

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA**

**ESTUDOS SOBRE A COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA POR
BACTÉRIAS**

ZAYDA PIEDAD MORALES MOREIRA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JULHO-2014**

ESTUDOS SOBRE A COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA POR BACTÉRIAS

ZAYDA PIEDAD MORALES MOREIRA

Engenheira em Biotecnologia
Escuela Politécnica del Ejército, 2012

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza
Co-Orientadora: Elizabeth Amélia
Alves Duarte

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JULHO – 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Zayda Piedad Morales Moreira**

Dra. Elizabeth Amélia Alves Duarte
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Co-orientadora)

Dr. Marcos Antonio Machado
Instituto Agronômico de Campinas - Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"

Dr. Leandro Lopes Loguercio
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola a _____”

A mis 4 fantásticos y sobre todo a ti.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A ti meu querido “flaco”, não tenho palavras para descrever o quão importante é na minha vida, obrigada por seu infinito amor e presença constante.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelo apoio institucional e capacitação profissional.

À FAPESB e a CAPES pela concessão da bolsa durante o período do curso.

Ao LAPEM da UEFS por permitir o uso das instalações quando foi requerido.

Ao Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, em Cordeirópolis – SP, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos em Biologia molecular.

A meus orientadores Jorge e Elizabeth pela direção durante esses anos, assim como pela confiança, apoio, paciência e amizade. Obrigada por compartilhar comigo suas experiências, conselhos e transmitir valores éticos e morais que enriqueceram minha vida profissional e pessoal.

Ao Thiago d’Oliveira pela sua valiosa contribuição na realização deste projeto, assim como pela predisposição em ajudar sempre.

À Marcia Cazzeta por me auxiliar desde o início, mesmo estando longe, assim como pelos conselhos e ajuda.

Aos colegas do laboratório, em especial à Any, pela companhia, constantes estímulos e agradáveis momentos de descontração.

Aos meus 4 fantásticos e tantos outros familiares, por acreditar em mim e meus sonhos. Amo vocês!

Ao meu grupo de amigos “Pro-fest” Adailson, Paty, Branca Aline, Augusto, Tâmara, Adri, Silvo, Vini e Lari pela amizade e apoio durante os últimos 24 meses, faltam palavras para expressar a importância de todos vocês nesta caminhada.

Agradeço a minha “Brazilian people” pelo carinho recebido, casal de amigos maravilhosos que junto ao Johnnie e Bromets Guy, me fizeram sentir em família. Obrigada por tanto apoio, paciência, confiança e carinho.

À Cirila, Neto, Eva, Andreia e todas as pessoas incríveis da família que me acolheram com os braços abertos desde o primeiro dia que cheguei ao Brasil.

Aos amigos que estão longe, mas que sempre estiveram na torcida mandando energias positivas.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu profundo e sincero agradecimento.

Gracias, muchas gracias! Se les quiere!

“Ever tried. Ever failed. No matter.
Try Again. Fail again. Fail better.”
(Samuel Beckett)

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Sistema gnotobiótico usado para estudos de colonização de diversas plantas..... 6

Figura 2. Mapa estrutural dos elementos BOX..... 8

Figura 3. Representação gráfica do *Directional Genome Walking*. P1 e P2 representam os *primers* utilizados na obtenção de sequências que flanqueiam a região conhecida representada em vermelho..... 9

Capítulo 1

Figure 1. Maximum-likelihood tree showing the identity of the organism identified as *B. amyloliquefaciens* 629.....35

Figure 2. Host and tissue preferences by endophytic bacteria *B. amyloliquefaciens* 629 seven days after seed microbiolization. Number of colony-forming units (CFU) per gram of fresh tissue. (A) Under sterile conditions; (B) Under non-sterile conditions in greenhouse..... 35

Capítulo 2

Figura 1. Preferência de colonização endofítica em diferentes hospedeiros e tecidos vegetais por *E. cloacae* 7 dias depois da microbiolização das sementes. Unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido fresco. (A) Condições estéreis (B) Condições não estéreis em casa de vegetação.46

Figura 2. Colonização endofítica das folhas de pepino pela variante resistente a rifampicina 344 rif^R e mutantes KAN. Os resultados estão apresentados como médias de 3 repetições. Os * (asteriscos) indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de t entre o tipo selvagem e os mutantes. As plantas foram crescidas em condições estéreis e a avaliação foi feita 5 dias após a microbiolização.....46

Figura 3. Mapa físico dos genes de *E. cloacae* contendo o EZ::TN <KAN-2>. (A) Mutante M3. (B) Mutante M4 e (C) Mutante M5. As sequências foram obtidas por meio do caminharmento no genoma..... 48

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1. Percentage of colonization of plant tissues by fungi under non-sterile conditions.	36
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 2

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados no <i>Directional Genome Walking</i> e na confirmação da inserção do <i>transposon</i> EZ::TN<Kan-2>.....	45
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
1. Bactérias endofíticas	2
2. Benefícios conferidos por bactérias endofíticas.....	3
3. <i>Enterobacter cloacae</i>	3
4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5
5. Métodos para o estudo da colonização endofítica.....	5
5.1. Sistema Gnotobiótico	5
5.2 Mutações ao acaso.....	6
5.3 BOX PCR.....	7
5.4 Directional Genome Walking	8
REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 1	24
1. Abstract.....	25
2. Introduction	25
3. Materials and methods	27
3.1 Bacterial strains and culture conditions	27
3.2 Seedlings inoculation and endophytic colonization study	27
4. Results and Discussion	28
5. Concluding remarks	29
6. Acknowledgements.....	30
7. References	30
CAPÍTULO 2	37
RESUMO	38
ABSTRACT.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40

2.	MATÉRIAS E MÉTODOS	41
2.1	Isolado bacteriano e condições de cultivo	41
2.2	Geração de isolados resistentes a Rifampicina	41
2.3	Teste para conhecer a preferência de <i>E. cloacae</i> 344 rif ^R na colonização de diferentes hospedeiros e tecidos vegetais	41
2.4	Transformação de <i>E. cloacae</i> 344 rif ^R	42
2.5	Extração de DNA	43
2.6	Verificação dos mutantes por BOX PCR	43
2.7	Microbiolização e ensaios de colonização endofítica	43
2.8	Avaliação da colonização endofítica	44
2.9	Análises estatísticas	44
2.10	Sequenciamento dos genes interrompidos	44
3.	RESULTADOS	45
4.	Discussão	47
	REFERÊNCIAS	53
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62

RESUMO

MORALES, Zayda Piedad. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, Julho 2014. **Estudos sobre a colonização endofítica por bactérias.** Orientador: Jorge Teodoro de Souza. Co-orientadora: Elizabeth Amélia Alves Duarte.

Considerando a importância do estudo de bactérias endofíticas e seus efeitos benéficos para as plantas, verificamos que as cepas de *Enterobacter cloacae* 344 e *Bacillus amyloliquefaciens* 629 ambas isoladas de plantas saudáveis de cacau *Theobroma cacao* L., são potencialmente boas colonizadoras. Elas apresentam sítios distintos de colonização em condições estéreis e em casa de vegetação. Alterações abióticas e bióticas intrínsecas a cada ambiente levaram à maior colonização das bactérias testadas em condição estéril, particularmente neste trabalho. Possivelmente devido à ausência ou menor efeito de competição em ambientes estéreis contrapondo aos testes em casa de vegetação com substrato não estéril. Esse fator também pode explicar a relação inversa no desenvolvimento de bactérias endofíticas comparada com a população de fungos observada em testes preliminares em placa de Petri com meio BDA em ambas as condições estudadas. Adicionalmente, os testes entre tecidos diferentes (raiz, caule e folha) dos genótipos de feijão, cacau, milho e pepino mostraram que há maior colonização nas folhas, seguida de caule e em menor proporção em raiz. A partir desses resultados direcionamos os estudos moleculares com *E. cloacae* 344 utilizando a estratégia de mutação ao acaso na prospecção de genes possivelmente relacionados com a colonização endofítica. Uma vez que a colonização de plantas por bactérias endofíticas pode causar alterações em nível transcricional, traducional ou catalítico do metabolismo vegetal que precisam ser estudados para que os efeitos benéficos das endofíticas sejam aproveitados.

ABSTRACT

MORALES, Zayda Piedad. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, July 2014. **Studies on endophytic colonization by bacteria.** Advisors: Jorge Teodoro de Souza. Co-Advisor: Elizabeth Amélia Alves Duarte.

Considering the importance of the study of endophytic bacteria and their beneficial effects to plants, we found that *Enterobacter cloacae* strain 344 and *Bacillus amyloliquefaciens* strain 629, both isolated from healthy *Theobroma cacao* L. trees, potentially colonize different host and plant tissues under both sterile and greenhouse conditions. The abiotic and biotic changes, intrinsic to each environment, have led to increased colonization of bacteria tested in sterile conditions. This could be possibly due to the absence or reduced effect of competition in sterile environments in contrast to tests in a greenhouse with non-sterile substrate. This factor may also explain the inverse relationship found in the development of endophytic bacteria compared with the observed populations of fungi in preliminary tests in Petri dishes with PDA medium. Moreover, tests between different tissues (root, stem and leaf) of beans cacao, corn and cucumber genotypes showed that there is increased colonization in the leaves of these crops, followed by the stems and to a lesser extent the roots. From these results we direct our molecular studies toward using with *E. cloacae* 344, with the strategy of random mutations, in the search for genes possibly related to endophytic colonization. This is justified by the fact that colonization of plants by endophytic bacteria can cause changes at transcriptional, translational or catalytic levels in plant metabolism, which need to be studied in order to better explore the beneficial effects of endophytic microbes.

INTRODUÇÃO

As interações entre plantas e bactérias são muito estudadas, sobretudo sob os aspectos patogênicos e benéficos. Dentre as bactérias consideradas benéficas, estão as endofíticas, que são caracterizadas por proporcionarem benefícios ou manterem relações neutras com as plantas. Este grupo de microorganismos vem sendo muito estudados nos últimos anos por suas potenciais aplicações biotecnológicas na agricultura.

Um aspecto de grande interesse científico é o estudo da colonização das plantas por bactérias. A colonização é essencial para que as bactérias benéficas possam desempenhar atividades como promoção de crescimento, controle biológico de patógenos e à tolerância a estresses (YUAN et al., 2012; NAVEED et al., 2014a; NAVEED et al., 2014b). Muitas informações estão disponíveis sobre a colonização da rizosfera por bactérias, incluindo o papel de diversos genes no processo de colonização de raízes (LUGTENBERG et al., 2001; VORHOLT, 2012). Por outro lado, a colonização por bactérias endofíticas tem sido pouco estudada.

Bactérias endofíticas dos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus* estão entre as mais frequentemente encontradas na microbiota endofítica nativa de várias espécies de plantas (SESSITSCH et al., 2012; ARORA et al., 2014). Neste trabalho, bactérias destes gêneros são utilizadas como modelos para o estudo de alguns aspectos da colonização endofítica.

No primeiro capítulo utilizou-se *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 629), descrita previamente como endofítica de cacau e promotora de crescimento (LEITE et al., 2013) para o estudo de sua preferência de colonização em diferentes hospedeiros e tecidos vegetais.

No segundo capítulo utilizou-se *Enterobacter cloacae* 344, para o estudo de sua preferência de colonização e é apresentada a estratégia de mutação ao acaso para determinar a função de genes na colonização endofítica.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas são aquelas que habitam o interior da planta hospedeira sem causar dano aparente (HALLMANN et al., 1997), ou ainda, não são fitopatogênicas, pelo menos em parte do seu ciclo de vida (WILSON, 1995). As bactérias endofíticas têm sido encontradas em tecidos de numerosas espécies vegetais, colonizando-as de forma ativa, local, sistêmica ou em estado latente. Já foram isoladas α , β , e γ Proteobacterias, Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacterias a partir de culturas de importância econômica, como por exemplo soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004), arroz (ENGELHARD et al., 2000; ROSENBLUETH et al., 2004), banana (WEBER et al., 1999; MARTÍNEZ et al., 2003; ROSENBLUETH et al., 2004), cana-de-açúcar (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988; OLIVARES et al., 1996), abacaxi (WEBER et al., 1999), café (JIMÉNEZ-SALGADO et al., 1997), citros (ARAÚJO et al., 2002), milho (McINROY; KLOPPER, 1995; ZINNIEL et al., 2002), trigo (CONN; FRANCO, 2004), entre outros. A composição das comunidades bacterianas endofíticas parece ser bastante imprevisível, já que se observa uma variação considerável da microbiota entre plantas da mesma espécie (HARDOIM et al., 2008). Também foi relatado que uma mesma bactéria pode colonizar diferentes espécies vegetais, mostrando que provavelmente não existe uma especificidade estrita entre o micro-organismo e a planta (ZINNIEL et al., 2002).

Atualmente sabe-se que as bactérias endofíticas provêm de diversas origens tais como ambiente rizosférico (SESSITSCH et al., 2002; COMPANT et al., 2005; HARDOIM et al., 2008), da carposfera, antosfera, laimosfera, espermosfera, caulosfera e filosfera (HARDOIM et al., 2008). Quanto à transmissão, pode ocorrer através das sementes (HALLMANN et al., 1997; COOMBS e FRANCO, 2003) ou por propagação vegetativa, transmitindo à próxima geração seus endofíticos (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). As principais portas de entrada são ferimentos, pelos radiculares, células intactas da epiderme, estômatos, lenticelas e radículas em germinação (HUANG, 1986).

