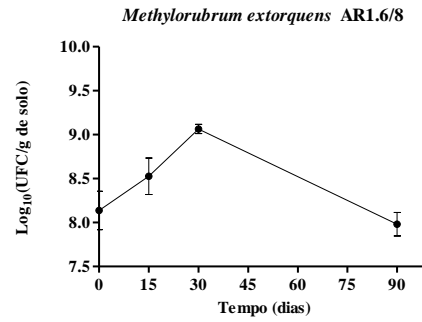
H – Sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* em solo esterilizado.

(Continua)

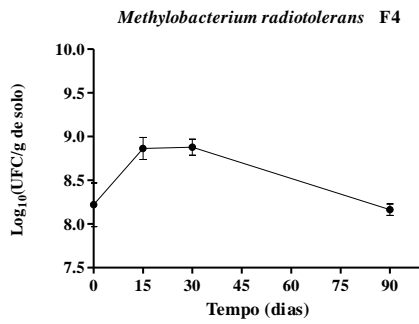
A.



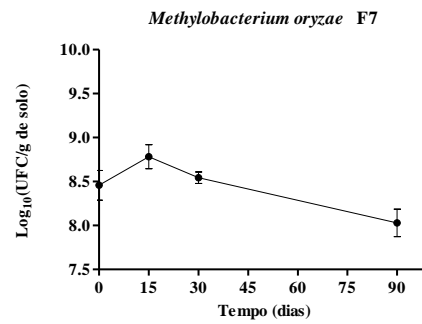
B.



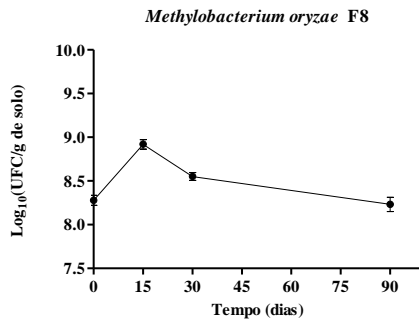
C.



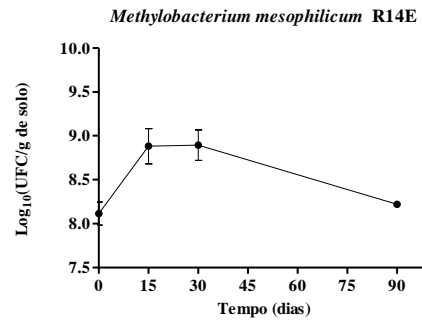
D.



E.

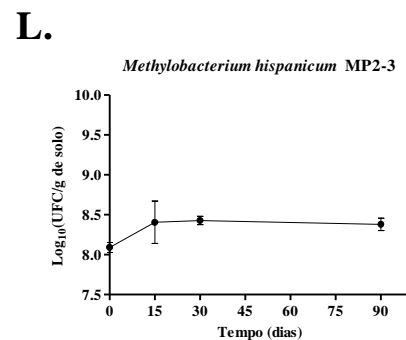
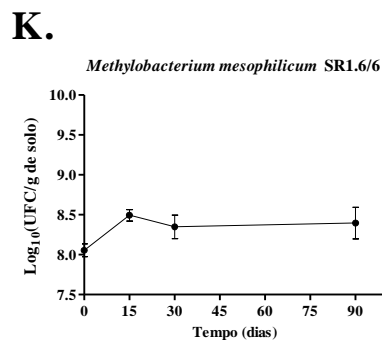
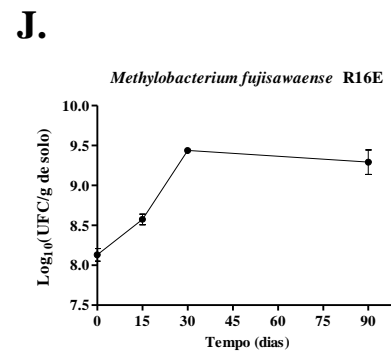
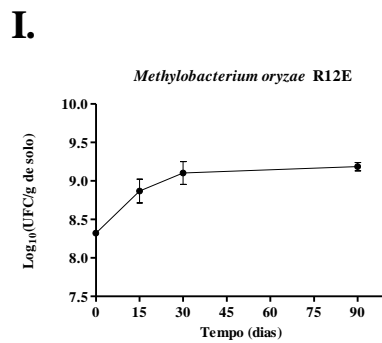
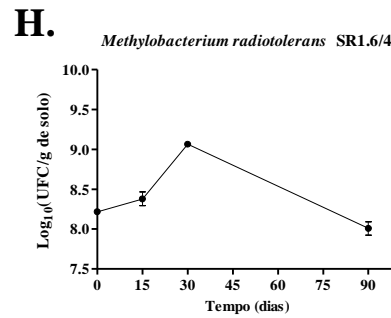
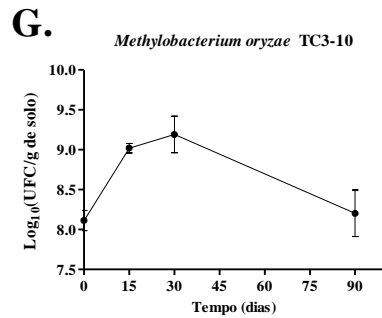


F.



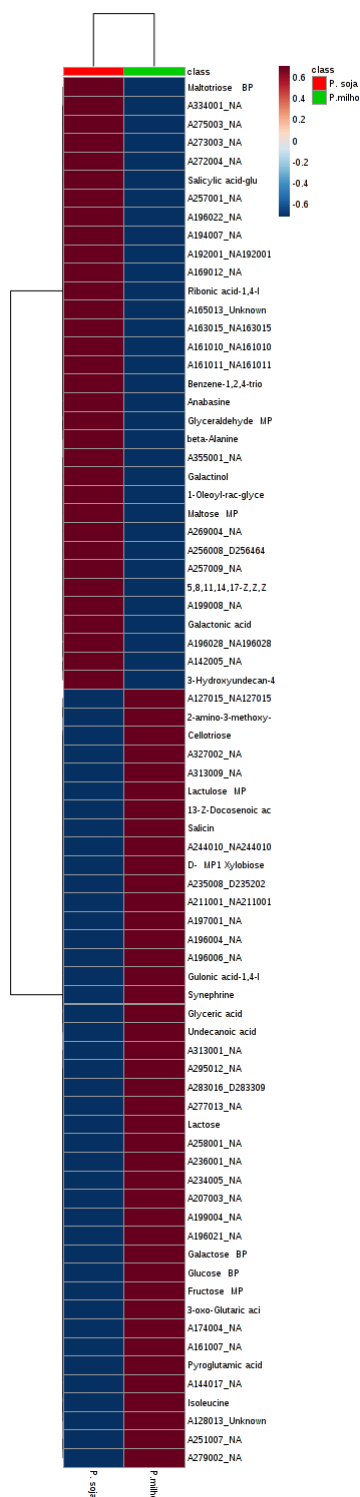
H – Sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylobacterium extorquens* em solo esterilizado.

(Conclusão)



Na figura demonstra-se de forma independente, a sobrevivência no solo esterilizado de cada linhagem. Apresentam-se em escala logarítmica as médias de UFC.g solo⁻¹ ± desvio padrão nos tempos 0, 15, 30 e 90 dias. [A.] *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2; [B.] *Methylobacterium extorquens* AR1.6/8; [C.] *Methylobacterium radiotolerans* F4; [D.] *Methylobacterium oryzae* F7; [E.] *Methylobacterium oryzae* F8; [F.] *Methylobacterium mesophilicum* R14E; [G.] *Methylobacterium Oryzae* TC3-10; [H.] *Methylobacterium radiotolerans* SR1.6/4; [I.] *Methylobacterium oryzae* R12E; [J.] *Methylobacterium fujisawaense*.R16E; [K.] *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6; [L.] *Methylobacterium hispanicum* MP2-3.

I – Heat map com os metabólitos identificados nas plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) sem inoculação



Na figura estão apresentadas as médias da intensidade dos picos dos metabólitos identificados em plântulas de soja e milho sem inoculação. A escala de cores indica a quantidade de cada composto, cor vermelha indica uma maior abundância do metabólito e a cor azul uma menor abundância. O agrupamento do Heatmap foi realizado usando como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de clustering o Ward's linkage.

J – Resultados teste *t* e PCA da comparação dos exsudatos produzidos por plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*)

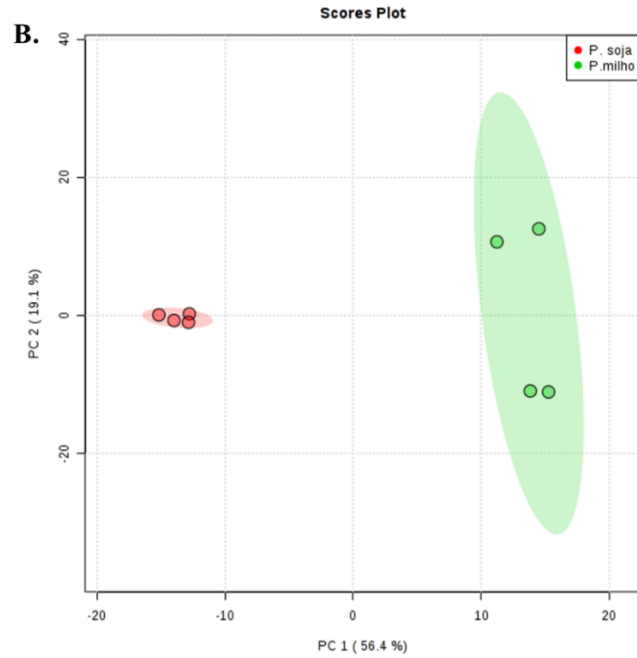
(Continua)

A.

