

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

Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros

Andréa Cristina Bogas

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Andréa Cristina Bogas
Bióloga

Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros

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

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

**Piracicaba
2010**

RESUMO

Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros

A interação bactéria-planta é um processo complexo que envolve diversos fatores bióticos e abióticos, podendo resultar em interações neutras, benéficas ou patogênicas. O gênero *Methylobacterium* tem sido descrito como endófito em diferentes plantas hospedeiras, podendo beneficiá-las por meio da promoção de crescimento vegetal e do controle de fitopatógenos. Em citros, este endófito coloniza o mesmo nicho que patógenos, e, assim, muitas espécies desse gênero são interessantes candidatas ao controle simbiótico contra *Xylella fastidiosa*. É conhecido que o processo de interação *Methylobacterium*-bactéria é coordenado por genes cuja expressão é regulada pelo sistema *Quorum Sensing* (QS), o qual utiliza N-acil-homoserina lactonas (AHLs) como moléculas sinalizadoras, importantes, entre outras coisas, para a formação de biofilme, encontrado em muitas plantas como estratégia de colonização bacteriana. No entanto, os mecanismos envolvidos na interação *Methylobacterium*-planta são ainda pouco compreendidos. Dessa forma, o presente trabalho buscou estudar, de diferentes maneiras, a interação entre *Methylobacterium* spp. e citros, avaliando os efeitos dessas bactérias sobre o crescimento de plântulas e a variação da expressão gênica. Neste contexto, foi verificado que a especificidade da interação bactéria-planta e a escolha do método de inoculação das bactérias são importantes para a geração de resultados benéficos sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento da planta hospedeira. Possivelmente, a produção de AIA e a fixação biológica de nitrogênio foram os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de citros por *Methylobacterium* spp. neste estudo. Com relação à origem, essas bactérias parecem ser transmitidas horizontalmente em plantas cítricas. Visando empregar *Methylobacterium* spp. no controle de fitopatógenos em citros, *M. extorquens* AR1.6/2 foi geneticamente modificada para expressar uma endoglicanase A (EgIA). Por meio de microscopia eletrônica de varredura, foi verificado que a bactéria modificada colonizou a superfície e o interior de *Catharanthus roseus*, planta modelo para experimentos com bactérias endofíticas e *X. fastidiosa*. Além disso, quando inoculada junto com *X. fastidiosa*, essas bactérias compartilharam o xilema das plântulas, sugerindo que durante a colonização e estabelecimento no hospedeiro estas bactérias poderiam interagir. Estudando a ação de uma AHL sobre a expressão de genes envolvidos na interação entre *M. mesophilicum* SR1.6/6-planta, foi observado que a presença dessa molécula foi importante na ativação da expressão dos genes *mxoF*, relacionado ao estabelecimento e metabolismo metilotrófico da bactéria; *pat*, relacionado a vantagens adaptativas e competitivas durante a colonização da planta; e *acdS*, envolvido com o metabolismo bacteriano e modulação de níveis hormonais na planta. A expressão dos genes *crtl* e *sss*, envolvidos com respostas a estresse e transporte de compostos, respectivamente, e do gene *phoU*, relacionado com patogenicidade, não foram alterados na presença da AHL nas condições avaliadas. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que *Methylobacterium* spp. interagem com plântulas de *Citrus* spp., demonstrando especificidade entre a espécie de planta e da bactéria endofítica. Foi observado também que esta interação ocorre não somente com a planta, mas possivelmente com

outras bactérias que habitam o xilema de citros. Além disso, esta interação *Methylobacterium*-citros-bactérias do xilema pode ser regulada por AHLs.

Palavras-chave: *Methylobacterium* spp.; *Citrus* spp; Promoção de crescimento; AHL