Vários estudos em diferentes plantas hospedeiras demonstraram que bactérias colonizam preferencialmente a rizosfera, mas também foram observadas na endorriza, caules, folhas e dentro de órgãos reprodutivos (LAMB et al., 1996; QUADT- HALLMANN; KLOEPPER, 1996; WELBAUM et al., 2004; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; COMPANT et al., 2011).

2. Benefícios conferidos por bactérias endofíticas

Os efeitos benéficos do microbioma endofítico bacteriano, na maioria dos casos, é conferido por interações metabólicas. Metabólitos produzidos por bactérias endofíticas, além de serem necessários na interação específica e comunicação com a planta hospedeira, desempenham um papel fundamental na competição contra outros micro-organismos e defesa e defesa da planta contra herbívoros (BRADER et al., 2014). As bactérias endofíticas tem que se adaptar ao ambiente específico da planta que elas colonizam e, por conseguinte, é provável que os metabólitos produzidos por elas sejam diferentes dos produzidos pelas bactérias da rizosfera e do solo. Como as endofíticas obrigatórias aparentemente enfrentam menor competição, ocorre menor produção de metabolitos envolvidos com defesa e competição e aumento daqueles envolvidos com o processo de interação com o hospedeiro (STURZ et al., 2000).

As endófitas produzem uma variedade de metabólitos que podem ser usados na medicina, na agricultura e na indústria (STROBEL, 2012). Podem promover o crescimento das espécies vegetais, suprimir patógenos, ajudar na solubilização de fosfato e na assimilação de nitrogênio pelas plantas e também contribuem para a remoção de contaminantes do solo por fitorremediação (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; MOORE et al. 2006; GERMAINE et al., 2006; LUO et al., 2011; HO et al., 2012; ZHANG et al., 2014)

3. *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae é uma Gama-proteobactéria Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae. Dentro desta família, o gênero *Enterobacter* é mais relacionado com *Klebsiella* (DEANGELIS et al., 2011).

Treze genomas do gênero *Enterobacter* estão depositados em bancos de dados públicos e seis destes estão associados a plantas. Os genomas sequenciados incluem: *Enterobacter* sp. 638, uma bactéria endofítica isolada de álamo (TAGHAVI et al., 2010), R4-368, endofítica de pinhão-manso (MADHAIYAN et al., 2013), *E. cloacae* ENHKU01, endofítica de pimenta (*Capsicum annuum*) (LIU et al., 2012), P101, endofítica de uma gramínea (*Panicum virgatum*) (HUMANN et al., 2014), EcWSU1, um patógeno de cebola (*Allium cepa*) (HUMANN et al., 2011), *E. asburiae* L1 isolada de folhas de alface (LAU et al., 2013), *E. cloacae* subsp. *cloacae* ATCC13047, ECNIH2 e *E. aerogenes* EA1509E, que são patógenos oportunistas humanos (REN et al., 2010; DIENE et al., 2012), os degradadores de lignina *E. lignolyticus* SCF1 (DEANGELIS et al., 2011) e *E. asburiae* LF7a (MANTER et al., 2011) e finalmente dois produtores de 2,3 butanodiol, *E. aerogenes* KCTC 2190 (SHIN et al., 2012) e *E. cloacae* subsp. *dissolvens* SDM (XU et al., 2012).

Enterobacter foi relatada como promotora de crescimento em diversas plantas, incluindo o milho (MORALES et al., 2010; NAVEED et al., 2014), arroz (SHANKAR et al., 2011), cacau (LEITE et al., 2013) e girassol (SHAHID et al., 2012). Essa promoção de crescimento está associada à liberação de compostos voláteis como o 2,3-butanediol (RYU et al., 2003), a sínteses de sideróforos (GIONGO et al., 2010) e produção de enzimas como a ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) deaminase (LI et al., 2000). Em associação com Canola (*Brassica napus*), *Enterobacter* apresenta características promissoras para fitorremediação (NIE et al., 2002). É capaz de suprimir o tombamento provocado por *Pythium ultimum* em pepino, ervilha, beterraba, algodão e milho (HADAR et al., 1983; NELSON, 1987; MAO et al., 1998). *Enterobacter* também controla *Rhizopus* spp. em pêssego (WILSON et al., 1987) e *Sclerotinia homoeocarpa* em grama (NELSON; CRAFT, 1991). Apresenta efeitos benéficos em associação com outros micro-organismos, tais como *Pseudomonas mendocina*, por exemplo, onde estimula a proliferação de esporos de *Pasteuria penetrans*, melhorando a eficiência no controle de *Meloidogyne incognita* (DUPONNOIS et al., 1999).

4. *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens é um bacilo Gram-positivo com flagelos peritríquios e endósporos centrais. As células muitas vezes aparecem como longas cadeias contrárias de muitas outras espécies de *Bacillus* que formam células individuais. *Bacillus amyloliquefaciens* é relacionado com *B. subtilis*, e outras duas espécies que compõem o grupo de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* (PRIEST et al., 1987). *Bacillus amyloliquefaciens* foi relatada como produtora de potentes antibióticos e outros metabólitos secundários para o biocontrole de patógenos de plantas, como iturina A, surfactina e fengicina, amylolysin e o sideróforo bacillibactina (ARGUELLES-ARIAS et al., 2009; YUAN et al., 2012; ARGUELLES-ARIAS et al., 2013). Foi descrita também a produção de bacilomicina D pelo isolado SQR9 (XU, et al., 2013). *Bacillus amyloliquefaciens* promove o crescimento de espécies vegetais por meio da produção de auxinas (TALBOYS et al., 2014) e ácido indolacético (IDRIS et al., 2007), por exemplo. Dezoito genomas de *Bacillus amyloliquefaciens* foram relatados nos bancos de dados públicos, dos quais *B. amyloliquefaciens* FZB42, SQR9, CC178, Y2, it-45, a subespécie *plantarum* UCMB5113, UCMB5033, UCMB5036 e AS43.3, possuem propriedades promotoras de crescimento e supressoras de patógenos de plantas (CHEN et al., 2007; HE et al., 2012). Outras são utilizadas na indústria como, por exemplo, *B. amyloliquefaciens* TA208 para produção de guanosina e ribovirina (ZHANG et al., 2011).

5. Métodos para o estudo da colonização endofítica

5.1. Sistema Gnotobiótico

O desenvolvimento de um sistema gnotobiótico (Figura 1) foi crucial para o estudo de colonização de rizosfera por *Pseudomonas* promotoras de crescimento. O sistema está baseado na utilização de sementes inoculadas com bactérias de tipo selvagem e mutante em competição em um ambiente estéril. A bactéria tipo selvagem é incluída porque serve como padrão interno e permite detectar a diminuição da colonização de pelo menos alguns dos mutantes (SIMONS et al., 1996). O sistema apresenta vantagens sobre a utilização de solo, como por

exemplo uma melhor reprodutibilidade da bactéria teste na ausência de competição com os micro-organismos nativos do solo e *screening* mais eficiente de mutantes para a sua capacidade de colonização. Este sistema funciona bem para tomate, rabanete, batata, pepino e trigo (SIMONS et al., 1996).

Outros vários autores adotaram esta metodologia para estudos de antagonismo e biocontrole (CHIN-A-WOENG et al., 1998; CHIN-A-WOENG et al., 2000), comunidades microbianas na rizosfera (BLOEMBERG et al., 2000), teste de cepas rizosféricas mutantes geradas por mutação ao acaso (DEKKERS et al., 1998b) e mutação sitio dirigida (CAPDEVILA et al., 2004).

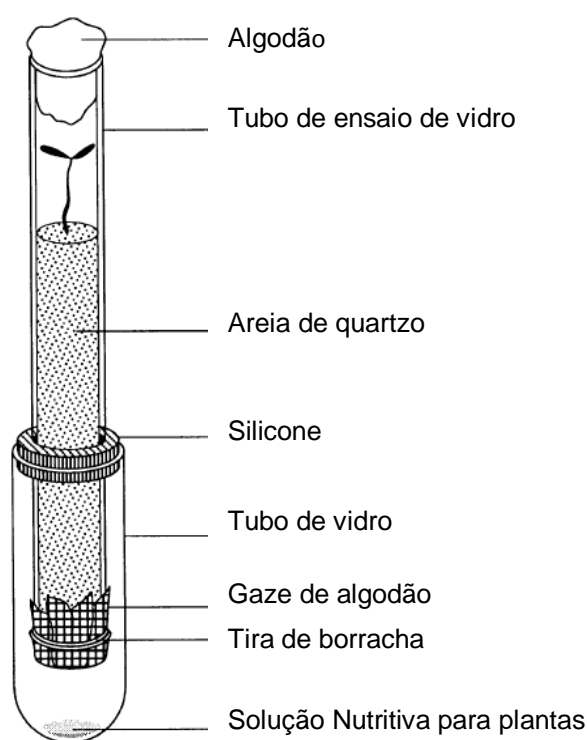


Figura 1. Sistema gnotobiótico usado para estudos de colonização de diversas plantas (SIMONS et al., 1996).

5.2 Mutações ao acaso

A geração de um nocaute (*knockout*) de um gene é a principal forma de se iniciar o estudo de sua função. A utilização de métodos de mutagênese que permitam a descoberta de novos genes envolvidos no processo de colonização é de grande importância no estudo de bactérias benéficas. A inserção aleatória de

transposons permite a identificação de sequências que podem regular a expressão de genes, além de genes que codificam proteínas que compõem a rota metabólica de diferentes processos envolvidos com colonização (DEKKERS et al., 1998a; LUGTENBERG; DEKKERS et al., 1999; ROBERTS et al., 2007). Outro mecanismo utilizado é a geração de mutantes através de recombinação homóloga ou mutação sítio-dirigida (LI et al., 2000).

5.3 BOX PCR

Famílias de pequenos elementos repetitivos intercalados e conservados no genoma foram descritos em eubactérias. Três famílias foram identificadas, incluindo a sequência REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e o elemento BOX (HULTON et al., 1991; MARTIN et al., 1992). Subramanian et al. (1992) aproveitaram a presença desses elementos de DNA para realizar rápidos mapeamentos físicos de genomas. Por outro lado, Versalovic et al. (1994) descreveram a utilização destes elementos repetitivos como marcadores para obter um perfil ou *fingerprint* específico para cada genoma analisado (o perfil resultante serve como uma “impressão digital” de cada genoma). Esses *fingerprints* gerados são utilizados para avaliar diversidade genética em diferentes tipos de micro-organismos associados a plantas (GUO et al., 2014; ARSHIYA et al., 2014), sedimentos (ETTOUMI et al., 2013), amostras clínicas (BEGOVIĆ et al., 2013), entre outros.

Os elementos BOX (Figura 2) são um mosaico de sequências repetitivas compostas de várias combinações de três subunidades boxA, boxB e boxC com 59, 45 e 50 pares de bases de extensão, respectivamente (MARTIN et al., 1992). A subunidade A é altamente conservada e distribuída em bactérias. Por essa razão o *primer* BOX-A1R desenhado a partir de subunidade A é o mais utilizado para executar o BOX-PCR *fingerprinting* em bactérias (KOEUTH et al., 1995)

Quando se trabalha com variantes resistentes a rifampicina é possível conferir o padrão e o perfil genético da cepa original mediante uma BOX-PCR como foi observado no trabalho de Arias et al. (2003). Assim, essa metodologia pode ser aplicada a mutantes gerados por inserção de um *transposon*, quando se quer compara-los com o tipo selvagem (VERMA et al., 2001).

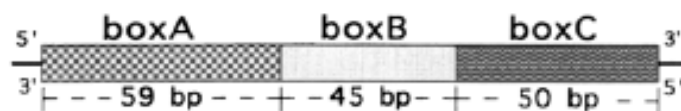


Figura 2. Mapa estrutural dos elementos BOX (Koeuth et al., 1995).

5.4 Directional Genome Walking

Directional Genome Walking é uma técnica desenvolvida por Mishra et al. (2002), para amplificar sequências desconhecidas de DNA, flanqueadoras de sequências conhecidas (Figura 3). Consiste em duas reações de PCR. A primeira PCR amplifica um fragmento de DNA a partir de uma extremidade da sequência conhecida até as regiões flanqueadoras desconhecidas, usando um *primer* biotilado desenhado a partir da sequência conhecida e 4 *primers* “caminhadores”, em reações separadas. Esses últimos diferem uns dos outros na sua extremidade 3', onde as primeiras 4 bases são arbitrariamente fixadas para cada um (teoricamente, a combinação da sequência de quatro bases presente no 3' -pode existir uma vez em cada 256 pb no DNA genômico). As quatro bases seguintes são completamente degeneradas. A porção restante 5' é idêntica e arbitrariamente fixada.

A segunda PCR (nested PCR) é realizada usando o primeiro produto de PCR como molde, depois de passar pela imobilização com estreptavidina e lavagem que permite a remoção de amplificações não específicas. Para a realização da segunda PCR é necessária a utilização de um segundo *primer* específico que é desenhado a partir da sequência conhecida e um quinto *primer* “caminhador”, a qual é a extremidade 5' dos “caminhadores” mencionados anteriormente. A posição e direção do caminhar no genoma durante a PCR são determinadas pelo *primer* biotilado.

Para determinar o número de cópias do *transposon* no genoma de um mutante é essencial uma análise de *Southern Blot*, uma técnica comumente empregada em biologia molecular (DEKKERS et al., 1998b; DÖRR et al., 1998; BAPTISTA et al., 2010; ROBERTS et al., 2011; BUDIHARJO et al., 2014; XU et al., 2014).