Metabólito	<i>p.value</i>
A272004_NA	3,19E-09
A256008_D256464	5,59E-07
A199008_NA	2,59E-05
A142005_NA	4,98E-05
Galactinol	5,80E-05
Glyceric acid	7,52E-05
A161011_NA161011	1,41E-04
A161010_NA161010	1,65E-04
Fructose MP	2,85E-04
Galactonic acid	3,79E-04
A234005_NA	9,50E-04
Salicin	1,19E-03
A144017_NA	1,57E-03
A165013_Unknown	1,84E-03
A251007_NA	2,06E-03
A269004_NA	2,51E-03
3-oxo-Glutaric acid	7,09E-03
A279002_NA	7,68E-03
A196004_NA	2,20E-02
A273003_NA	6,23e-06
A236001_NA	6,23E-02
A257009_NA	0.00058462
Maltotriose BP	0.0010743
A257001_NA	0.0053966
A127015_NA127015	0.0058465
A197001_NA	0.015083

J – Resultados teste *t* e PCA da comparação dos exsudatos produzidos por plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*)

(Conclusão)



[A.] Resultados do teste *t*, da comparação dos exsudatos vegetais identificados em plântulas de soja e milho; [B.] PCA obtido da comparação dos exsudatos vegetais identificados em plântulas de soja e milho, em verde plântulas de milho e em vermelho plântulas de soja.

K – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2

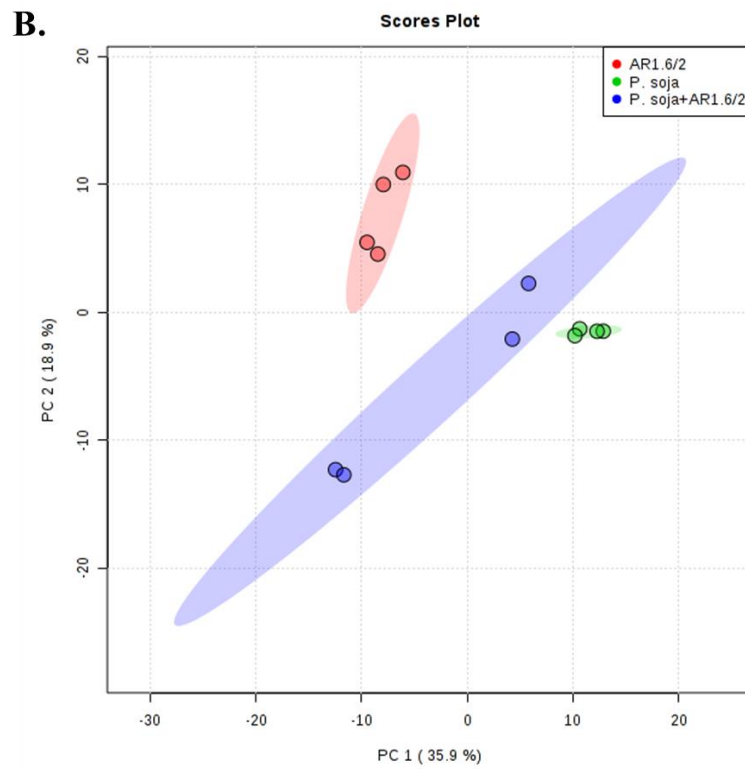
A.

(Continua)

Metabólito	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
A277007_NA	5.55E-15	AR1.6/2 - P. soja; AR1.6/2 - P. soja+AR1.6/2
A256008_D256464	1.29E-12	P. soja - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2; P. soja - P. soja+AR1.6/2
A142005_NA	1.17E-11	P. soja - AR1.6/2; P. soja - P. soja+AR1.6/2
A161010_NA161010	5.36E-11	P. soja - AR1.6/2; P. soja - P. soja+AR1.6/2
Galactinol	1.06E-08	P. soja - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2; P. soja - P. soja+AR1.6/2
A273002_NA	1.71E-07	AR1.6/2 - P. soja; P. soja+AR1.6/2 - P. soja
A194007_NA	3.99E-05	P. soja - AR1.6/2; AR1.6/2 - P. soja+AR1.6/2; P. soja - P. soja+AR1.6/2
Fructose MP	9.00E-05	AR1.6/2 - P. soja; P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - P. soja
A192001_NA192001	0.0001011	P. soja - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2
Galactose BP	0.0009064 1	P. soja - AR1.6/2; P. soja - P. soja+AR1.6/2
Benzene-1,2,4-triol	0.0010077	P. soja - AR1.6/2; P. soja - P. soja+AR1.6/2
A236001_NA	0.0014184	AR1.6/2 - P. soja; AR1.6/2 - P. soja+AR1.6/2
A165013_Unknown	0.001695	P. soja - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2
A269004_NA	0.002219	P. soja - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2
D-alpha, alpha Trehalose	0.003807	AR1.6/2 - P. soja; P. soja+AR1.6/2 - P. soja
Galactonic acid	0.0043972	P. soja - AR1.6/2; P. soja - P. soja+AR1.6/2
1-Oleoyl-rac-glycerol	0.0044224	P. soja - AR1.6/2; P. soja - P. soja+AR1.6/2
A235008_D235202	0.0054784	AR1.6/2 - P. soja; P. soja+AR1.6/2 - P. soja
Lactose	0.00739	P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - P. soja
A144017_NA	0.0075231	P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - P. soja
A251007_NA	0.0077346	P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - P. soja
Maltotriose BP	0.007986	P. soja - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2
N-acetyl-BPMannosamine	0.0094596	P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - P. soja
Altrose BP	0.011921	P. soja+AR1.6/2 - AR1.6/2; P. soja+AR1.6/2 - P. soja
A234005_NA	0.013331	AR1.6/2 - P. soja

K – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2

(Conclusão)



[A.] Valores de p obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de Fisher's least significant difference- LDS [B.] PCA; em vermelho amostras da linhagem AR1.6/2; em azul plantas de soja em interação com a linhagem AR1.6/2 e em verde as plântulas de soja sem inoculação.

L – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium fujisawaense* R16E

(Continua)

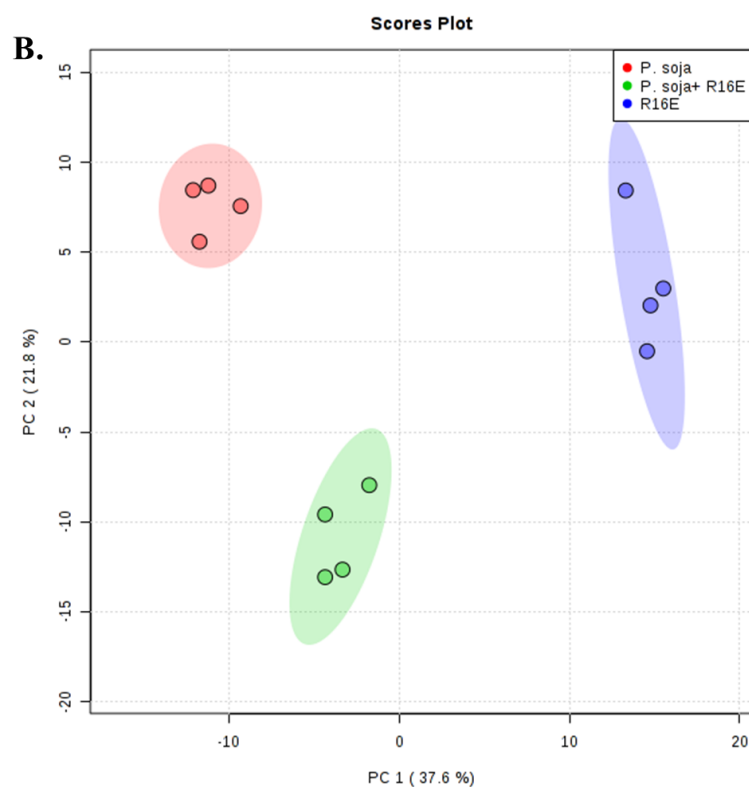
A.