ABSTRACT

Evaluation of the interaction between *Methylobacterium* spp. and citrus

The bacterium-plant interaction is a complex process that involves several biotic and abiotic factors that may result in neutral, beneficial or harmful interactions. The *Methylobacterium* genus has been described as endophytic bacterium in different host plants. It could benefit the plants by growth promotion and control of phytopathogens. In citrus, this endophyte colonizes the same pathogen-niche, and therefore many species of this genus are interesting candidates to symbiotic control against *X. fastidiosa*. It is known that the process of *Methylobacterium*-bacteria interaction is coordinated by genes whose expression is regulated by the Quorum Sensing (QS), which uses N-acyl homoserine lactones (AHLs) as signaling molecules. Its importance is associated with the biofilm formation, found in many plants as a strategy for bacterial colonization. However, the mechanisms in *Methylobacterium*-plant interactions are still poorly understood. Thus, this work studied in different ways, the interaction between *Methylobacterium* spp. and citrus, evaluating the effects of these bacteria on the seedling growth and the variation of gene expression. In this context, it was found that the specificity of bacteria-plant interactions and the bacterial inoculation methods are important to generate beneficial results on seed germination and host plant development. Possibly, IAA production and nitrogen biological fixation were the major involved mechanisms in citrus growth promotion by *Methylobacterium* spp. These bacteria seem to be transmitted horizontally in citrus plant. Aiming to employ *Methylobacterium* spp. to control phytopathogens in citrus plant, *M. extorquens* AR1.6/2 was genetically modified to express an endoglucanase A (EglA) enzyme. Using scanning electron microscopy was observed that the modified bacteria colonized the surface and interior of the *Catharanthus roseus*, a model plant for experiments with endophytic bacteria and *X. fastidiosa*. Furthermore, when inoculated with *X. fastidiosa*, these bacteria shared the seedlings xylem, suggesting that during the colonization and establishment in the host, these bacteria could interact. Studying the action of a AHL on the expression of genes involved in the interaction between *M. mesophilicum* SR1.6/6-plant it was observed that the presence of this molecule was important in the activation of genes expression *mxαF* (related to the establishment and methylotrophic metabolism); *pat* (related to adaptive and competitive advantages during the plant colonization); *acdS* (involved in bacterial metabolism and modulation of hormone levels in the plant). Expression of *crtI* and *sss*, involved in bacterial stress and transport of compounds, respectively, and *phoU*, related with pathogenicity were not altered in the presence of AHL in the evaluated conditions. The results of this study demonstrated that *Methylobacterium* spp. interact with seedlings of *Citrus* spp., showing specificity between plant species and endophytic bacteria. Also, it was observed that this interaction occurs not only with the plant molecular modification levels, but possibly with other bacteria that inhabit the xylem of citrus. Also, this interaction *Methylobacterium*-citrus-xylem bacteria may be regulated by AHLs.

Keywords: *Methylobacterium* spp.; *Citrus* spp.; Growth-promotion; AHL

1 INTRODUÇÃO

Entender a natureza do estabelecimento das interações bactéria-planta é um constante desafio. Potencialmente, todas as plantas vivem em associação com bactérias, as quais podem colonizar os espaços intercelulares (colonização endofítica); a superfície vegetal (colonização epifítica); ou atacar os tecidos causando doenças (colonização patogênica), sendo que algumas populações podem flutuar entre esses estilos de vida. Embora com propósitos diferentes, bactérias simbiotes e patogênicas utilizam mecanismos em comum para se estabelecerem na planta, mas nenhuma dessas relações é totalmente compreendida, embora saibamos que essas comunidades podem ser afetadas por diversos fatores bióticos e abióticos.

Estudos recentes têm mostrado que a comunicação bactéria-bactéria e/ou bactéria-planta pode ser regulada por meio de um sistema denominado *Quorum Sensing* (QS). Esse sistema é baseado na produção de sinais moleculares difusíveis que permitem às bactérias controlar mudanças adaptativas e fisiológicas na população. N-acil-homoserina lactonas (AHLs) são as moléculas sinalizadoras predominantes entre bactérias Gram-negativas, e são comuns àquelas que estabelecem associação com plantas. AHLs são importantes, entre outras coisas, para a formação de biofilmes, uma estratégia chave para a sobrevivência e dominância das bactérias na planta, favorecendo o estabelecimento de relações patogênicas ou simbióticas. Moléculas que mimetizam AHLs têm sido encontradas em plantas, e isso tem sido visto como uma estratégia de adaptação para comunicação com bactérias específicas ou ainda para proteção contra patógenos.

Nas últimas décadas os estudos sobre bactérias endofíticas têm aumentado, focando principalmente na utilização desses microrganismos como agentes de controle biológico de doenças, promotores de crescimento vegetal, fitoremediadores de áreas poluídas, e/ou vetores para a expressão de genes heterólogos em plantas.

Methylobacterium é um importante gênero de bactérias endofíticas que interagem de forma simbiótica com diferentes espécies de plantas. Em citros, tem sido consistentemente isolado como endófito, além de ser descrito como o principal gênero na interação entre a comunidade endofítica de citros e *X. fastidiosa*. A possibilidade de

modificar geneticamente *Methylobacterium* spp. e reintroduzi-las em seu nicho original, onde existe o problema ou acesso ao patógeno alvo, poderia se consistir de um ponto chave para o controle simbiótico por tais bactérias.

Além da possibilidade de *Methylobacterium* spp. atuarem como agentes de controle de fitopatógenos, através do qual também poderiam exercer efeitos indiretos sobre o crescimento vegetal, esses endófitos poderiam ainda favorecer a citricultura promovendo o crescimento vegetal de forma direta, possivelmente por meio da produção de fitohormônios e fixação de nitrogênio, melhorando, assim, a produtividade e/ou a qualidade dos pomares cítricos. Isso seria de grande importância à citricultura brasileira, uma vez que o Brasil destaca-se como o maior produtor de citros e também o maior exportador de suco de laranja do mundo.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivos: i) avaliar a capacidade de *Methylobacterium* spp. promoverem crescimento de citros; ii) modificar geneticamente *Methylobacterium* para expressão heteróloga visando o estudo da interação com *X. fastidiosa* e o controle simbiótico de fitopatógenos em citros; iii) avaliar o efeito da AHL sobre a expressão de genes envolvidos na interação *Methylobacterium*-planta.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