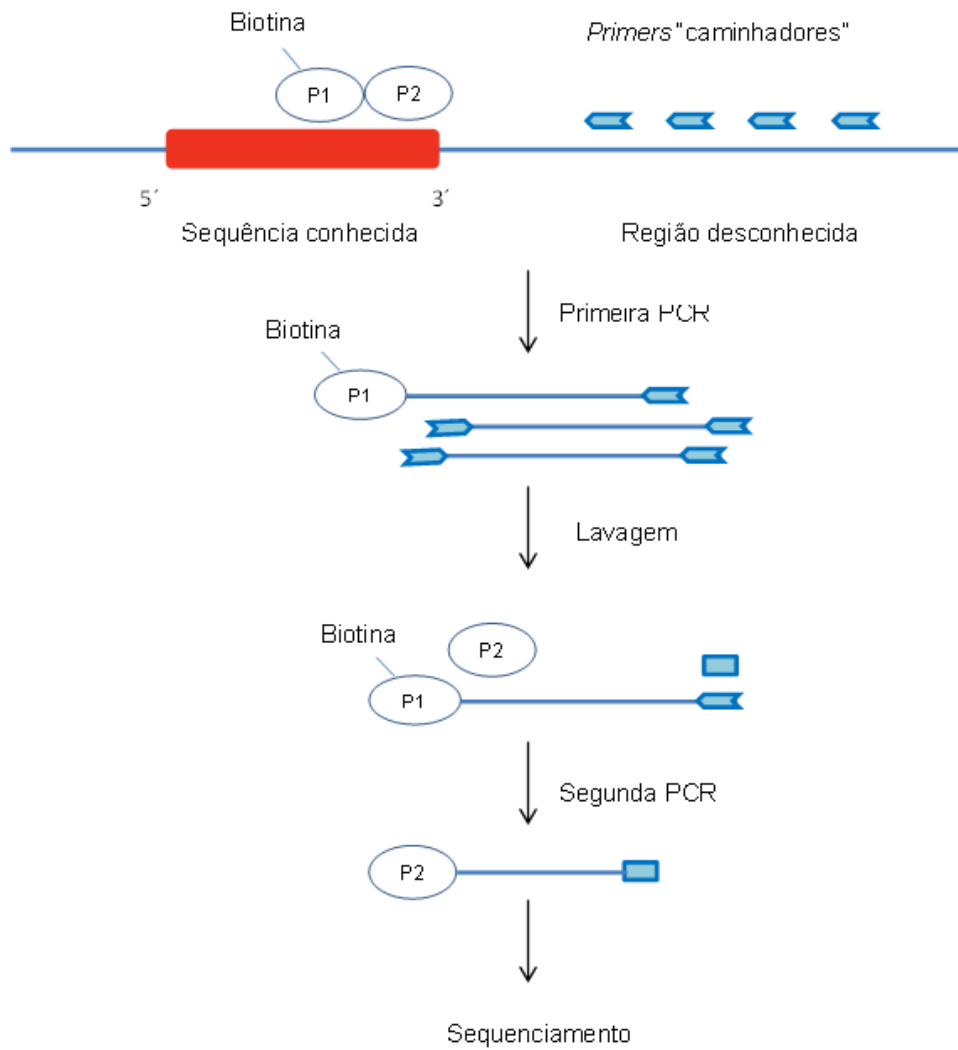


Figura 3. Representação gráfica do *Directional Genome Walking*. P1 e P2 representam os *primers* utilizados na obtenção de seqüências que flanqueiam a região conhecida representada em vermelho.

REFERÊNCIAS

ARIAS, C. R., SHOEMAKER, C. A., EVANS, J. J., KLESIUS, P. H.. A comparative study of *Edwardsiella ictaluri* parent (EILO) and *E. ictaluri* rifampicin-mutant (RE-33) isolates using lipopolysaccharides, outer membrane proteins, fatty acids, Biolog, API 20E and genomic analyses. **Journal of Fish Diseases**, v.26, n.7, p.415-421. 2003.

ARAÚJO, W. L., MARCON, J., MACCHERONI, W., VAN ELSAS, J. D., VAN VUURDE, J. W., AZEVEDO, J. L. 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.

ARGUELLES-ARIAS, A., ONGENA, M., HALIMI, B., LARA, Y., BRANS, A., JORIS, B., FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, v.8, n.63, p.1-12, 2009.

ARGUELLES-ARIAS, A. A., ONGENA, M., DEVREESE, B., TERRAK, M., JORIS, B., FICKERS, P. Characterization of amylolysin, a novel lantibiotic from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. **PloS One**, v.8, n.12, e83037, 2013.

ARORA, S., PATEL, P. N., VANZA, M. J., RAO, G. G. Isolation and characterization of endophytic bacteria colonizing halophyte and other salt tolerant plant species from coastal Gujarat. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, n.17, p.1779-1788, 2014.

ARSHIYA, M., SURYAWANSHI, A., MORE, D., BAIG, M. M. V. Repetitive PCR based detection of Genetic Diversity in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Strains. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.2, n.01, p.17-22, 2014.

BAPTISTA, J.C., MACHADO, M.A., HOMEN, R.A., TORRES, P.S., VOJNOV, A.A., AMARAL, ALEXANDRE MORAIS DO. Mutation in the *xpsD* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.1, p. 146-153, 2010.

BEGOVIĆ, J., JOVČIĆ, B., PAPIĆ-OBRAĐOVIĆ, M., VELJOVIĆ, K., LUKIĆ, J., KOJIĆ, M., TOPISIROVIĆ, L. Genotypic diversity and virulent factors of *Staphylococcus epidermidis* isolated from human breast milk. **Microbiological Research**, v.168, n.2, p.77-83, 2013.

BLOEMBERG, G. V., WIJFJES, A. H., LAMERS, G. E., STUURMAN, N., LUGTENBERG, B. J. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, n.11, p.1170-1176, 2000.

BÖHM, M., HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Molecular plant-microbe interactions**, v.20, n.5, p.526-533, 2007.

BRADER, G., COMPANT, S., MITTER, B., TROGNITZ, F., SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v.27, p.30-37, 2014.

BUDIHARJO, A., CHOWDHURY, S. P., DIETEL, K., BEATOR, B., DOLGOVA, O., FAN, B., BLEISS, W., ZIEGLER, J., SCHMID, A. H., BORRISS, R. Transposon Mutagenesis of the Plant-Associated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 Revealed That the *nfrA* and RBAM17410 Genes Are Involved in Plant-Microbe-Interactions. **PloS One**, v.9 n.5, e98267, 2014.

CAPDEVILA, S., MARTÍNEZ-GRANERO, F. M., SÁNCHEZ-CONTRERAS, M., RIVILLA, R., MARTÍN, M. Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. **Microbiology**, v.150, n.11, p.3889-3897, 2004.

CAVALCANTE, V. A., DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v.108, n.1, p.23-31, 1988.

CHEN, X. H., KOUMOUTSI, A., SCHOLZ, R., EISENREICH, A., SCHNEIDER, K., HEINEMEYER, I., MORGENSTERN, B., VOSS, B., HESS, W. R., REVA, O., JUNGE, H., VOIGT, B., JUNGBLUT, P. R., VATER, J., SÜSSMUTH, R.,

LIESEGANG, H., STRITTMATTER, A., GOTTSCHALK, G., BORRIS, R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature Biotechnology**, v.25, n.9, p.1007-1014, 2007.

CHIN-A-WOENG, T. F., BLOEMBERG, G. V., VAN DER BIJ, A. J., VAN DER DRIFT, K. M., SCHRIJPEMA, J., KROON, B., SCHEFFER, R. J., KEEL, C., BAKKER, P., TICHY, H. V., DE BRUIJN, F.J., THOMAS-OATES, J. E., LUGTENBERG, B. J. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, n.11, p.1069-1077, 1998.

CHIN-A-WOENG, T. F., BLOEMBERG, G. V., MULDER, I. H., DEKKERS, L. C., LUGTENBERG, B. J. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, n.12, p.1340-1345, 2000.

COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLEMENT, C., BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.4951–4959, 2005.

COMPANT, S., MITTER, B., COLLI-MULL, J. G., GANGL, H., SESSITSCH, A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microbial Ecology**, v.62, n.1, p.188-197, 2011.

CONN, V. M., FRANCO, C. M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.3, p.1787-1794, 2004.

COOMBS, J. T., FRANCO, C. M. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69 n.7, p.4260-4262, 2003.

DEANGELIS, K. M., D'HAESELEER, P., CHIVIAN, D., FORTNEY, J. L., KHUDYAKOV, J., SIMMONS, B., WOO, H., ARKIN, A. P., DAVENPORT, K. W., GOODWIN, A. C., CHEN, A., IVANOVA, N., KYRPIDES, N. C., MAVROMATIS, K., WOYKE, T., HAZEN, T. C. Complete genome sequence of “*Enterobacter lignolyticus*” SCF1. **Standards in Genomic Sciences**, v.5, n.1, p.69-85, 2011.

DEKKERS, L. C., PHOELICH, C. C., VAN DER FITS, L., LUGTENBERG, B. J. A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, n.12, p.7051-7056, 1998a.

DEKKERS, L. C., VAN DER BIJ, A. J., MULDER, I. H., PHOELICH, C. C., WENTWOORD, R. A., GLANDORF, D. C., LUGTENBERG, B. J. Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH: ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, n.8, p.763-771, 1998b.

DIENE, S. M., MERHEJ, V., HENRY, M., EL FILALI, A., ROUX, V., ROBERT, C., AZZA, S., GAVORY, F., BARBE, V., LA SCOLA, B., RAOULT, D., ROLAIN, J. M. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new “killer bugs” are created because of a sympatric lifestyle. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.2, p.369-383, 2013.

DÖRR, J., HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B. Type IV pili are involved in plant–microbe and fungus–microbe interactions. **Molecular Microbiology**, v.30, n.1, p.7-17, 1998.

DUPONNOIS, R., BA, A. M., MATEILLE, T. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita*

with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. **Nematology**, v.1, n.1, p.95-102, 1999.

ENGELHARD, M., HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**, v.2, n. 2, p.131-141, 2000.

ETTOUMI, B., GUESMI, A., BRUSETTI, L., BORIN, S., NAJJARI, A., BOUDABOUS, A., CHERIF, A. Microdiversity of Deep-Sea *Bacillales* Isolated from Tyrrhenian Sea Sediments as Revealed by ARISA, 16S rRNA Gene Sequencing and BOX-PCR Fingerprinting. **Microbes and Environments**, v.28, n.3, p.361-369, 2013.

GERMAINE, K. J., LIU, X., CABELLOS, G. G., HOGAN, J. P., RYAN, D., DOWLING, D. N. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **FEMS Microbiology Ecology**, v.57, n.2, p.302-310, 2006.

GIONGO, A., BENEDUZI, A., AMBROSINI, A., VARGAS, L. K., STROSCHEIN, M. R., ELTZ, F. L., ZANETTINI, M. H., PASSAGLIA, L. M. P. Isolation and characterization of two plant growth-promoting bacteria from the rhizoplane of a legume (*Lupinus albus*) in sandy soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n.2, p.361-369, 2010.

GUO, H., MAO, Z., JIANG, H., LIU, P., ZHOU, B., BAO, Z., LIU, X. Community analysis of plant growth promoting rhizobacteria for apple trees. **Crop Protection**. v. 62, p.1-9, 2014.

HADAR, Y., HARMAN, G. E., TAYLOR, A. G.,NORTON, J. M. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v.73, n.9, p.1322-1325, 1983.

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

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

HE, P., HAO, P., BLOM, J., Rückert, C., VATER, J., MAO, Z., WU, Y., HOU, M., HE, P., BORRISS, R. Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. **Journal of Biotechnology**, v.164, n.2, p. 281-291, 2012.

HO, Y. N., MATHEW, D. C., HSIAO, S. C., SHIH, C. H., CHIEN, M. F., CHIANG, H. M., HUANG, C. C. Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. **Journal of Hazardous Materials**, v.219, p.43-49, 2012.

HUANG, J. S. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, n.1, p.141-157, 1986.

HULTON, C. S. J., HIGGINS, C. F., SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, n.4, p.825-834, 1991.

HUMANN, J. L., WILDUNG, M., CHENG, C. H., LEE, T., STEWART, J. E., DREW, J. C., TRIPLETT, E. W., MAIN, D., SCHROEDER, B. K. Complete genome of the onion pathogen *Enterobacter cloacae* EcWSU1. **Standards in Genomic Sciences**, v. 5, n.3, p. 279-286, 2011.

HUMANN, J. L., WILDUNG, M., POUCHNIK, D., BATES, A. A., DREW, J. C., ZIPPERER, U. N., TRIPLETT, E. W. MAIN, D., SCHROEDER, B. K. Complete genome of the switchgrass endophyte *Enterobacter cloacae* P101. **Standards in Genomic Sciences**, v.9, n.3, 2014.

HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B., VAN MONTAGU, M., KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.7, p.1913-1923, 1994.

IDRIS, E. E., IGLESIAS, D. J., TALON, M., BORRIS, R. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v.20, n.6, p.619-626, 2007.

JIMÉNEZ-SALGADO, T., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., TAPIA-HERNÁNDEZ, A., MASCARUA-ESPARZA, M. A., MARTÍNEZ-ROMERO, E., CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.9, p.3676-3683, 1997.

KOEUTH, T., VERSALOVIC, J., LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v.5, n.4, p.408-418, 1995.

KUKLINSKY-SOBRAL, J., ARAÚJO, W. L., MENDES, R., GERALDI, I. O., PIZZIRANI-KLEINER, A. A., AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, n.12, p.1244-1251, 2004.

LAMB, T. G., TONKYN, D. W., KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, n.11, p.1112-1120, 1996.