Metabólito	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
A251007_NA	7,77E-10	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
A234005_NA	1,31E-08	P. soja+ R16E - P. soja; R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
A256008_D256464	6,96E-08	P. soja - P. soja+ R16E; P. soja - R16E; P. soja+ R16E - R16E
D-alpha,alpha Trehalose	1,21E-07	P. soja+ R16E - P. soja; R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
5,8,11,14,17-(Z,Z,Z,Z,Z)-n-Eicosapentaenoic acid	2,02E-07	P. soja - P. soja+ R16E; R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
Salicin	2,94E-07	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
A295012_NA	6,03E-06	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
A269004_NA	6,81E-06	P. soja - P. soja+ R16E; P. soja - R16E
Synephrine	5,84E-05	P. soja+ R16E - P. soja; R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
Galactinol	1,22E-04	P. soja - R16E; P. soja+ R16E - R16E
A196004_NA	2,28E-03	P. soja+ R16E - P. soja; P. soja+ R16E - R16E
A258001_NA	1,70E-01	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
A355001_NA	0.0001408	P. soja - P. soja+ R16E; R16E - P. soja+ R16E
A161010_NA161010	0.0005903	P. soja - P. soja+ R16E; P. soja - R16E; P. soja+ R16E - R16E
A235008_D235202	0.0006715	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
A211001_NA211001	0.00068005	P. soja - P. soja+ R16E; R16E - P. soja+ R16E
A257001_NA	0.00069914	P. soja - P. soja+ R16E; P. soja - R16E; P. soja+ R16E - R16E
Isoleucine	0.0007549	P. soja+ R16E - P. soja; P. soja+ R16E - R16E
2,4-diamino-Butanoic acid	0.00086959	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
A161011_NA161011	0.0010511	P. soja - P. soja+ R16E; R16E - P. soja+ R16E
Lactose.1	0.0010683	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
Galactonic acid	0.0011664	P. soja - P. soja+ R16E; P. soja - R16E
A192001_NA192001	0.0012294	P. soja - P. soja+ R16E; P. soja - R16E; R16E - P. soja+ R16E
A194007_NA	0.0012759	P. soja - R16E; P. soja+ R16E - R16E
Gulonic acid-1,4-lactone	0.0014701	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
1-Oleoyl-rac-glycerol	0.0015771	P. soja - R16E; P. soja+ R16E - R16E
A128013_Unknown	0.0020245	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
A283016_D283309	0.0030892	P. soja - R16E; P. soja+ R16E - R16E
Galactose BP	0.0031709	P. soja - R16E; P. soja+ R16E - R16E
Benzene-1,2,4-triol	0.0061223	P. soja - R16E
2-amino-3-methoxy-Benzoic acid	0.0062015	P. soja+ R16E - P. soja; R16E - P. soja

L – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium fujisawaense* R16E

(Conclusão)

Metabólito	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
Maltotriose BP	0.0063413	P. soja - P. soja+ R16E; R16E - P. soja+ R16E
A197001_NA	0.0067396	P. soja - P. soja+ R16E; R16E - P. soja+ R16E
A273002_NA	0.0071255	P. soja+ R16E - P. soja; R16E - P. soja
Glucose BP	0.0071437	P. soja+ R16E - P. soja; P. soja+ R16E - R16E
A275003_NA	0.0072288	P. soja - P. soja+ R16E; P. soja - R16E
Pyroglutamic acid	0.0072449	P. soja+ R16E - P. soja; P. soja+ R16E - R16E
A174004_NA	0.01156	R16E - P. soja; R16E - P. soja+ R16E
Glyceraldehyde MP	0.015404	P. soja+ R16E - R16E
A236001_NA	0.018008	P. soja+ R16E - P. soja
A279002_NA	0.021878	P. soja+ R16E - P. soja
A165013_Unknown	0.027849	P. soja - P. soja+ R16E; P. soja - R16E



[A.] Valores de *p* obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de *Fisher's least significant difference- LDS* [B.] PCA; em vermelho amostras de plantas de soja sem inoculação; em azul a linhagem R16E e em verde plântulas de soja inoculadas com a linhagem R16E.

M – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

A.

(Continua)

Metabólito	p.value	Fisher's LSD
A279002_NA	1.89E-18	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
Glucose BP	2.11E-16	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
Benzene-1,2,4-triol	3.73E-15	P. soja - P.soja+SR1.6/6; P. soja - SR1.6/6
5,8,11,14,17-Z,Z,Z,Z-n-Eicosapentaenoic acid	5.63E-15	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
Fructose MP	4.54E-14	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A256008_D256464	5.34E-14	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A334001_NA	6.23E-13	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A257009_NA	2.03E-12	P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
Pyroglutamic acid	3.58E-12	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A277007_NA	6.17E-12	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
A127015_NA127015	6.35E-12	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
Altrose BP	7.86E-12	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
Isoleucine	1.71E-11	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A258001_NA	4.11E-11	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
Salicin	5.56E-11	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
A234005_NA	6.19E-11	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
A142005_NA	6.66E-11	P. soja - P.soja+SR1.6/6; P. soja - SR1.6/6
A235008_D235202	1.02E-10	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
A207003_NA	1.82E-10	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
A161010_NA161010	2.50E-10	P. soja - P.soja+SR1.6/6; P. soja - SR1.6/6
Galactinol	2.60E-10	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A273002_NA	3.74E-10	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P. soja
allo-Threonine	5.01E-10	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
Lactose.1	5.40E-10	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
Synephrine	6.28E-10	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
Galactonic acid	2.06E-09	P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A211001_NA211001	3.42E-09	P. soja - P.soja+SR1.6/6; SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
A257001_NA	5.21E-09	P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
2,4-diamino-Butanoic acid	1.59E-08	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6

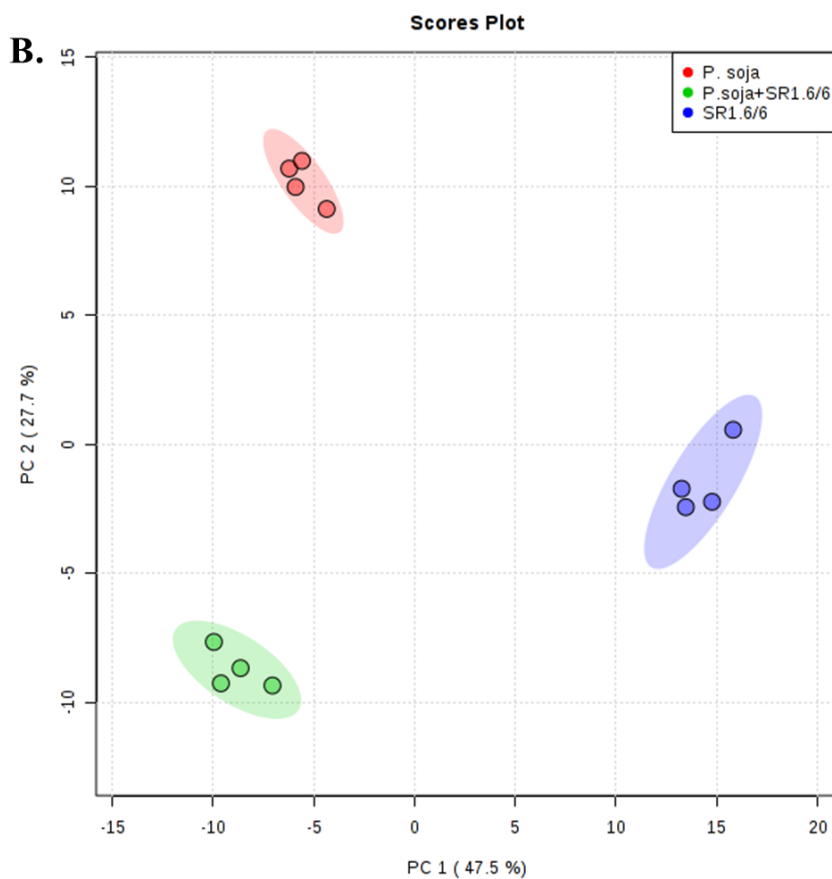
M – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

(Continua)

Metabólito	p.value	Fisher's LSD
A269004_NA	3.10E-08	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A192001_NA192001	3.11E-08	P. soja - P.soja+SR1.6/6; P. soja - SR1.6/6; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
3-oxo-Glutaric acid	2.38E-07	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
Galactose BP	5.73E-07	P. soja - P.soja+SR1.6/6; P. soja - SR1.6/6
A199008_NA	1.00E-06	P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A194007_NA	1.06E-05	P. soja - P.soja+SR1.6/6; P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A174004_NA	3.61E-05	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
Gulonic acid-1,4-lactone	8.93E-05	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A161011_NA161011	0.00036805	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A161007_NA	0.00042181	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
Lactulose MP	0.0011458	P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
D-alpha,alpha Trehalose	0.002123	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P. soja
A295012_NA	0.002292	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P. soja
A273003_NA	0.0030566	P. soja - P.soja+SR1.6/6; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
A251007_NA	0.0072157	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
2-amino-3-methoxy-Benzoic acid	0.0072596	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
Turanose	0.0076276	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
A236001_NA	0.0079742	SR1.6/6 - P. soja; SR1.6/6 - P.soja+SR1.6/6
A291011_D291398	0.0083959	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
Glyceric acid	0.0094153	P.soja+SR1.6/6 - P. soja; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A165013_Unknown	0.016009	P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A199004_NA	0.018155	P. soja - SR1.6/6; P.soja+SR1.6/6 - SR1.6/6
A128013_Unknown	0.019502	SR1.6/6 - P. soja

M – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

(Conclusão)



[A.] Valores de p obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de *Fisher's least significant difference*-LDS [B.] PCA; em vermelho amostras de plantas de soja sem inoculação; em azul a linhagem SR1.6/6 e em verde plântulas de soja inoculadas com a linhagem SR1.6/6.

N – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3

A.

(Continua)

Metabólito	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
2,4-diamino-Butanoic acid	3.02E-19	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
A279002_NA	1.70E-18	P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
D- Nigerosse	6.65E-18	P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
Gentiobiose MP	2.76E-17	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
Benzene-1,2,4-triol	3.47E-17	P. soja - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
Altrose BP	1.12E-16	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
Salicin	5.44E-16	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
A257009_NA	1.03E-15	P. soja - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A295012_NA	6.65E-15	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
A234005_NA	9.38E-15	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
A334001_NA	1.95E-14	P. soja - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A235008_D235202	2.82E-14	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
A199008_NA	3.42E-14	P. soja - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
1-Oleoyl-rac-glycerol	1.70E-13	P. soja - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A161011_NA161011	4.21E-12	MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A211001_NA211001	9.50E-12	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A194007_NA	2.09E-11	P. soja - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A269004_NA	2.05E-10	P. soja - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A192001_NA192001	6.28E-10	P. soja - MP2-3; MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A273003_NA	8.54E-10	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A196004_NA	1.64E-09	P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
5,8,11,14,17-Z,Z,Z,Z,Z-n-Eicosapentaenoic acid	1.23E-08	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A174004_NA	6.87E-07	P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
Synephrine	6.86E-06	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
A355001_NA	1.49E-05	MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A197001_NA	2.12E-05	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A236001_NA	0.00025675	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
A144017_NA	0.00047456	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
Galactinol	0.00063339	P. soja - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - MP2-3

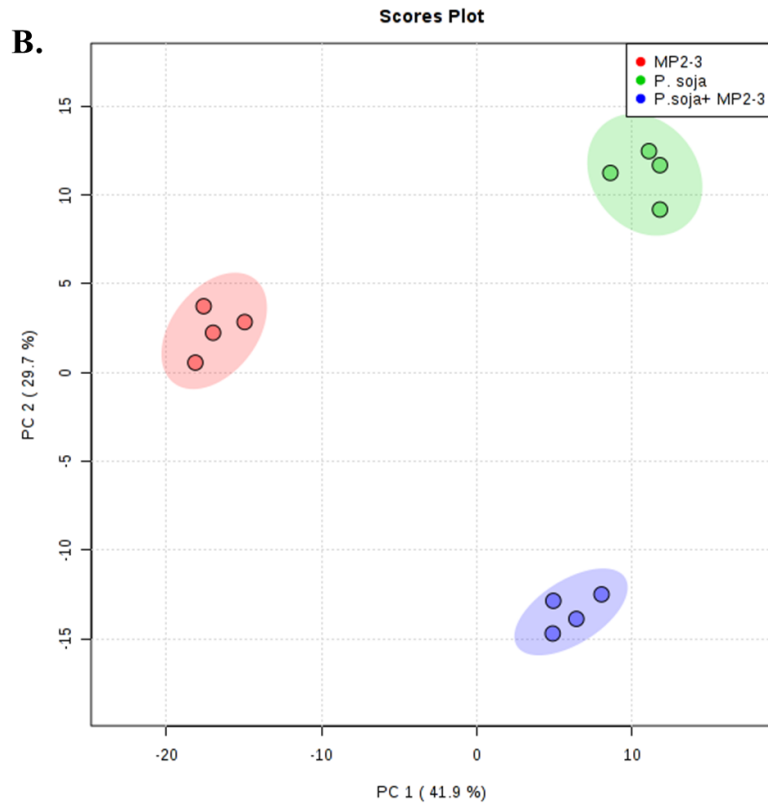
N – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3

(Continua)

Metabólito	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
A257001_NA	0.00071242	P. soja - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
Glucose BP	0.00076989	P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
A275003_NA	0.00093327	MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
Maltotriose BP	0.0010658	P. soja - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - MP2-3
Lactose.1	0.0011112	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
A161010_NA161010	0.001151	P. soja - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - MP2-3
A273002_NA	0.0011652	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
3-oxo-Glutaric acid	0.0014304	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
3-Hydroxyundecan-4-one	0.0016692	MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A277007_NA	0.0017287	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
Fructose MP	0.0022327	MP2-3 - P. soja; P.soja+ MP2-3 - P. soja
Gulonic acid-1,4-lactone	0.0023859	MP2-3 - P. soja; P.soja+ MP2-3 - P. soja
A142005_NA	0.0023896	MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
Galactonic acid	0.0025511	P. soja - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
Salicylic acid-glucopyranoside	0.0030647	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
A165013_Unknown	0.0041476	P. soja - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A327002_NA	0.0043761	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
A169012_NA	0.0047175	MP2-3 - P. soja; MP2-3 - P.soja+ MP2-3
Laminaribiose MP	0.007128	P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
Maltose MP	0.0071331	P. soja - MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3
A127015_NA127015	0.0072651	P.soja+ MP2-3 - MP2-3; P.soja+ MP2-3 - P. soja
Pyroglutamic acid	0.021041	P.soja+ MP2-3 - P. soja
Glyceric acid	0.022053	P.soja+ MP2-3 - P. soja
A272004_NA	0.033892	MP2-3 - P.soja+ MP2-3; P. soja - P.soja+ MP2-3

N – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3

(Conclusão)



[A.] Valores de p obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de *Fisher's least significant difference*-LDS [B.] PCA; em vermelho amostras da linhagem MP2-3; em verde plântulas de soja sem inoculação; em azul plântulas de soja em interação com a linhagem MP2-3.

O – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com o consórcio bacteriano

A. (Continua)

Metabólito	p.value	Fisher's LSD
Salicin	3.52E-21	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
A277007_NA	6.77E-20	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
Gulonic acid-1,4-lactone	2.59E-19	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
2,4-diamino-Butanoic acid	1.54E-16	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
Benzene-1,2,4-triol	2.41E-16	P. soja - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
Synephrine	1.63E-14	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
A199008_NA	1.18E-12	P. soja - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
A234005_NA	1.29E-12	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio; P.soja+Consórcio - P. soja
A295012_NA	2.36E-12	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
A142005_NA	4.09E-12	P. soja - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
A256008_D256464	9.26E-12	P. soja - Consórcio; P.soja+Consórcio - Consórcio
A211001_NA211001	2.42E-11	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
A194007_NA	8.42E-11	P. soja - Consórcio; P.soja+Consórcio - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
D-alpha,alpha Trehalose	1.13E-10	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio; P.soja+Consórcio - P. soja
A196004_NA	1.68E-10	P.soja+Consórcio - Consórcio; P.soja+Consórcio - P. soja
A269004_NA	1.37E-09	P. soja - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
N-acetyl Muramic acid	1.69E-07	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
Galactose BP	2.72E-07	P. soja - Consórcio; P.soja+Consórcio - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
Pyroglutamic acid	2.74E-07	P.soja+Consórcio - Consórcio; P.soja+Consórcio - P. soja
Glyceric acid	4.42E-07	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio; P.soja+Consórcio - P. soja
Fructose MP	1.40E-05	Consórcio - P. soja; P.soja+Consórcio - P. soja
Galactinol	6.33E-05	P. soja - Consórcio; P.soja+Consórcio - Consórcio
A197001_NA	0.00015296	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
A235008_D235202	0.0010823	Consórcio - P. soja; P.soja+Consórcio - P. soja
3-Hydroxyundecan-4-one	0.0012072	Consórcio - P.soja+Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
A165013_Unknown	0.0012619	P. soja - Consórcio; P.soja+Consórcio - Consórcio
Salicylic acid-glucopyranoside	0.0016542	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
Lactose.l	0.0020118	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
A161007_NA	0.0024108	Consórcio - P. soja; P.soja+Consórcio - P. soja
A355001_NA	0.0026109	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio

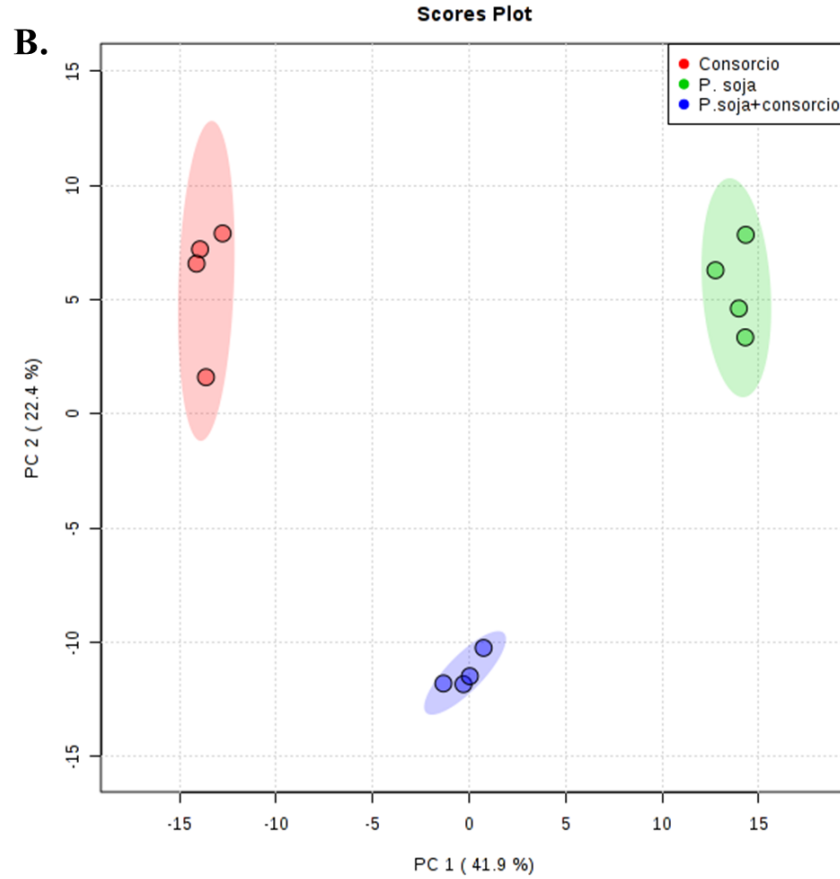
O – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com o consórcio bacteriano

(Continua)

Metabólito	p.value	Fisher's LSD
A192001_NA192001	0.0029658	P. soja - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
A145005_NA	0.0035016	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
3-oxo-Glutaric acid	0.0035514	Consórcio - P. soja; P.soja+Consórcio - P. soja
A257001_NA	0.0056636	P. soja - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
A236001_NA	0.0058187	Consórcio - P. soja; P.soja+Consórcio - P. soja
A161011_NA161011	0.005878	P. soja - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
A257009_NA	0.0061552	P. soja - Consórcio
A161010_NA161010	0.0070376	P. soja - Consórcio
Lactose	0.0071494	Consórcio - P. soja; Consórcio - P.soja+Consórcio
Turanose	0.0072926	P.soja+Consórcio - Consórcio; P.soja+Consórcio - P. soja
Laminaribiose MP	0.0073447	P.soja+Consórcio - Consórcio; P.soja+Consórcio - P. soja
A199004_NA	0.0074253	P. soja - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
Melezitose	0.0074341	P.soja+Consórcio - Consórcio; P.soja+Consórcio - P. soja
A196028_NA196028	0.0076139	P. soja - Consórcio; P. soja - P.soja+Consórcio
13-Z-Docosenoic acid methyl ester	0.0094368	P.soja+Consórcio - Consórcio
1-Oleoyl-rac-glycerol	0.010559	P. soja - Consórcio
Glucose BP	0.011181	Consórcio - P. soja
A144017_NA	0.017246	P.soja+Consórcio - P. soja
A279002_NA	0.020321	P.soja+Consórcio - P. soja
Galactonic acid	0.031908	P. soja - Consórcio; P.soja+Consórcio - Consórcio

O – Resultados análises estatísticas plântulas de soja (*Glycine max*) em interação com o consórcio bacteriano

(Conclusão)



[A.] Valores de p obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de *Fisher's least significant difference*- LDS [B.] PCA; em vermelho amostras do consórcio bacteriano; em verde plântulas de soja sem inoculação; em azul plântulas de soja em interação com o consórcio.

P – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2

(Continua)

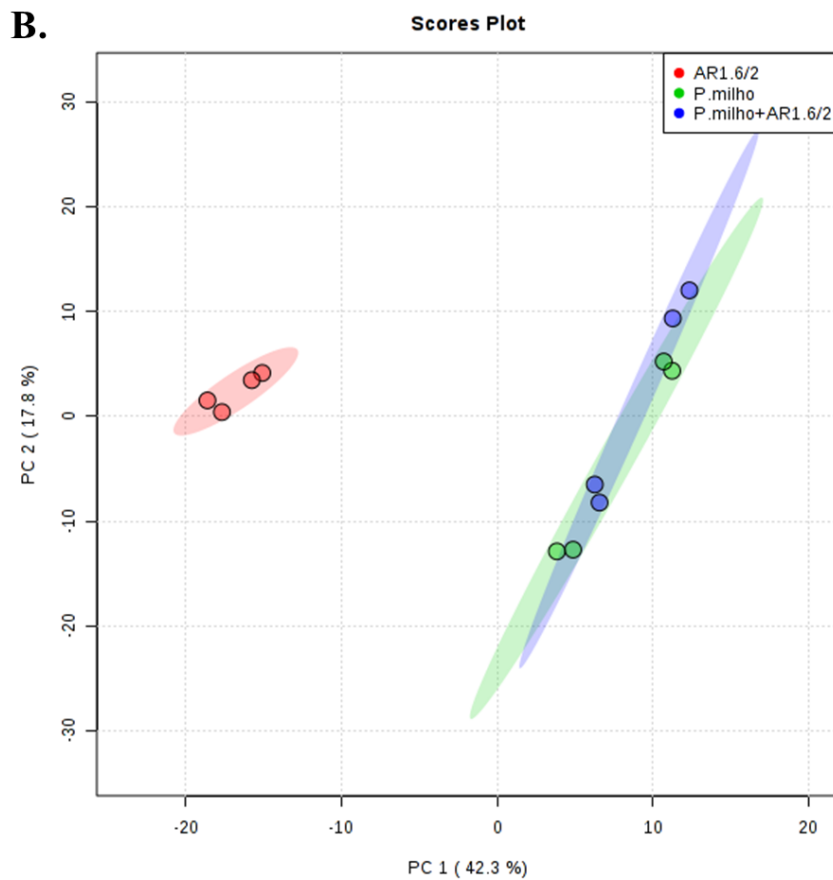
A.

Metabólitos	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
A291011_D291398	2.61E-20	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
D- Nigerose	1.03E-18	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
allo-Threonine	1.90E-17	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
Galactose BP	1.04E-16	P.milho - AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
A256008_D256464	2.25E-16	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
N-acetyl-BPMannosamine	3.68E-16	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
A234005_NA	9.22E-11	P.milho - AR1.6/2; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
A275003_NA	1.10E-10	P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - P.milho
3-oxo-Glutaric acid	6.98E-10	P.milho - AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
Lactulose MP	1.70E-09	P.milho - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2
A196006_NA	3.57E-09	P.milho - AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
Galactonic acid	1.17E-08	P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - P.milho
A236001_NA	3.36E-08	P.milho - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2
Melezitose	6.51E-07	P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - P.milho
Maltotriose BP	4.25E-06	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
A273002_NA	1.30E-05	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
A257009_NA	0.00014476	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
A279002_NA	0.00020642	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
A144017_NA	0.0014932	P.milho - AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
A199004_NA	0.0015166	P.milho - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2
A207003_NA	0.0025732	P.milho - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2
Anabasine	0.0026271	P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - P.milho
1-Oleoyl-rac-glycerol	0.0030586	P.milho - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2
A211001_NA211001	0.0032845	P.milho - AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
A283016_D283309	0.0040686	P.milho - AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
Fructose MP	0.0042319	P.milho - AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
Lactose	0.0046438	P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2; P.milho+AR1.6/2 - P.milho
A128013_Unknown	0.0052256	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
Salicylic acid-glucopyranoside	0.0065759	P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2
A272004_NA	0.0071495	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
Undecanoic acid	0.0072356	P.milho - AR1.6/2; P.milho - P.milho+AR1.6/2
A196021_NA	0.0087384	P.milho+AR1.6/2 - AR1.6/2
A196004_NA	0.013447	P.milho - AR1.6/2
A196022_NA	0.016708	AR1.6/2 - P.milho

P – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com *Methylorubrum extorquens* AR1.6/2

(Conclusão)

Metabólitos	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
A334001_NA	0.020702	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2
A196028_NA196028	0.022627	AR1.6/2 - P.milho
A273003_NA	0.023585	AR1.6/2 - P.milho; AR1.6/2 - P.milho+AR1.6/2



[A.] Valores de *p* obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de *Fisher's least significant difference*- LDS [B.] PCA; em vermelho amostras da linhagem AR1.6/2; em verde plântulas de milho sem inoculação; em azul plântulas de milho em interação com a linhagem AR1.6/2.