LAU, Y. Y., SULAIMAN, J., CHEN, J. W., YIN, W. F., CHAN, K. G. Quorum sensing activity of *Enterobacter asburiae* isolated from lettuce leaves. **Sensors**, v.13, n.10, p.14189-14199, 2013.

LEITE, H. A. C., SILVA, A. B., GOMES, F. P., GRAMACHO, K. P., FARIA, J. C., DE SOUZA, J. T., LOGUERCIO, L. L. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize

seedlings and promote growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, n.6, p.2639-2651, 2013.

LI, J., OVAKIM, D. H., CHARLES, T. C., GLICK, B. R. An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 No longer promotes root elongation. **Current Microbiology**, v.41, n. (2), p.101-105, 2000.

LIU, W. Y., CHUNG, K. M. K., WONG, C. F., JIANG, J. W., HUI, R. K. H., LEUNG, F. C. C. Complete genome sequence of the endophytic *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* strain ENHKU01. **Journal of Bacteriology**, v.194, n.21, p.5965-5965, 2012.

LUGTENBERG, B.J., DEKKERS, L. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? **Environmental Microbiology**, v.1, n.1, p. 9-13, 1999.

LUGTENBERG, B. J., DEKKERS, L., BLOEMBERG, G. V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p.461–490, 2001.

LUO, S. L., CHEN, L., CHEN, J. L., XIAO, X., XU, T. Y., WAN, Y., RAON, C., LIU, C.B., LIU, Y.T., LAI, C., ZENG, G.M . Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. **Chemosphere**, v.85, n.7, p.1130-1138, 2011.

MADHAIYAN, M., PENG, N., JI, L. Complete Genome Sequence of *Enterobacter* sp. Strain R4-368, an Endophytic N-Fixing Gammaproteobacterium Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Jatropha curcas* L. **Genome Announcements**, v.1, n. 4, e00544-13, 2013.

MANTER, D. K., HUNTER, W. J., VIVANCO, J. M. *Enterobacter soli* sp. nov.: A lignin-degrading γ -proteobacteria isolated from soil. **Current Microbiology**, v.62, n.3, p.1044-1049, 2011.

MAO, W., LUMSDEN, R. D., LEWIS, J. A., HEBBAR, P. K. Seed treatment using pre-infiltration and biocontrol agents to reduce damping-off of corn caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. **Plant Disease**, v.82, n.3, p.294-299, 1998.

MARTIN, B., HUMBERT, O., CAMARA, C., GUENZI, E., WALKER, J., MITCHELL, T., ANDREW, P., PRUDHOMME, M., ALLOING, G., HAKENBECK, R., MORRISON, D. A., BOULNOIS, G. J., CLAVERY, J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.13, p.3479-34831, 1992.

MARTÍNEZ, L., CABALLERO-MELLADO, J., OROZCO, J., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). **Plant and Soil**, v.257, n.1, p.35-47, 2003.

McINROY, J. A., KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v.173, n.2, p.337-342, 1995.

MISHRA, R. N., SINGLA-PAREEK, S. L., NAIR, S., SOPORY, S. K., REDDY, M. K. Directional genome walking using PCR. **Biotechniques**, v.33, n.4, p.830-834, 2002.

MOORE, F. P., BARAC, T., BORREMANS, B., OEYEN, L., VANGRONSVELD, J., VAN DER LELIE, D., CAMPBELL, C.D., MOORE, E. R. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.7, p.539-556, 2006.

MORALES, Y. E., JUÁREZ, D., ARAGÓN, C., MASCARUA, M. A., BUSTILLOS, M. R., FUENTES, L. E., CONTRERAS, R.D. MUÑOZ, J. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. **Revista Argentina de Microbiología**, v.43, n.4, p.287-293, 2010.

NAVEED, M., MITTER, B., YOUSAF, S., PASTAR, M., AFZAL, M., SESSITSCH, A. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected

based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. **Biology and Fertility of Soils**, v.50, n.2, p. 249-262, 2014a.

NAVEED, M., MITTER, B., REICHENAUER, T. G., WIECZOREK, K., SESSITSCH, A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environmental and Experimental Botany**, v.97, p. 30-39, 2014b.

NELSON, E. B. Rapid germination of sporangia of *Pythium* species in response to volatiles from germinating seeds. **Phytopathology**, v.77, n.7, p.1108-1112, 1987.

NELSON, E. B., CRAFT, C. M. Introduction and establishment of strains of *Enterobacter cloacae* in golf course turf for the biological control of dollar spot. **Plant Disease**, v.75, p.510-514, 1991.

NIE, L., SHAH, S., RASHID, A., BURD, G. I., GEORGE DIXON, D., GLICK, B. R. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, n. 4, p.355-361, 2002.

OLIVARES, F. L., BALDANI, V. L., REIS, V. M., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, n.3, p.197-200, 1996.

PRIEST, F. G., GOODFELLOW, M., SHUTE, L. A., BERKELEY, R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v .37, n.1, p.69-71, 1987.

QUADT-HALLMANN, A., KLOEPPER, J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, n.11, p.1144-1154, 1996.

REN, Y., REN, Y., ZHOU, Z., GUO, X., LI, Y., FENG, L., WANG, L. Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* type strain ATCC 13047. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.9, p.2463-2464, 2010.

ROBERTS, D.P., MCKENNA, L., LOHRKE, S.M., REHNER, S., DE SOUZA J.T. Pyruvate dehydrogenase activity is important for colonization of seeds and roots by *Enterobacter cloacae*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, n.8, p. 2150-2159, 2007.

ROBERTS, D.P., LOHRKE, S.M., MCKENNA, L., LAKSHMAN, D.K., KONG, H., LYDON, J. Mutation of a *degS* Homologue in *Enterobacter cloacae* Decreases Colonization and Biological Control of Damping-Off on Cucumber. **Phytopathology**, v.101, n. 2, p. 271-280, 2011.

ROSENBLUETH, M., MARTÍNEZ, L., SILVA, J., MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v.2, n.1, p.27-35, 2004.

ROSENBLUETH, M., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, n.8, p.827-837, 2006.

RYU, C. M., FARAG, M. A., HU, C. H., REDDY, M. S., WEI, H. X., PARÉ, P. W., KLOEPPER, J. W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.8, p.4927-4932, 2003.

SESSITSCH, A., REITER, B., PFEIFER, U., WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, n.1, p.23-32, 2002.

SESSITSCH, A., HARDOIM, P., DÖRING, J., WEILHARTER, A., KRAUSE, A., WOYKE, T., MITTER, B., HAUBERG-LOTTE, L., FRIEDRICH, F., RAHALKAR, M., HUREK, T., SARKAR, A., BODROSSY, L., VAN OVERBEEK, L., BRAR, D., VAN ELSAS, J.D., REINHOLD-HUREK, B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 25, no 1, p. 28-36. 2012.

SHAHID, M., HAMEED, S., IMRAN, A., ALI, S., VAN ELSAS, J. D. Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing *Enterobacter* sp. Fs-11. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.8, p.2749-2758, 2012.

SHANKAR, M., PONRAJ, P., ILAKKIAM, D., GUNASEKARAN, P. Root colonization of a rice growth promoting strain of *Enterobacter cloacae*. **Journal of Basic Microbiology**, v.51, n. 5, p.523-530, 2011.

SHIN, S. H., KIM, S., KIM, J. Y., LEE, S., UM, Y., OH, M. K., KIM, Y.R., LEE, J., YANG, K. S. Complete genome sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. **Journal of Bacteriology**, v.194, n.9, p.2373-2374, 2012.

SIMONS, M., VAN DER BIJ, A. J., BRAND, I., DE WEGER, L. A., WIJFFELMAN, C. A., LUGTENBERG, B. J. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. **MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions**, v.9, n.7, p.600-607, 1996.

STROBEL, G. Genetic diversity of microbial endophytes and their biotechnical applications. In: **Genomics Applications for the Developing World**. Springer New York. pp. 249-262. 2012.

STURZ, A. V., CHRISTIE, B. R., NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, n.1, p.1-30, 2000.

SUBRAMANIAN, P. S., VERSALOVIC, J., MCCABE, E. R., LUPSKI, J. R. Rapid mapping of *Escherichia coli* :: Tn5 insertion mutations by REP-Tn5 PCR. **Genome Research**, v.1 n.3, p.187-192, 1992.

TAGHAVI, S., VAN DER LELIE, D., HOFFMAN, A., ZHANG, Y. B., WALLA, M. D., VANGRONSVELD, NEWMAN, L., MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PloS Genetics**, v.6, n. 5, e1000943, 2010.

TALBOYS, P. J., OWEN, D. W., HEALEY, J. R., WITHERS, P. J., JONES, D. L. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivium*. **BMC Plant Biology**, v.14, n. 1, 2014.

VERMA, S. C., LADHA, J. K., TRIPATHI, A. K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, n.2, p.127-141.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J., LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, v.5, n. 1, p.25-40, 1994.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, n.12, p.828-840, 2012.

WEBER, O. B., BALDANI, V. L. D., TEIXEIRA, K. D. S., KIRCHHOF, G., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v.210, n.1, p.103-113, 1999.

WELBAUM, G. E., STURZ, A. V., DONG, Z., NOWAK, J. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.23, n.2, p.175-193, 2004.

WILSON, C. L., FRANKLIN, J. D., PUSEY, P. L. Biological control of *Rhizopus* rot of peach with *Enterobacter cloacae*. **Phytopathology**, v.77, n. 2, p.303-305, 1987.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **OIKOS**, p.274-276, 1995.

XU, Y., WANG, A., TAO, F., SU, F., TANG, H., MA, C., XU, P. Genome sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* SDM, an efficient biomass-utilizing producer of platform chemical 2, 3-butanediol. **Journal of bacteriology**, v.194, n.4, p.897-898, 2012.

XU, Z., SHAO, J., LI, B., YAN, X., SHEN, Q., ZHANG, R. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.3, p.808-815, 2013.

XU, Y. B., CHEN, M., ZHANG, Y., WANG, M., WANG, Y., HUANG, Q. B., WANG, X., WANG, G. The phosphotransferase system gene *ptsI* in the endophytic bacterium *Bacillus cereus* is required for biofilm formation, colonization, and biocontrol against wheat sharp eyespot. **FEMS Microbiology Letters**, v.354, n.2, p.142-152, 2014.

YUAN, J., RAZA, W., HUANG, Q., SHEN, Q. The ultrasound-assisted extraction and identification of antifungal substances from *B. amyloliquefaciens* strain NJN-6 suppressing *Fusarium oxysporum*. **Journal of basic microbiology**, v.52, n.6, p.721-730, 2012.

ZHANG, G., DENG, A., XU, Q., LIANG, Y., CHEN, N., WEN, T. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* TA208, a strain for industrial production of guanosine and ribavirin. **Journal of Bacteriology**, v.193, n.12, p.3142-3143, 2011.

ZHANG, X., LIU, X., WANG, Q., CHEN, X., LI, H., WEI, J., XU, G. Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from *Scirpus triqueter*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.87, p.99-105, 2014.

ZINNIEL, D. K., LAMBRECHT, P., HARRIS, N. B., FENG, Z., KUCZMARSKI, D., HIGLEY, P., ISHIMARU, C.A., ARUNAKUMARI, A., BARLETTA, R.G., VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2198-2208, 2002.

CAPÍTULO 1

Molecular identification and endophytic colonization by *Bacillus amyloliquefaciens* 629

Submetido à revista Journal of Basic Microbiology (Short
Communication)

Short Communication

Molecular identification and endophytic colonization by *Bacillus amyloliquefaciens* 629

Zayda Morales Moreira¹, Elizabeth Amélia Alves Duarte¹, Thiago Alves Santos de Oliveira¹, Fernando Pereira Monteiro², Leandro Lopes Loguercio³, Jorge Teodoro de Souza¹

¹ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CCAAB, 44380-000 Cruz das Almas, BA, Brazil

² Universidade Federal de Lavras, Department of Plant Pathology, CP 3037, 37200-000 Lavras, MG, Brazil

³ Universidade Estadual de Santa Cruz, 45662-000, Ilhéus, BA, Brazil

1. Abstract

Bacillus is commonly associated with plants and delivers beneficial effects to agriculturally important crops. *Bacillus subtilis* 629 reclassified as *Bacillus amyloliquefaciens* 629 in this study, obtained from inside healthy cacao trees was evaluated under sterile and non-sterile conditions for its colonization preferences. Cucumber, cacao, maize and bean plants were differentially colonized by this strain. Bacteria colonized plants to a higher extent in sterile conditions. Cucumber was colonized by 629 strain under both conditions. Leaves and stems were the tissues preferentially colonized. Populations of fungi were shown to influence the levels of endophytic colonization of these plant species under non-sterile conditions. This highlights the importance of plant species, tissue and population of competing microbes in determining the levels of endophytic colonization by bacteria.

2. Introduction

Beneficial microorganisms have been of great interest to worldwide researchers over the last years, especially for their potential in agricultural systems. Plant colonization is the first step and a prerequisite for the successful delivery of beneficial effects to host plants [1]. Colonization of plants is a dynamic process that involves the movement of microorganisms toward the host,

adherence to plant surfaces, penetration and multiplication inside [1]. Endophytic bacteria particularly, have been found residing latently or actively colonizing plant tissues locally as well as systemically [2]. The intimate contact with the host plant protects endophytes from environmental conditions, which constitutes an advantage over epiphytic bacteria. Endophytic bacteria have the ability to colonize an ecological niche similar to that of phytopathogens, which makes them suitable biocontrol agents [3, 4, 5]. Endophytes can promote plant growth and yield and enhance the efficacy of phytoremediation [6, 7, 8, 9]. This group of bacteria does not visibly harm the host plant and can be isolated from surface-disinfested plant tissue or extracted from inside the plant [2]. *Bacillus* is among the most frequently isolated native endophytes found in the microbiota of several plant species [10, 11].

The host plant greatly influences rhizosphere colonization by beneficial bacteria, but the genetic basis of this phenomenon remains largely unknown. In one of the few existing studies, the genes responsible for supporting high populations of the beneficial bacterium *Bacillus cereus* on seeds were mapped to one specific quantitative trait locus (QTL) in the tomato genome [12]. Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* specifically colonise roots of wheat, sugar beet and potato to a greater extent than lily, even though the latter supported higher populations of the genus *Pseudomonas* [13].

Bacterial rhizosphere colonization is a relatively well-studied process [14, 15, 16]. Several bacterial genes involved in rhizosphere colonization have been described [15, 17, 18]. On the other hand, endophytic colonization is relatively less studied, with only a few recent studies on the nitrogen fixing genera *Azoarcus* and *Gluconacetobacter* [19, 20, 21].

Bacillus subtilis 629 reported as cacao plant growth promoter [7, 22] and fungal biocontrol agent [22] was used in this research. Due to the taxonomic identification was performed using 16S rRNA in previous studies, two more regions were analysed, *gyrA* and *recA*.

The aim of this study was to investigate the host and tissue preferences of colonization of the endophyte *Bacillus subtilis* 629 in four plant species grown under sterile and non-sterile conditions.

3. Materials and methods

3.1 Bacterial strains and culture conditions

Endophytic wild-type isolate used in this study were isolated from healthy adult *Theobroma cacao* trees [7]. This strain is deposited in the Biological Institute Culture Collection of Phytopathogenic Bacteria - IBSBF (Campinas, São Paulo, Brazil) under accession number IBSBF-3106. This collection is registered with the World Data Centre for Microorganisms collection under number WDCM-110. Spontaneous rifampicin-resistant (rif^R) variant of 629 was developed and used in the experiments reported herein. Bacterial strain was routinely grown on Nutrient Agar (Peptone 5 g, beef extract 3 g, 16 g agar per liter) supplemented with 100 µg ml⁻¹ of rifampicin. The strains were stored in 40% glycerol at - 80 °C. Two regions were sequenced [23] for taxonomic characterization: *gyrA* (DNA gyrase subunit A gene) and *recA* [24, 25].

3.2 Seedlings inoculation and endophytic colonization study

To test and compare endophytic colonization, seeds of cucumber (Marketmore 76), cacao (CEPEC-2002), maize (BRS Caatingueiro) and bean (BRS Notável) were surface-sterilized by soaking in 70% ethanol for 1 min, then in 1% sodium hypochlorite for 3 min and rinsed three times with sterile distilled water. Seeds were dried on sterile paper towels and transferred to Petri dishes containing water–agar (0.8%). After incubation at room temperature (25 ± 2 °C), when the radicles of the seeds were approximately 1 cm long, they were immersed in a bacterial suspension at 10⁵ CFU mL⁻¹ for 30 min. Ten germinated seeds of each plant species and bacterial strain were transferred to sterile tubes containing water-agar (0.8%) and incubated at room temperature with a 12 h photoperiod for 7 days, except for cacao that was incubated for 14 days (sterile system). For the non-sterile system, 10 germinated seeds of each plant species and bacterial strain were transferred to 5-kg-pots filled with a commercial substrate (*Vivatto Slim Plus*®) mixed with NPK (4-14-8). Pots were kept inside a greenhouse for the same period described for the sterile system. Ten germinated seeds of each plant immersed in water were used as negative controls.

After incubation, seedlings were removed from the sterile tubes or from the pots and superficially sterilized as described above for seeds. Roots, stems and leaves were separated, weighed individually, and ground in sterilized mortars with pestles. The resulting extracts were diluted and plated in triplicates onto Nutrient agar supplemented with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of rifampicin. The number of colony-forming units (CFU) per gram of fresh tissue was determined.

To estimate colonization by fungi, five pieces superficially sterilized of approximately 0.3 cm^2 from each part of plants grown under sterile and non-sterile conditions were plated onto PDA and observed for mycelial growth for up to 4 days.

The experiments were done at least twice and were installed in a *completely randomized design*. After analysis of variance, data were subjected to mean separation by the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$) using the SISVAR 5.3 software [26].

4. Results and Discussion

The 16S rRNA, *gyrA*, and *recA* genes have been used in taxonomic and phylogenetic studies, good quality sequences were obtained from these three genes. The levels of nucleotide identity attained from alignment with GenBank sequences by the BLAST-N program ranged from 98 to 100 % (Figure 1), placing these endophytes into the *Bacillus amyloliquefaciens* species.

Bacillus amyloliquefaciens 629 presented populations that were 2X higher under sterile conditions. The fact that strains generally colonize plants to a lesser extent in the non-sterile system indicates that competition with indigenous microorganisms plays an important role for most plant-endophyte interactions. There seems to be an inverse relationship between the population of endophytic bacteria and the colonization of plants by fungi, at least in some cases. For example, maize and bean were not well colonized by isolate 629 under non-sterile conditions, probably because of the high fungal population observed inside these plants (Table 1). Fungi were not observed inside plants grown under sterile conditions (Data not shown). Similar results were obtained for cacao and maize for

strain 629. In this study, colonization by other indigenous microorganisms was not taken into account, but their influence cannot be discarded.

The decreases in populations of *B. amyloliquefacies* 629 (2X) from the sterile to the non-sterile conditions indicates that the former has a higher competitive ability. Several studies show that species of *Bacillus* produce antimicrobial compounds [27, 28, 29].

Bacterial strain shows a general preference for colonizing leaves and stems of the plant species studied. On average, cucumber was the plant species most colonized under both experimental conditions, *B. amyloliquefaciens* 629 colonized leaves and stems to same extent and bean plants were the least colonized (Figure 2). Although this endophyte bacteria was originally isolated from inside cacao trees, this plant species was not specifically colonized by these bacterial strains. This indicates that this endophyte is not specific of the plant of origin, which seems to be common among most beneficial microbes [30, 31].

Because of the close contact with host cells, endophytes probably need to avoid plant defense mechanisms in a manner similar to what was reported for biotrophic plant pathogens and beneficial microbes such as mycorrhizae. These organisms secrete proteins called effectors that interfere with the plant defenses, allowing them to colonize host plants [32, 33, 34].

It is not clear at this stage to which extent each plant species contribute to the colonization levels observed. Little is known about the molecular determinants of endophytic colonization in plants and bacteria genome. We are initiating studies with this isolate as model to determine which genes are important for endophytic colonization.

The results of this study show that bacterial endophytes preferentially colonize certain plant species and tissues within these plants. The level of colonization seems to relate to the internal microbial content of the host plant.

5. Concluding remarks

B. subtilis 629 colonizes host plants and tissues at different extents.

6. Acknowledgements

ZMM thanks FAPESB and CAPES for financial support through research fellowships and JTS acknowledges CNPq for his productivity scholarship.

7. References

- [1] Steenhoudt, O., Vanderleyden, J., 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 487-506.
- [2] Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, 43, 895-914.
- [3] Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A., 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol.*, 7, 1673-1685.
- [4] Compant, D., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 4951-4959.
- [5] Durán, P., Acuña, J.J., Jorquera, M.A., Azcón, R., Paredes, C., Rengel, Z., Mora, M. 2014. Endophytic bacteria from selenium-supplemented wheat plants could be useful for plant-growth promotion, biofortification and *Gaeumannomyces graminis* biocontrol in wheat production. *Biol. Fertil. Soils.*, DOI 10.1007/s00374-014-0920-0.
- [6] van Peer, R., Punte, H.L.M., de Weger, L.A., Schipperes, B., 1990. Characterization of root surface and *endorhizosphere pseudomonads* in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2462-2470.
- [7] Leite, H. A. C., Silva, A. B., Gomes, F. P., Gramacho, K. P., Faria, J. C., de Souza, J. T., Loguercio, L. L. 2013. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 2639-2651.

- [8] Ho, Y.N., Mathew, D.C., Hsiao, S.C., Shih, C.H., Chien, M. F., Chiang, H. M., Huang, C. C. 2012. Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. *J. Hazard. Mater.*, 219, 43-49.
- [9] Luo, S.L., Chen, L., Chen, J.L., Xiao, X., Xu, T. Y., Wan, Y., Raon, C., Liu, C.B., Liu, Y.T., Lai, C., Zeng, G.M., 2011. Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere.*, 85, 1130-1138.
- [10] Arora, S., Patel, P. N., Vanza, M. J., Rao, G. G. 2014. Isolation and characterization of endophytic bacteria colonizing halophyte and other salt tolerant plant species from coastal Gujarat. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 8, 1779-1788.
- [11] Talboys, P. J., Owen, D. W., Healey, J. R., Withers, P. J., Jones, D. L. 2014. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biol.*, 14.
- [12] Smith, K. P., Handelsman, J., Goodman, R. M. 1999. Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 4786-4790.
- [13] Bergsma-Vlami, M., Prins, M. E., Raaijmakers, J. M. 2005. Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52, 59-69.
- [14] Kloepper JW, Beauchamp CJ. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 38, 1219–32.
- [15] Lugtenberg, B. J., Dekkers, L., Bloemberg, G. V., 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu.Rev. Phytopathol.*, 39, 461-490.

- [16] Raaijmakers, J. M., Lugtenberg, B. J. J., 2013. Perspectives for Rhizosphere Research. In: De Bruijn F. J. (Ed), Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. Doi: 10.1002/9781118297674.ch118.
- [17] Barahona, E., Navazo, A., Yousef-Coronado, F., Aguirre de Cárcer, D., Martínez-Granero, F., Espinosa-Urgel, M., Martín, M., Rivilla, R. 2010. Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. Environ. Microbiol.,12, 3185-3195.
- [18] Chauhan, P. S., Nautiyal, C. S. 2010. The *purB* gene controls rhizosphere colonization by *Pantoea agglomerans*. Lett. Appl. Microbiol., 50, 205-210.
- [19] Böhm, M., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B. 2007. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. Mol. Plant-Microbe Interact., 20, 526-533.
- [20] Intorne, Aline C., De Oliveira M. V., Pereira, L., de Souza, G. 2012. Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Int. Microbiol.,15, 69-78.
- [21] Alquéres, S., Meneses, C., Rouws, L., Rothballer, M., Baldani, I., Schmid, M., Hartmann, A. 2013. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Mol. Plant-Microbe Interact., 26, 937-945.
- [22] Falcão, L. L., Silva-Werneck, J. O., Vilarinho, B. R., da Silva, J. P., Pomella, A. W. V., & Marcellino, L. H. 2014. Antimicrobial and plant growth-promoting properties of the cacao endophyte *Bacillus subtilis* ALB629. J. Appl. Microbiol., 116, 1584-1592.
- [23] Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA., 74, 5463-5467.

- [24] Chun, J., & Bae, K. S. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 123-127.
- [25] Miller, R. V., & Kokjohn, T. A. 1990. General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance. *Annual Reviews in Microbiology*, 44, 365-394.
- [26] Ferreira, D. F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Cienc. Agrotecnol.*, 35, 1039-1042.
- [27] Arguelles-Arias, A. A., Ongena, M., Devreese, B., Terrak, M., Joris, B., Fickers, P. 2013. Characterization of amylolysin, a novel lantibiotic from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *PLoS One.*, 8, e83037.
- [28] Yuan, J., Raza, W., Huang, Q., Shen, Q. 2012. The ultrasound-assisted extraction and identification of antifungal substances from *B. amyloliquefaciens* strain NJN-6 suppressing *Fusarium oxysporum*. *J. Basic Microbiol.*, 52, 721-730.
- [29] Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., Zhang, R. 2013. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 808-815.
- [30] de Souza, J. T., Bailey, B. A., Pomella, A. W. V., Erbe, E. F., Murphy, C. A., Bae, H., Hebbar, P. K. 2008. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biol. Control.*, 46, 36-45.
- [31] Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., Vidaver, A. K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2198-2208.
- [32] Corradi, N., Bonfante, P. 2012. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: origin and evolution of a beneficial plant infection. *PLoS Pathog.*, 8, e1002600.

- [33] Zuccaro, A., Lahrmann, U., Güldener, U., Langen, G., Pfiffli, S., Biedenkopf, D., Wong, P., Samans, B., Grimm, C., Basiewicz, M., Murat, C., Martin, F., Kogel, K. H. 2011. Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. PLoS Pathog., 7, e1002290.
- [34] Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, J.D., Reinhold-Hurek, B. 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. Mol. Plant-Microbe Interact., 25, 28-36.

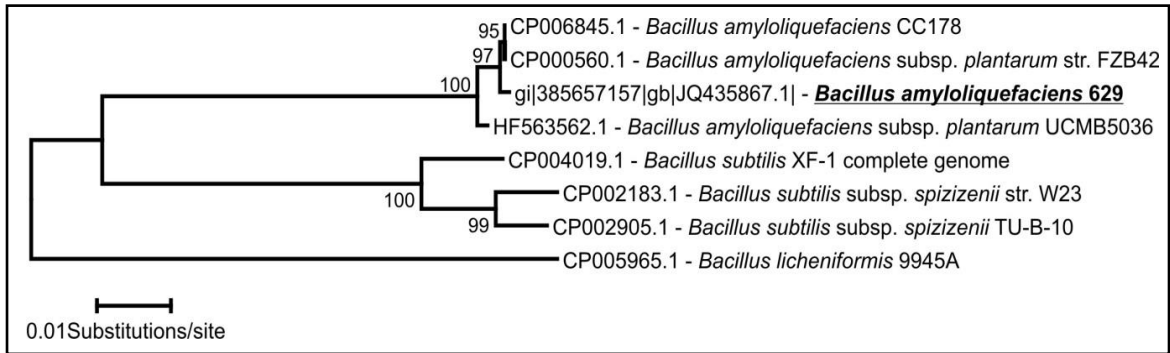


Figure 1. Maximum-likelihood tree showing the identity of the organism identified as *B. amyloliquefaciens* 629.