Q – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com *Methylobacterium fujisawaense* R16E

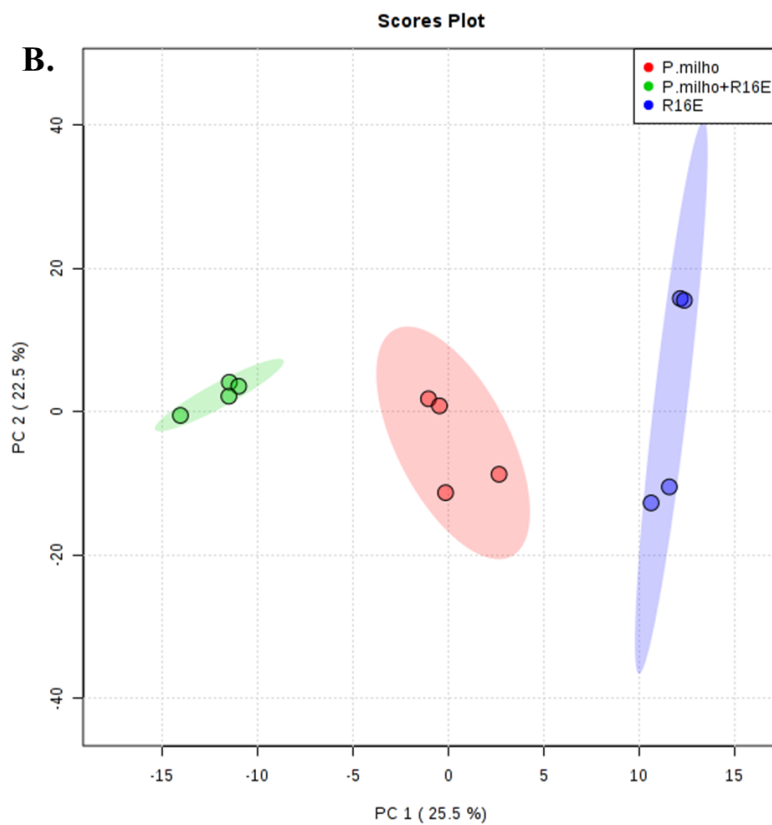
(Continua)

A.

Metabólito	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
Galactose BP	7.01E-17	P.milho - P.milho+R16E; P.milho - R16E
A256008_D256464	3.36E-13	P.milho+R16E - P.milho; P.milho+R16E - R16E
2,4-diamino-Butanoic acid	6.22E-13	P.milho+R16E - P.milho; P.milho+R16E - R16E
A291011_D291398	4.70E-12	P.milho+R16E - P.milho; P.milho+R16E - R16E
Fructose MP	7.21E-12	P.milho - R16E; P.milho+R16E - R16E
beta-Alanine	1.22E-09	R16E - P.milho; R16E - P.milho+R16E
A196006_NA	2.32E-09	P.milho - P.milho+R16E; P.milho - R16E
A273003_NA	0.0016413	P.milho+R16E - P.milho; P.milho+R16E - R16E
A196028_NA196028	0.0018651	P.milho+R16E - P.milho; R16E - P.milho
Lactose	0.0026602	P.milho+R16E - P.milho; P.milho+R16E - R16E
A257009_NA	0.0045945	P.milho - P.milho+R16E; R16E - P.milho+R16E
1-Oleoyl-rac-glycerol	0.0071538	P.milho - P.milho+R16E; P.milho - R16E
3-Hydroxyundecan-4-one	0.0072925	P.milho - P.milho+R16E; P.milho - R16E
A199008_NA	0.0074456	R16E - P.milho; R16E - P.milho+R16E
A277013_NA	0.0076621	P.milho - R16E; P.milho+R16E - R16E
A194007_NA	0.0089212	P.milho - R16E; P.milho+R16E - R16E
A128013_Unknown	0.0090103	R16E - P.milho
Gentiobiose MP	0.010321	P.milho+R16E - P.milho; P.milho+R16E - R16E
A142005_NA	0.011124	R16E - P.milho; R16E - P.milho+R16E
A236001_NA	0.012234	P.milho - P.milho+R16E
A144017_NA	0.012312	P.milho - P.milho+R16E; R16E - P.milho+R16E

Q – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com *Methylobacterium fujisawaense* R16E

(Conclusão)



[A.] Valores de p obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de *Fisher's least significant difference*-LDS [B.] PCA; em vermelho amostras plântulas de milho sem inoculação; em verde plântulas de milho inoculadas com a linhagem R16E e em azul amostras da linhagem R16E

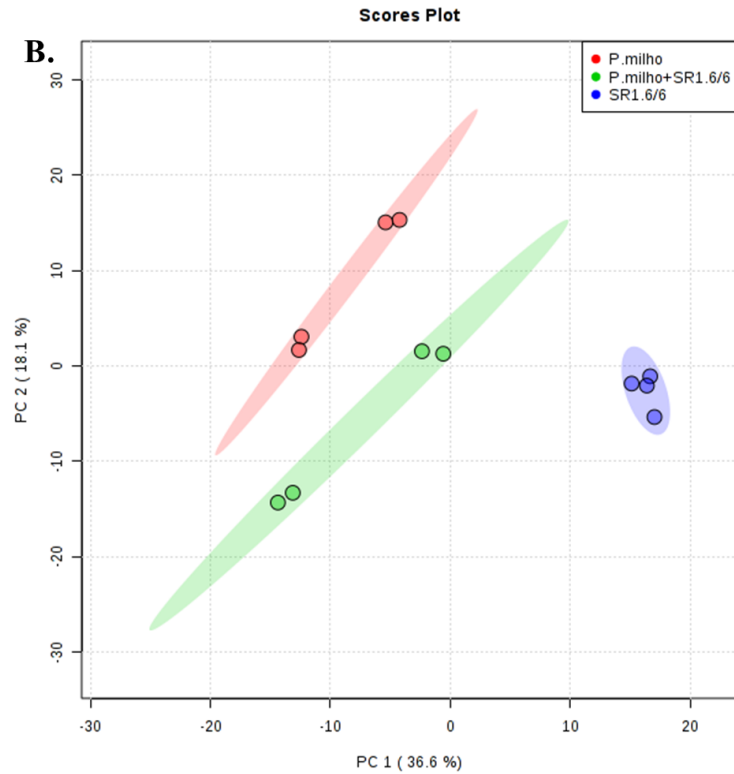
R – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

A. (Continua)

Metabólito	p.value	Fisher's LSD
D- Nigeroose	2.31E-17	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
A199008_NA	3.08E-16	P.milho+SR1.6/6 - P.milho; P.milho+SR1.6/6 - SR1.6/6
A291011_D291398	3.01E-11	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
A279002_NA	2.76E-10	P.milho - P.milho+SR1.6/6; P.milho - SR1.6/6
A283016_D283309	7.43E-10	P.milho - P.milho+SR1.6/6; P.milho - SR1.6/6
A199004_NA	5.19E-09	P.milho - SR1.6/6; P.milho+SR1.6/6 - SR1.6/6
2,4-diamino-Butanoic acid	2.12E-07	P.milho+SR1.6/6 - P.milho; P.milho+SR1.6/6 - SR1.6/6
D-alpha,alpha Trehalose	4.30E-07	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
Maltose MP	8.84E-06	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
3-oxo-Glutaric acid	1.17E-05	P.milho - SR1.6/6; P.milho+SR1.6/6 - SR1.6/6
Maltotriose BP	6.30E-05	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
A128013_Unknown	9.53E-05	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
A273002_NA	0.0001541 5	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
A334001_NA	0.0003238 3	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
Cellotriose	0.0003463 6	P.milho - P.milho+SR1.6/6; SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
Galactose BP	0.0017353	P.milho - SR1.6/6; P.milho+SR1.6/6 - SR1.6/6
N-acetyl-BPMannosamine	0.0055311	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
A196028_NA196028	0.0055718	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
Fructose MP	0.0056304	P.milho - P.milho+SR1.6/6; P.milho - SR1.6/6
A196022_NA	0.0068972	SR1.6/6 - P.milho
A161011_NA161011	0.0071413	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
Melezitose	0.0071567	SR1.6/6 - P.milho; SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
Altrose BP	0.0072055	P.milho+SR1.6/6 - P.milho; P.milho+SR1.6/6 - SR1.6/6
Undecanoic acid	0.007213	P.milho - P.milho+SR1.6/6; P.milho - SR1.6/6
Benzene-1,2,4-triol	0.0075845	P.milho - P.milho+SR1.6/6; P.milho - SR1.6/6
A174004_NA	0.0078037	P.milho - P.milho+SR1.6/6; P.milho - SR1.6/6
Gentiobiose MP	0.0079146	P.milho+SR1.6/6 - P.milho; P.milho+SR1.6/6 - SR1.6/6
Pyroglutamic acid	0.0096957	SR1.6/6 - P.milho+SR1.6/6
A196004_NA	0.01019	P.milho - SR1.6/6
A257009_NA	0.011505	P.milho - SR1.6/6
A355001_NA	0.01491	P.milho+SR1.6/6 - SR1.6/6

R – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6

(conclusão)



[A.] Valores de p obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de *Fisher's least significant difference*-LDS [B.] PCA; em vermelho amostras plântulas de milho sem inoculação; em verde plântulas de milho inoculadas com a linhagem SR1.6/6 e em azul amostras da linhagem SR1.6/6

S – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3

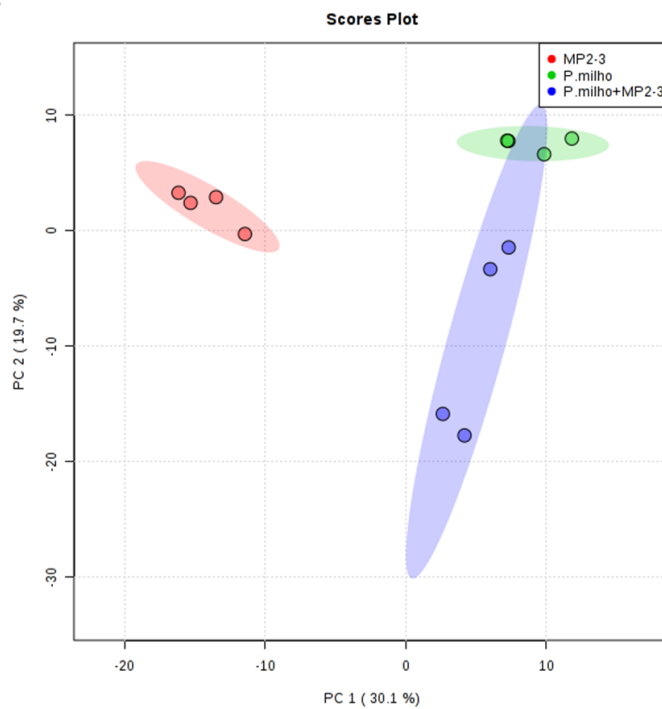
A. (Continua)

Metabólito	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
D- Nigerosse	7.07E-17	MP2-3 - P.milho; MP2-3 - P.milho+MP2-3
Galactose BP	1.27E-16	P.milho - MP2-3; P.milho - P.milho+MP2-3
Lactulose MP	5.79E-12	P.milho - MP2-3; P.milho+MP2-3 - MP2-3
N-acetyl Muramic acid	1.88E-11	MP2-3 - P.milho; MP2-3 - P.milho+MP2-3
A196006_NA	4.43E-09	P.milho - MP2-3; P.milho - P.milho+MP2-3
beta-Alanine	1.05E-08	MP2-3 - P.milho; MP2-3 - P.milho+MP2-3
A273003_NA	8.46E-08	MP2-3 - P.milho; MP2-3 - P.milho+MP2-3
A142005_NA	1.72E-07	MP2-3 - P.milho; P.milho+MP2-3 - P.milho
A273002_NA	8.42E-07	MP2-3 - P.milho; MP2-3 - P.milho+MP2-3
Maltotriose BP	0.00010766	MP2-3 - P.milho; MP2-3 - P.milho+MP2-3
Undecanoic acid	0.00022094	P.milho - MP2-3; P.milho+MP2-3 - MP2-3; P.milho+MP2-3 - P.milho
Pyroglutamic acid	0.0016202	MP2-3 - P.milho; MP2-3 - P.milho+MP2-3
A283016_D283309	0.0016704	P.milho - MP2-3; P.milho+MP2-3 - MP2-3
A257001_NA	0.0017721	MP2-3 - P.milho; MP2-3 - P.milho+MP2-3
Lactose	0.0056056	P.milho+MP2-3 - MP2-3; P.milho+MP2-3 - P.milho
A128013_Unknown	0.005862	MP2-3 - P.milho; MP2-3 - P.milho+MP2-3
A279002_NA	0.0061458	MP2-3 - P.milho+MP2-3; P.milho - P.milho+MP2-3
Altrose BP	0.0073707	P.milho+MP2-3 - MP2-3; P.milho+MP2-3 - P.milho
A161007_NA	0.0082835	P.milho+MP2-3 - MP2-3
Fructose MP	0.0102	P.milho - MP2-3; P.milho+MP2-3 - MP2-3
A234005_NA	0.011216	P.milho - MP2-3; P.milho+MP2-3 - MP2-3
2,4-diamino-Butanoic acid	0.013118	P.milho+MP2-3 - P.milho
A196028_NA196028	0.013662	MP2-3 - P.milho
N-acetyl- BPMannosamine	0.013796	MP2-3 - P.milho
A257009_NA	0.014812	MP2-3 - P.milho+MP2-3; P.milho - P.milho+MP2-3

S – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com *Methylobacterium hispanicum* MP2-3

(Conclusão)

B.



[A.] Valores de p obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de *Fisher's least significant difference*- LDS [B.] PCA; em vermelho amostras linhagem MP2-3; em verde plântulas de milho sem inoculação e em azul plântulas de milho inoculadas com a linhagem MP2-3.

T – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com o consórcio bacteriano

A. (Continua)

Metabólito	p.value	Fisher's LSD
A277007_NA	5.37E-20	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
A142005_NA	1.92E-19	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
2,4-diamino-Butanoic acid	1.25E-17	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
Melezitose	4.65E-17	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
Galactose BP	6.56E-17	P.milho - Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
A257009_NA	2.05E-14	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
N-acetyl- BPMannosamine	3.57E-14	Consórcio - P.milho; P.milho+Consórcio - P.milho
D- Nigerose	5.99E-14	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
A196028_NA196028	1.87E-13	Consórcio - P.milho; P.milho+Consórcio - P.milho
A199008_NA	3.18E-13	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio; P.milho+Consórcio - P.milho
beta-Alanine	7.45E-11	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
A279002_NA	1.19E-10	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
Lactulose MP	2.92E-10	P.milho - Consórcio; P.milho+Consórcio - Consórcio
3-oxo-Glutaric acid	3.50E-10	P.milho - Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
allo-Threonine	1.04E-09	P.milho+Consórcio - Consórcio; P.milho+Consórcio - P.milho
A283016_D283309	1.46E-09	P.milho - Consórcio; P.milho+Consórcio - Consórcio
A236001_NA	7.54E-09	Consórcio - P.milho+Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
A196004_NA	8.56E-08	P.milho - Consórcio; P.milho+Consórcio - Consórcio
A127015_NA127015	2.85E-05	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
A251007_NA	5.37E-05	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
A257001_NA	0.00012572	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
Salicin	0.000307	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
1-Oleoyl-rac-glycerol	0.00041382	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
Maltotriose BP	0.00044019	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
A275003_NA	0.0004631	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio; P.milho+Consórcio - P.milho
Benzene-1,2,4-triol	0.00060386	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
A313001_NA	0.00079583	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
A313009_NA	0.00093659	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
A199004_NA	0.0012536	P.milho - Consórcio; P.milho+Consórcio - Consórcio
2-amino-3-methoxy-Benzoic acid	0.0014734	P.milho+Consórcio - Consórcio; P.milho+Consórcio - P.milho
A196006_NA	0.0015959	P.milho - Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio

T – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com o consórcio bacteriano

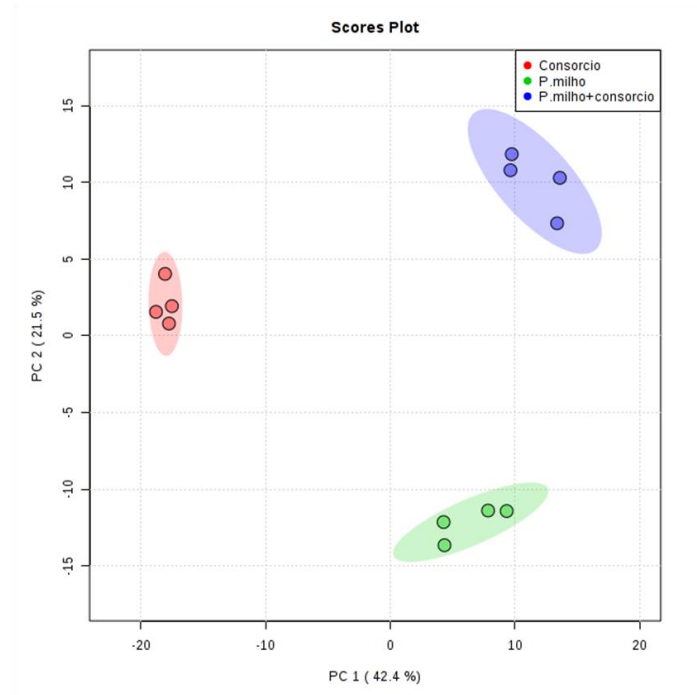
(Continua)

Metabólito	<i>p.value</i>	Fisher's LSD
A196022_NA	0.0018932	Consórcio - P.milho; P.milho+Consórcio - P.milho
A258001_NA	0.0021708	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
Fructose MP	0.0026467	P.milho - Consórcio; P.milho+Consórcio - Consórcio
A161011_NA161011	0.0027506	Consórcio - P.milho; P.milho+Consórcio - P.milho
A161007_NA	0.0054761	P.milho+Consórcio - Consórcio; P.milho+Consórcio - P.milho
Ribonic acid-1,4-lactone	0.0072041	P.milho+Consórcio - Consórcio; P.milho+Consórcio - P.milho
Undecanoic acid	0.0072211	P.milho - Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
D- MPI Xylobiose	0.0072491	P.milho+Consórcio - Consórcio
Galactinol	0.0072511	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
Altrose BP	0.0072608	P.milho+Consórcio - Consórcio; P.milho+Consórcio - P.milho
3-Hydroxyundecan-4-one	0.0072894	P.milho - Consórcio; P.milho - P.milho+Consórcio
A269004_NA	0.0073425	P.milho+Consórcio - Consórcio; P.milho+Consórcio - P.milho
A163015_NA163015	0.0091036	P.milho+Consórcio - Consórcio
A327002_NA	0.01577	P.milho+Consórcio - Consórcio
A128013_Unknown	0.018596	Consórcio - P.milho+Consórcio
D-alpha,alpha Trehalose	0.02418	Consórcio - P.milho; Consórcio - P.milho+Consórcio
Glyceric acid	0.025982	Consórcio - P.milho+Consórcio

T – Resultados análises estatísticas plântulas de milho (*Zea mays*) em interação com o consórcio bacteriano

(Conclusão)

B.