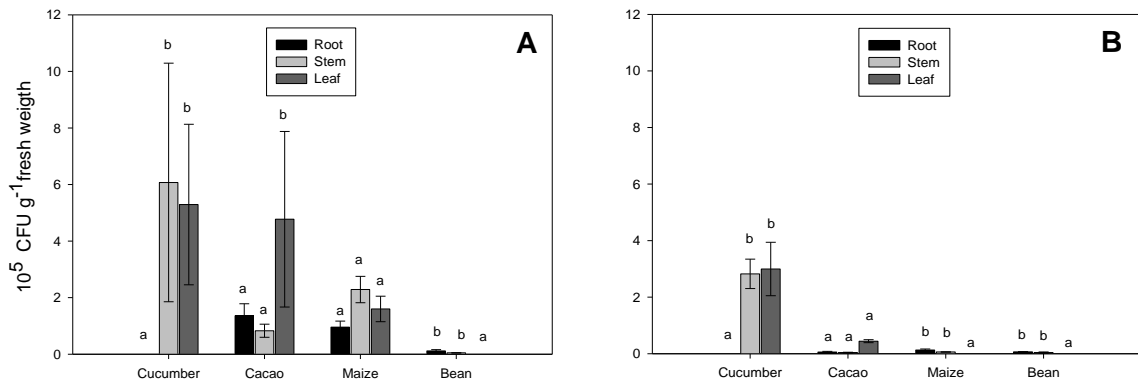


Figure 2. Host and tissue preferences by endophytic bacteria *B. amyloliquefaciens* 629 seven days after seed microbiolization. Number of colony-forming units (CFU) per gram of fresh tissue. (A) Under sterile conditions; (B) Under non-sterile conditions in greenhouse.

Table 1. Percentage of colonization of plant tissues by fungi under non-sterile conditions.

Crop	Without Bacteria			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 629		
	Roots	Stems	Leaves	Roots	Stems	Leaves
Cucumber	100,00	100,00	60,00	100,00	60,00	20,00
Cacao	100,00	100,00	60,00	100,00	100,00	0,00
Maize	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Bean	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Five pieces of plant tissue were plated on PDA and mycelial growth was recorded. 100% means total fungal colonization.

CAPÍTULO 2

**Determinantes moleculares da colonização endofítica em
*Enterobacter cloacae***

RESUMO

Enterobacter cloacae 344 é uma bactéria endofítica de plantas capaz de colonizar diversos tecidos e diferentes culturas. Pepino, cacau, milho e feijão são diferencialmente colonizadas por esse isolado principalmente em condições estéreis. Pepino foi altamente colonizado por 344 em condições estéreis e não estéreis. As folhas foram os tecidos preferencialmente colonizados. *E. cloacae* 344 é promissora como promotora de crescimento em culturas importantes como o cacau. Nesse trabalho utilizamos a estratégia de mutação ao acaso para estudar o papel de alguns genes de *E. cloacae* na colonização endofítica de um variante resistente a rifampicina (344rif^R). *E. cloacae* M3, M4 e M5, mutantes gerados pela inserção do transposon EZ::TN<Kan-2> apresentaram diminuição significativa em colonização endofítica das folhas de plantas de pepino em competição com seu variante (344rif^R). A caracterização molecular de M3 demonstrou que o transposon foi inserido em uma região do genoma com um alto grau de identidade com *copA*, que codifica para uma oxidase periplásmica multi-cobre. No mutante M4 foi inserido em *yadH* que codifica para uma permease do sistema de transporte de membrana ABC e no mutante M5 foi inserido em uma região que codifica para um regulador transcricional da família LysR

ABSTRACT

Enterobacter cloacae 344 is an endophyte able to colonize different host and plant tissue. Cucumber, cacao, maize and bean plants were differentially colonized by this strain. This bacteria colonized plants to a higher extent in sterile conditions. Cucumber was highly colonized by 344 strain under sterile and no sterile conditions. Leaves were the tissues preferentially colonized. *E.cloacae* 344 is promising as growth promoter in important crops such as cacao. We used random mutation strategy for studying the role of some genes in endophytic colonization by rifampicin resistant variant (344rif^R). *E. cloacae* M3, M4 and M5 are EZ::TN<Kan-2> transposon mutants of 344 that were significantly impaired in colonization of leaves of cucumber plants in competition colonizing tests with the variant (344rif^R). Molecular characterization of M3 demonstrated that transposon insertion in the genome of this strain was in a region with a high degree of DNA sequence identity with *copA*, which encodes a periplasmic multi-copper oxidase. In M4 disruption occurred in *yadH* which encodes an ABC transporter permease and in M5, in a LysR transcriptional regulator.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Enterobacter* são comumente encontradas em associação com plantas e são frequentemente isoladas do interior de diversas espécies vegetais (SESSITSCH et al., 2012; TAGHAVI et al., 2010; MADHAIYAN et al., 2013). A capacidade de colonizar o interior de plantas é uma característica de interesse biotecnológico, pois possibilita a exploração destas bactérias na agricultura. *Enterobacter cloacae* atua na promoção de crescimento e no controle biológico de patógenos de plantas (MAO et al., 1998 NIE et al., 2002; NAVEED et al., 2014). No entanto, para que estes eventos aconteçam, a planta hospedeira deve ser colonizada pela bactéria. *Enterobacter cloacae* tem sido amplamente estudada devido a sua capacidade de controlar *Pythium ultimum* quando coloniza a esfermosfera de pepino (ROBERTS et al., 1999, 2007, 2011; LIU et al., 2007).

Relativamente menos informações estão disponíveis para a colonização do interior de plantas por bactérias. No entanto, alguns genes importantes na colonização endofítica por bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Azoarcus* e *Gluconacetobacter* foram descritos (BÖHM, et al., 2007; REINHOLD-HUREK et al., 2010; INTORNE et al., 2012; ALQUÉRES et al., 2013;). *Enterobacter cloacae* apresenta preferências pela colonização endofítica de certas espécies de plantas e tecidos vegetais (Capítulo 1). A colonização endofítica provavelmente envolve componentes genéticos das plantas e das bactérias. Neste capítulo utilizou-se *E. cloacae* isolado 344 para o estudo de sua preferência de colonização em diferentes hospedeiros e tecidos vegetais. A estratégia de mutações ao acaso foi desenvolvida para iniciar os estudos sobre o papel de alguns dos genes de na colonização endofítica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolado bacteriano e condições de cultivo

A bactéria endofítica tipo selvagem utilizada no presente estudo foi isolada de plantas sadias adultas de cacau e previamente descrita como *Enterobacter cloacae* (LEITE, 2013). Esse isolado, denominado 344 está depositado na Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico - IBSBF Campinas, São Paulo, Brasil. O número de referencia é IBSBF-3105. O cultivo do isolado foi feito em ágar nutriente – AN (peptona 5 g, extrato de carne 3 g, 16 g ágar por litro).

2.2 Geração de isolados resistentes a Rifampicina

Para gerar variantes espontâneas resistentes a rifampicina aqui nomeadas de 344rif^R, suspensões celulares contendo 10⁵, 10⁶ e 10⁷ UFC /mL foram plaqueadas em meio AN contendo 50 µg /mL do antibiótico rifampicina (Sigma-Aldrich). As colônias que sobreviveram foram transferidas a placas contendo 100 µg /mL de rifampicina, de onde foi selecionada apenas uma colônia para este estudo. O isolado resistente apresentou uma colonização endofítica normal e foi mantido em freezer -80 °C em glicerol 40%.

2.3 Teste para conhecer a preferência de *E. cloacae* 344 rif^R na colonização de diferentes hospedeiros e tecidos vegetais

Para testar e comparar a colonização endofítica, sementes de pepino (Marketmore 76), cacau (CEPEC-2002), milho (BRS Caatingueiro) e feijão (BRS Notável) foram superfície esterilizadas por imersão em etanol 70% por 1 min, em hipoclorito de sódio 1%, durante 3 minutos e foram lavados três vezes com água destilada estéril. As sementes foram secas em papel toalha estéril e transferidas para placas de Petri contendo ágar-água (0,8%). Após incubação à temperatura ambiente (25±2°C), quando as radículas das sementes tiveram aproximadamente 1 cm de comprimento, foram imersas numa suspensão bacteriana com uma concentração de 10⁵ UFC/mL durante 30 min. Dez sementes germinadas de cada

espécie de planta foram transferidos para tubos estéreis contendo ágar-água (0,8%) e incubou-se à temperatura ambiente com um fotoperíodo de 12 horas durante 7 dias, excepto para o cacau que foi incubado durante 14 dias (sistema estéril) . Para o sistema não-estéril, 10 sementes germinadas de cada espécie de planta foram transferidos para vasos de 5kg com substrato comercial (Vivatto Fino Plus) misturado com NPK (4-14-8). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação pelo mesmo período descrito para o sistema estéril. Dez sementes germinadas de cada planta imersas em água foram utilizadas como controles negativos. Após a incubação, as plantas foram removidas dos tubos esterilizados ou de vasos e esterilizadas superficialmente. Raízes, caules e folhas foram separados, pesados individualmente e macerados. Os extratos resultantes foram diluídos e plaqueadas em triplicata em AN suplementado com 100 ng/mL de rifampicina. Determinou-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido fresco.

Os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes e foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado. Após a análise de variância, os dados foram submetidos à separação significativa pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) utilizando o software SISVAR 5.3.

2.4 Transformação de *E. cloacae* 344 rif^R

Células eletrocompetentes da variante *E. cloacae* 344 rif^R foram obtidas seguindo a metodologia descrita por Andreote et al. (2004). Para realizar a transformação 50 µL de células eletrocompetentes 344 rif^R foram misturadas com 1 µL do complexo formado pela enzima transposase EZ::TN e o transposon EZ::TN <KAN-2> (*EZ::TN*TM <KAN-2> *Tnp Transposome*TM (Epicentre). A eletroporação foi realizada no Multiporator (Eppendorf) em cubetas de 0,1cm (2.0 kV, 5 ms). Imediatamente após o pulso elétrico, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio líquido SOC (contendo por litro, 20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0.5544 g de NaCl, 0.1864 g de KCl, 1.2038 g de MgSO₄, 0.9522 g de MgCl₂ e 3.2 g de glucose) e submetidas a crescimento por 2h a 30 °C sob agitação constante de 180 rpm. As células transformadas (mutantes) foram selecionadas em médio AN com rifampicina e canamicina (100 µg /mL). Os

mutantes gerados foram denominados (KAN). A presença do transposon EZ::TN<Kan-2> foi comprovada com o uso de *primers* que amplificam um fragmento do gene para resistência a canamicina *nptIII* (399 pb) (Tabela 1).

2.5 Extração de DNA

Para a extração do DNA os isolados foram crescidos em AN por 24 h, depois desse período colônias de cada isolado foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 90 µL de solução tampão de lise celular (0,05 M NaOH + 0,25% SDS) e incubados em bloco aquecedor (VHD MS-100) por 15 min a 97 °C, sob agitação de 1000 rpm. Posteriormente os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 10000 rpm em centrífuga (Herolab MicroCen 16) e 20 µL do sobrenadante contendo o DNA foram diluídos em 180 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

2.6 Verificação dos mutantes por BOX PCR

Este procedimento foi realizado para saber se os mutantes obtidos (resistentes a rifampicina e canamicina) eram do isolado original. O padrão genético foi gerado por BOX-PCR de acordo com o Versalovic et al. (1994). Dessa maneira foi comparado o padrão de cada um dos mutantes (KAN) gerados com o padrão genético da variante (344rif^R).

2.7 Microbiolização e ensaios de colonização endofítica

Em um estudo prévio foram testadas sementes de rabanete, tomate e pepino para definir uma planta modelo para o estudo de colonização endofítica. O pepino foi escolhido por ser facilmente cultivável em condições estéreis.

As sementes de pepino foram desinfestadas superficialmente por meio da imersão em etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 1% por 3 min e lavados três vezes em água estéril, secas sobre papel toalha esterilizado e, transferidas para placas de Petri contendo meio ágar-água (0,8%). Após 48 h as sementes não contaminadas e germinadas foram submetidas à microbiolização, por meio da imersão e misturadas cuidadosamente por 30 min em suspensões bacterianas. As suspensões bacterianas foram compostas por uma mistura na proporção 1:1 de cada mutante (KAN) e da variante 344 rif^R (colonização por competição),

ambos na concentração 10^5 UFC/mL. Um controle negativo não inoculado foi incluído, assim como um controle onde foi inoculado somente 344 rif^R. Após serem imersas na suspensão bacteriana, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio contendo ágar-água estéril onde permaneceram a temperatura ambiente (26 ± 2 °C) por um período de 5 dias.

2.8 Avaliação da colonização endofítica

Após os cinco dias de incubação as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e com bisturi as folhas de cada planta foram separadas. Em estudos prévios foi demonstrado que *E. cloacae* 344 tem preferência por colonizar as folhas de pepino e por essa razão a avaliação da colonização por endofíticas foi feita nestas partes apenas. Três plantas contendo a proporção 1:1 de cada mutante (KAN) e da variante 344 rif^R, 3 plantas onde só foi inoculada 344 rif^R e o controle negativo foram avaliados. As folhas das plantas foram pesadas, desinfestada superficialmente como descrito anteriormente e macerada em condições estéreis. A quantificação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) no interior das mesmas foi realizada por meio da diluição 1/300 e 1/30 em meio AN com rifampicina para contagem de 344 rif^R e KAN, e em AN contendo rifampicina e canamicina para contagem dos mutantes KAN respectivamente. De cada uma das plantas foram plaqueadas três repetições em cada tipo de meio (seis placas no total). O experimento foi repetido três vezes para fins de comparação dos dados.

2.9 Análises estatísticas

Em todos os experimentos foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado. A comparação de médias foi efetuada pelo teste t ($p \leq 0,05$) utilizando o programa BioEstat 5.3 (Ayres et al., 2011)

2.10 Sequenciamento dos genes interrompidos

Os mutantes com colonização endofítica significativamente diferente da variante 344 rif^R foram utilizados para a identificação de genes relacionados à colonização por sequenciamento e posterior análise dos genes interrompidos. Foram desenhados *primers* para amplificar os flancos do gene de resistência à

canamicina (Tabela 1) e o sequenciamento foi realizado por meio de caminhamento no genoma com o método descrito por Mishra et al. (2002), usando o kit Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles (Promega).

Tabela1. Primers utilizados no *Directional Genome Walking* e na confirmação da inserção do *transposon* EZ::TN<Kan-2>

Primers	Sequência	Referência
Walker 1	CTAATACGACTCACTATAGGGNNNNATGC	Mishra et al. (2002)
Walker 2	CTAATACGACTCACTATAGGGNNNNGATC	Mishra et al. (2002)
Walker 3	CTAATACGACTCACTATAGGGNNNNTAGC	Mishra et al. (2002)
Walker 4	CTAATACGACTCACTATAGGGNNNNCTAG	Mishra et al. (2002)
UWP	CTAATACGACTCACTATAGGG	Mishra et al. (2002)
Kmrgbio	Biosg/TGGCAAAGCAAAGTTCAAA	Esse estudo
Kmrg	ATGCAAGCTTCAGGGTTGAG	Esse estudo
Kmlfbio	Biosg/GAGATTTTG AGACACAATTCATCG	Esse estudo
Kmlf	TCGATGATGGTTGAGATGTGT	Esse estudo
NptIIF	GCCCGATGCGCCAGAGTTG	Baptista et al. (2010)
NptIIR	CAGACTTGTTCAACAGGCCAG	Baptista et al. (2010)

As bandas de maior tamanho obtidas pela técnica de caminhamento no genoma foram sequenciadas em sequenciador automático ABI-PRISM® 310 Genetic Analyzer seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems)

3. RESULTADOS

A população de *E. cloacae* 344 foi em média 20 vezes maior em condições entéreis que em condições não estéreis. O nível de colonização endofítica em pepino foi superior que em cacau, milho ou feijão. O tecido preferencialmente colonizado foram as folhas (Figura 1).

Três mutantes de *E. cloacae* aqui nomeados de: M3, M4 e M5 foram selecionados depois de realizar o teste de colonização endofítica em plantas de pepino de 8 mutantes da biblioteca (84 mutantes) gerada com o transposon EZ::TN <KAN-2>. Os três mutantes (KAN) apresentaram diminuição significativa em colonização endofítica das folhas de pepino em comparação com 344 rif^R (Figura 2). O mutante M3 colonizou 22% menos que o tipo 344 rif^R, o mutante M4 40% e o mutante M5 30%. Estes resultados foram obtidos nas 3 repetições do experimento.

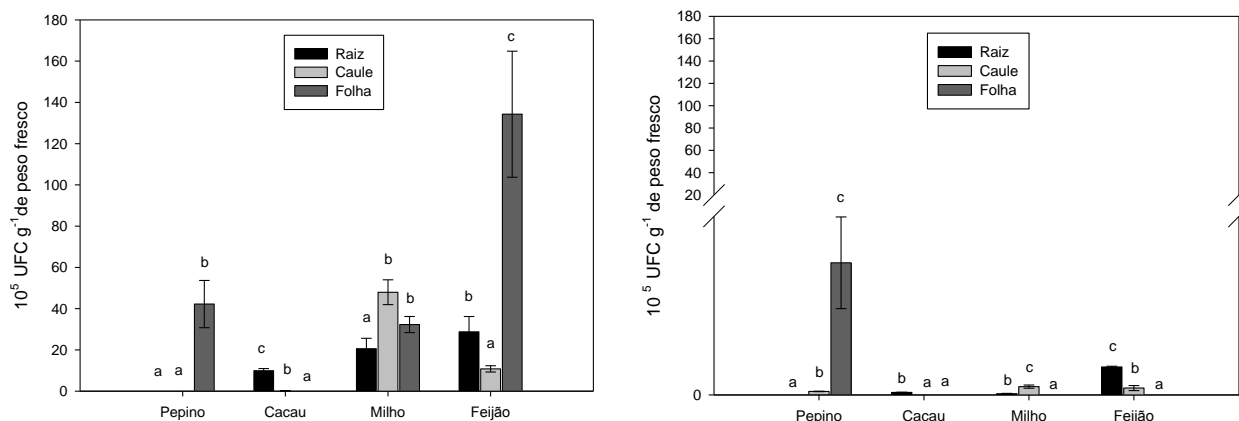


Figura 1. Preferência de colonização endofítica em diferentes hospedeiros e tecidos vegetais por *E. cloacae* 7 dias depois da microbiolização das sementes. Unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido fresco. (A) Condições estéreis (B) Condições não estéreis em casa de vegetação.

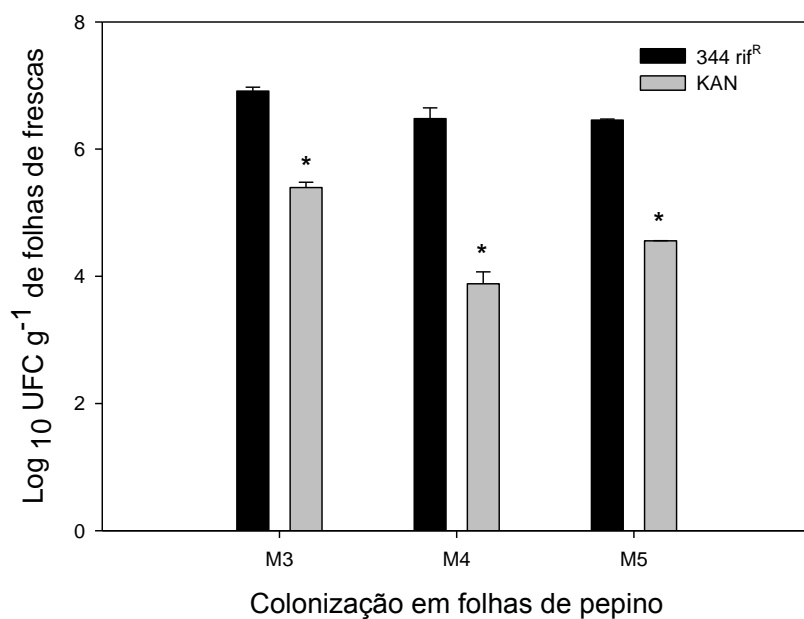


Figura 2. Colonização endofítica das folhas de pepino pela variante resistente a rifampicina 344 rif^R e mutantes KAN. Os resultados estão apresentados como médias de 3 repetições. Os * (asteriscos) indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de t entre o tipo selvagem e os mutantes. As plantas foram crescidas em condições estéreis e a avaliação foi feita 5 dias após a microbiolização

A presença do transposon EZ::TN<Kan-2> foi comprovada com o uso de *primers* que amplificaram fragmento do gene *nptII* (399 pb). O sequenciamento dos flancos do transposon com *primers* desenhados nas extremidades do EZ::TN <KAN-2> indicaram que, no mutante M3, o transposon foi inserido em uma região do genoma com $\geq 95\%$ de identidade com *copA* que codifica para uma oxidase periplásmica multi-cobre ([AP013063.1](#)). No caso do M4, a inserção ocorreu em uma região com $\geq 95\%$ de identidade de *yadH* que codifica para uma permease do sistema de transporte de membrana ABC ([AP013063.1](#)), e no M5, em uma região com $\geq 90\%$ de identidade com uma região que codifica para um regulador transcricional da família LysR ([HG326223.1](#)). No mutante M3 foi possível identificar uma região com alto grau de identidade com *gcl* que codifica uma glioxilato carboligase *upstream* ao gene *copA* (Figura 2-A). No mutante M4 o gene *yadE* que provavelmente codifica uma *polissacarídeo deacetilase upstream* ao gene *yadH* (Figura 2-B). Genes que codificam um regulador transcricional da família *LysR*, outro da família *AraC* e uma proteína hipotética foram identificados flanqueando o transposon no mutante M5 (Figura 2-C).

4. Discussão

Membros da família *Enterobacteriaceae* são freqüentemente encontrados em altas populações como endofíticos (SESSITSCH et al., 2012 ; DE SANTI et al., 2012)

O fato de que geralmente a colonização seja em menor grau no sistema não estéril indica que a competição com micro-organismos nativos desempenhe um papel importante para a maioria das interações planta-endofíticos.

As reduções elevadas na população de *E. cloacae* 344 (20X) a partir das condições estéreis para as condições não estéreis indica que *E. cloacae* provavelmente seja menos competitivo comparado por exemplo com *Bacillus* o qual é conhecido por produzir uma ampla gama de compostos antimicrobianos (YUAN et al., 2012; XU et al., 2013; ARGUELLES –ARIAS et al., 2013).

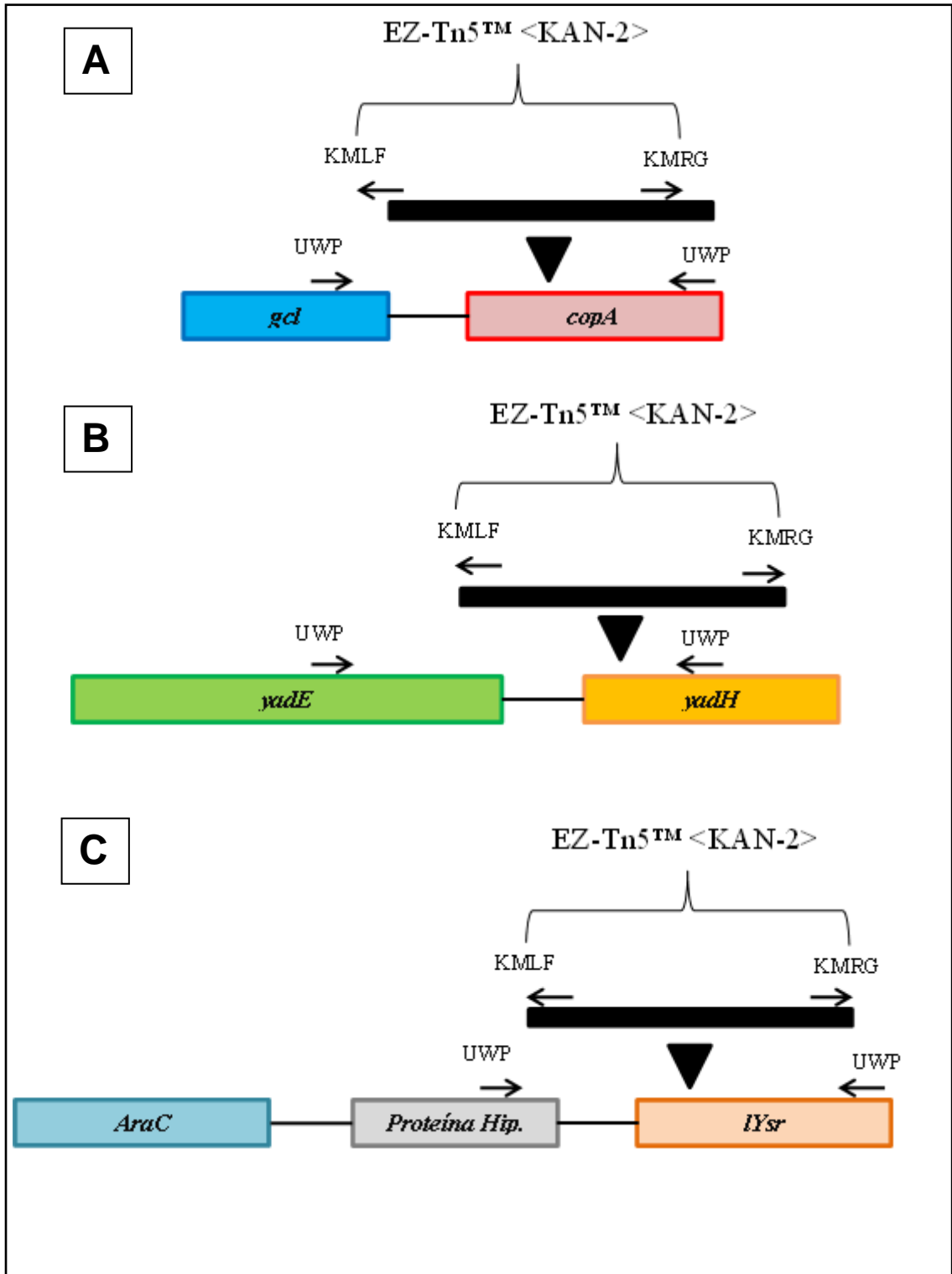


Figura 2. Mapa físico dos genes de *E. cloacae* contendo o EZ::TN <KAN-2>. (A) Mutante M3. (B) Mutante M4 e (C) Mutante M5. As sequências foram obtidas por meio do caminharmento no genoma.