[A.] Valores de p obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de *Fisher's least significant difference*- LDS [B.] PCA; em vermelho amostras do consórcio bacteriano; em verde plântulas de milho sem inoculação e em azul plântulas de milho inoculadas com o consórcio bacteriano.

ANEXOS

A - Análises físico-químicas dos solos utilizados nos experimentos descritos nos itens 4.4 e 4.8

RESULTADOS DAS ANÁLISES				
Parâmetros Macronutrientes	Unidade	LQ	2019.026.024.001	2019.026.024.002
Acidez Potencial (H+Al)	mmol _c dm ⁻³	-	47	31
Alumínio (Al)	mmol _c dm ⁻³	-	1	1
Cálcio (Ca) (resina)	mmol _c dm ⁻³	-	43	65
Fósforo (P) (resina)	mg dc ⁻³	0,50	80	69
Magnésio (Mg)	mmol _c dm ⁻³	-	11	16
pH (CaCL ₂)	-	-	6,8	5,4
Potássio (K)	mmol _c dm ⁻³	-	2	<0,9
S Fosfato de cálcio	mg dm ⁻³	-	5	69
Soma das bases S.B.	mmol _c dm ⁻³	-	56	81,4
CTC	mmol _c dm ⁻³	-	103	112,4
Sat. bases	(V%)	-	54	72
Sat. Al	(m%)	-	2	1
Parâmetros Micronutrientes	Unidade	LQ	2019.026.024.001	2019.026.024.002
Boro (B)	mg dm ⁻³	-	0,42	0,35
Cobre (Cu)	mg/L	0,05	0,9	1,6
Ferro (Fe)	mg/L	0,05	68	46
Manganês (Mn)	mg/L	0,05	0,7	0,9
Zinco (Zn)	mg/L	0,05	1,1	0,9
Parâmetros Matéria Orgânica	Unidade	LQ	2019.026.024.001	2019.026.024.002
Matéria Orgânica	g dm ⁻³	-	96	44
Física	Unidade	LQ	2019.026.024.001	2019.026.024.002
AF	g kg ⁻¹		275	387
AG	g kg ⁻¹		290	241
AT	g kg ⁻¹		565	627
Argila (c/ disp)	g kg ⁻¹		300	310
Silte	g kg ⁻¹		135	62
Classe de Textura	-		md-arg	md-arg

LQ: Limite Quantificação do Método;

Na tabela [2019.026.024.001] solo utilizado para o experimento de 4.4 Sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* no solo esterilizado, item 4.4.; [2019.026.024.002] solo utilizado para o experimento de sobrevivência de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens* no solo (item 4.8); [SB] Soma das bases trocáveis; [CTC] Capacidade de troca de cátions; [V.] Saturação da CTC por bases; [m] Saturação por alumínio. As análises físico-químicas foram desenvolvidas pela empresa DMSA.

B - Comparação de genomas de *Methylobacterium* spp. e *Methylorubrum extorquens*

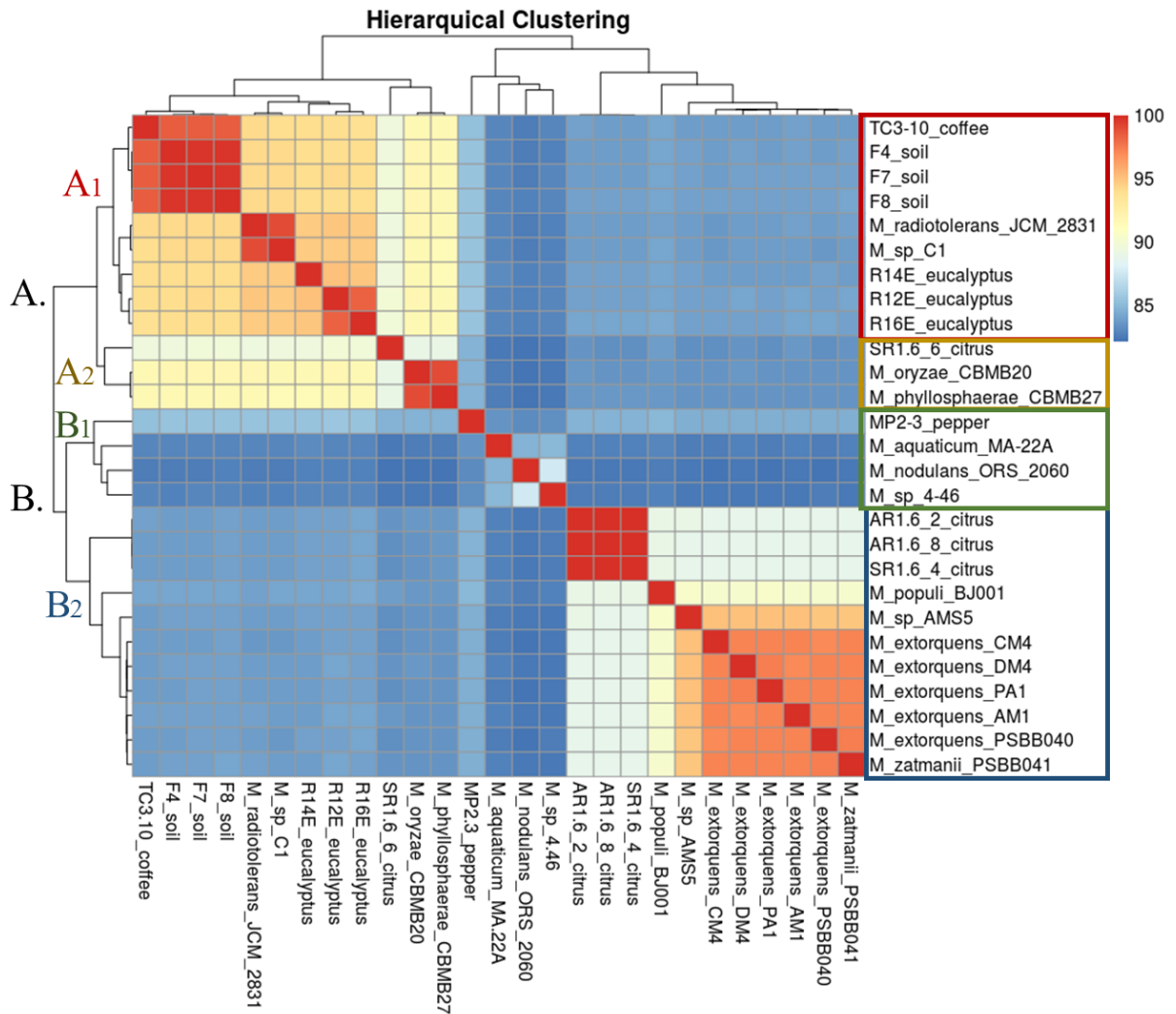


Gráfico desenvolvido pelo Dr. Deibs Barbosa (Instituto de Química-USP). Para a construção do gráfico, primeiramente foi calculada a medida *Average Nucleotide Identity* (ANI) par-a-par, para todas as linhagens utilizando a ferramenta “*get_homologues*” (CONTRERAS-MOREIRA; VINUESA, 2013), posteriormente, foi construído o gráfico *heatmap* utilizando o pacote “*pheatmap*” na plataforma R com a opção de agrupamento hierárquico por distância euclidiana entre as linhagens. No gráfico, à similaridade é mostrada por um gradiente de cor entre o 100% e 85%, sendo linhagens com um 100% de similaridade mostradas com uma cor vermelha. Adicionalmente, se mostram rodeadas por um quadro de cor vermelho as linhagens agrupadas no subgrupo A₁ (F4,F7,F8,R12E,R14E,R16E e TC3-10), em um quadro amarelo as linhagens do subgrupo A₂ (SR1.6/6), num quadro verde o subgrupo B₁, com a linhagem MP2-3 e num quadro azul os isolados do subgrupo B₂ (AR1.6/2, AR1.6/8 E SR1.6/4).