O sequenciamento dos flancos do transposon inserido nos mutantes M3, M4 e M5 determinou mediante análises *in silico* com espécies do gênero *Enterobacter* que a regiões de inserção tem alto grau de identidade com *E. sacchari* SP1 ([CP007215.2](#)) e *Enterobacter* sp. R4-368 ([CP005991.1](#)), ambos endofíticos fixadores de nitrogênio e promotores de crescimento isolados de cana de açúcar e pinha manso, respectivamente (ZHU et al., 2012; MADHAIYAN et al., 2013). Houve, ainda, identidade com endofíticos de pimenta ENHKU01([CP003737.1](#)) e gramíneas P101([CP006580.1](#)) (LIU et al., 2012; HUMANN et al., 2014), *E. asburiae* L1 ([CP007546.1](#)) utilizada como modelo para estudos de quorum sensing e isolada de folhas de alface (LAU et al., 2013) e *E. cloacae* EcWSU1 ([CP002886.1](#)) patogênica de cebola (HUMANN et al., 2011).

Em outros gêneros tem alto grau de identidade com *Serratia marcescens* SM39 (patógeno humano, [AP013063.1](#)), *Serratia marcescens* WW4 (águas residuais, [CP003959.1](#)), *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* Db11(amostra ambiental, [HG326223.1](#)).

Mutante 3

O sequenciamento dos flancos do transposon inserido no mutante M3 determinou mediante análises *in silico* que a região de inserção tem alto grau de identidade com o gene *copA*. CopA pertence à superfamília das P-ATPases e amplamente distribuída em todos os reinos, em procariontes e em alguns eucariotes sua função é proteger as células em condições ambientais extremas (CHAN et al., 2010; RAIMUNDA et al., 2011).

Há pouca informação a respeito da história de evolução da *CopA*, embora não é descartada a teoria de que a transferência lateral de genes poderia ter desempenhado um papel importante na evolução das ATPases tipo P_{IB} (COOMBS; BARKAY, 2005). *copA* codifica para uma oxidase periplásmica multicobre que bombeia o excesso de cobre do citoplasma para o periplasma (RENSING et al., 2000). Juntamente com a proteína CusC bombeia o cobre ao espaço extracelular e, portanto, contribuem com a homeostase deste metal em gamma proteobacterias (HERNÁNDEZ-MONTES et al., 2012). A capacidade do cobre para alternar entre dois estados de oxidação (Cu⁺ e Cu²⁺) faz deste metal

um ideal cofator das enzimas redox presente na grande maioria dos organismos vivos (desde as bactérias aos humanos). Várias cuproenzimas incluindo amino oxidases, oxidases c do citocromo, lacases, metano-monooxigenases, multi-cobre oxidases, nitrito oxidases, superóxido dismutase, tirosinases desempenham funções importantes em processos celulares, tais como: a transdução de energia, a mobilização do ferro e a resposta ao estresse oxidativo (ARREDONDO; NUÑEZ, 2005; GRASS et al., 2011). O excesso de cobre é altamente tóxico para as células podendo interagir com os grupos tiol proteinogênicos livres, desestabilizar cofatores ferro-enxofre, concorrer com outros metais por sítios de ligação nas proteínas, entre outros (CHILLAPPAGARI et al., 2010; HINIKER et al., 2005).

Bactérias patogênicas a plantas também contem genes que codificam CopA, *A. tumefaciens*, (NAWAPAN et al., 2009) e *P. syringae* (MILLS et al., 1993). Em termos de colonização de plantas por bactérias benéficas já foi reportada a importância do gene *cueA* com alto grau de similaridade com *copA* em *Pseudomonas fluorescens* habitantes comuns da rizosfera (ZHANG; RAINEY, 2007). Na área médica em estudos com *Streptococcus pneumoniae* se determinou que CopA esta envolvida com a virulência da bactéria (SHAFEEQ et al., 2011). Assim mesmo *Enterococcus Hirae* CopA provavelmente atua como um exportador de baixa atividade que prevê cobre para enzimas extracitoplásmicas.

Mutante 4

Quando alinhadas a sequências obtidas mediante o *Directional Walking* do mutante M4 com os genomas na base de dados, observa-se que o transposon foi inserido em um gene que codifica para uma permease do sistema de transporte ABC. Uma das maiores e mais antigas famílias de proteínas com representantes em todos os filos são as proteínas de transporte ABC (ATP-binding cassette). Os genes que as codificam encontram-se no conjunto mínimo de genes necessários para sustentar a vida bacteriana (GLASS et al., 2005). Elas utilizam a energia das ligações e hidrólise de ATP para transportar diversos compostos através das membranas celulares. As proteínas ABC podem atuar como importadoras de açúcares, íons, peptídeos e moléculas orgânicas mais complexas ou exportadoras de toxinas (JONES; GEORGE, 2004; DAVIDSON et al., 2008).

Em estudos de micro-organismos utilizados em controle biológico, observou-se a expressão de genes das proteínas de transporte ABC em *Pseudomonas putida* durante a colonização de *Phytophthora parasitica* (LEE; COOKSEY, 2000). O mesmo comportamento foi observado na colonização de sementes por *Pseudomonas protegens* (KIDARSA et al., 2013). Foi reportado que um gene que codifica para um hipotético transportador ABC está envolvido com a competitividade de *Erwinia chrysanthemi* contra bactérias endofíticas durante a infecção (LLAMA-PALACIOS et al., 2002). Em bactérias associadas a colonização da rizosfera, tal como *Pseudomonas fluorescens* as proteínas de transporte ABC estão envolvidas com a formação de biofilme já que participam na secreção de LapA uma proteína associada com a superfície celular que é importante no processo de adesão (HINSA et al., 2003). Da mesma maneira acontece com LapF em *Pseudomonas putida* (MARTÍNEZ-GIL et al., 2010). Em *Pantoea stewartii* o sistema de transporte ABC é indispensável para colonizar de plantas e insetos (CORREA et al., 2012).

Permeases aproveitem a hidrólise do ATP e a energia gerada para induzir alterações conformacionais no complexo permease e, assim permitir o transporte de diferentes compostos. Para colonizar satisfatoriamente e estabelecer-se dentro das espécies vegetais uma bactéria endofítica deve ser capaz de obter nutrientes, resistir o eludir os sistemas de defesa das plantas e competir com outros micro-organismos presentes. Processos indispensáveis para a sobrevivência e persistência da mesma como foi reportado em *Enterobacter* e *Burkholderia* (TAGHAVI et al., 2010; ALI et al., 2014).

Mutante 5

O transposon foi inserido no mutante M5 em uma que a região com alta identidade com um regulador transcricional LysR. A família de reguladores transcricionais LysR (LTTR) representa o tipo mais abundante de reguladores desse tipo no reino procariótico que podem atuar como ativadores ou repressores. Eles são altamente conservados em bactérias com ortólogos funcionais identificados em archaea e organismos eucarióticos. Numerosas LTTRs foram identificados, e esta família de reguladores está aumentando continuamente. Atualmente compreende a maior família conhecida de proteínas de ligação ao

DNA procariótico com mais de 800 membros identificados (ZAIM; KIERZEK, 2003; MADDOCKS; OYSTON, 2008). LTTR controlam um diverso grupo de genes que estão envolvidos principalmente com virulência, metabolismo, quorum sensing e motilidade em bactérias (MADDOCKS; OYSTON, 2008).

Um estudo *in silico* para determinar os genes envolvidos com o comportamento endofítico de *Burkholderia* revelou a ativação de genes LTTR através do reconhecimento de diferentes co-indutores, alguns dos quais respondem pela concentração celular do aminoácido lisina (ALI et al., 2014). Já em *Klebsiella pneumoniae* bactéria entérica, relatada como fixadora de nitrogênio e promotora de crescimento de algumas culturas, como milho e trigo, também foi reportada a presença de famílias de reguladores transcricionais entre estes LTTR (FOUTS et al., 2008)

Uma análise metagenômica da comunidade endofítica que coloniza raízes de arroz revelou que o microbioma possui alta quantidade e diversidade de reguladores transcricionais (SESSITSCH et al., 2012). Em *Burkholderia cenocepacia* LTTR influencia a expressão de quorum sensing e genes *afc* necessários para a produção de um agente antifúngico contra *Rhizoctonia solani* (O'GRADY et al., 2011). Em *Pseudomonas chlororaphis*, controlador biológico do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* uma LTTR denominada PtrA é essencial para a produção de fenazina, um antibiótico usado em controle biológico (KLAPONSKI et al., 2014). Já em algumas espécies de *Pseudomas* e *Burkholderia* esta proteína é reportada como envolvida na formação de biofilme (FAZLI et al., 2014). Na bactéria patogênica *Pseudomonas syringae*, genes LTTR são induzidos durante a colonização da superfície das folhas das plantas hospedeiras (MARCO et al., 2005).

Foi importante identificar esses três genes que segundo a literatura estão envolvidos direta ou indiretamente com processos de estabelecimento de bactérias que aparentemente não são patogênicas a plantas como no caso de *E. cloacae* 344 em pepino. Após a validação através de *Southern Blot* iremos proceder com testes bioquímicos que enriquecerão o entendimento do comportamento dos mutantes estudados.

REFERÊNCIAS

- ALI, S., DUAN, J., CHARLES, T. C., GLICK, B. R. A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. **Journal of Theoretical Biology**, v.343, p.193-198, 2014.
- ALQUÉRES, S., MENESES, C., ROUWS, L., ROTHBALLER, M., BALDANI, I., SCHMID, M., HARTMANN, A. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.26, n. 8, p. 937-945, 2013.
- ANDREOTE, F., MORTATTI, M.J., DE SOUZA, A., MACCHERONI, W. J., AZEVEDO, J. L. ARAÚJO, W. L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 169-173, 2004.
- ARGUELLES-ARIAS, A. A., ONGENA, M., DEVREESE, B., TERRAK, M., JORIS, B., FICKERS, P. Characterization of amylolysin, a novel lantibiotic from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. **PloS One**, v.8, e83037,2013.
- ARREDONDO, M., NÚÑEZ, M. T. Iron and copper metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, v.26, n.4, p.313-327, 2005.
- AYRES M., AYRES JÚNIOR M., AYRES D.L., SANTOS A.A.S. BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas, Belém-Pará, 364pp. 2007.
- BAPTISTA, J.C., MACHADO, M.A., HOMEN, R.A., TORRES, P.S., VOJNOV, A.A., AMARAL, ALEXANDRE MORAIS DO. Mutation in the *xpsD* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.1, p.146-153, 2010.
- BÖHM, M., HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v.20, n.5, p.526-533, 2007.

CHAN, HENRY., BABAYAN, B., GANDHI, C., HAK, K., HARAKE, D., KUMAR, K., LEE, P., LI, T., LIU, H. Y. LO, T. C. T., MEYER, C. J. STANFORD, S., ZAMORA, K. S., SAIER, J. The p-type ATPase superfamily. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.1-2, p.5-104, 2010.

CHILLAPPAGARI, S., SEUBERT, A., TRIP, H., KUIPERS, O. P., MARAHIEL, M. A., MIETHKE, M. Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.10, p.2512-2524, 2010.

COOMBS, J. M.; BARKAY, T. New findings on evolution of metal homeostasis genes: evidence from comparative genome analysis of bacteria and archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.7083-7091, 2005.

CORREA, V. R., MAJERCZAK, D. R., AMMAR, E. D., MERIGHI, M., PRATT, R. C., HOGENHOUT, S. A., COPLIN, D., REDINBAUGH, M. G. The bacterium *Pantoea stewartii* uses two different type III secretion systems to colonize its plant host and insect vector. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.17, p.6327-6336, 2012.

DAVIDSON, A. L.; MALONEY, P. C. ABC transporters: how small machines do a big job. **Trends in Microbiology**, v.15, n.10, p.448-455, 2007.

DE SANTI FERRARA, F. I., OLIVEIRA, Z. M., GONZÁLES, H. H. S., FLOH, E. I. S., BARBOSA, H. R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant and soil**, v.353, p.409-417, 2012.

FAZLI, M., ALMBLAD, H., RYBTKE, M. L., GIVSKOV, M., EBERL, L., TOLKER-NIELSEN, T. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. **Environmental Microbiology**, 2014

FOUTS, D.E., et al. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS Genetics**, v.4, n.7, e1000141, 2008.

GLASS, John I., ASSAD-GARCÍA, N., ALPEROVICH, N., YOOSEPH, S., LEWIS, M., MARUF, M., HUTCHISON, C., SMITH, H., VENTER, C. Essential genes of a minimal bacterium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.2, p.425-430. 2006.

GRASS, G., RENSING, C., SOLIOZ, M. Metallic copper as an antimicrobial surface. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.5, p.1541-1547, 2011.

HERNÁNDEZ-MONTES, G., ARGÜELLO, J., VALDERRAMA, B. Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria. **BMC Microbiology**, v.12, n.1, p.249, 2012.

HINIKER, A., COLLET, J. F., BARDWELL, J. C. Copper stress causes an in vivo requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.40, p.33785-33791, 2005.

HINSA, S. M., ESPINOSA-URGEL, M., RAMOS, J. L., O'TOOLE, G. A. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. **Molecular Microbiology**, v.49, n.4, p.905-918., 2003.

HUMANN, J. L., WILDUNG, M., CHENG, C. H., LEE, T., STEWART, J. E., DREW, J. C., TRIPLETT, E. W., MAIN, D., SCHROEDER, B. K. Complete genome of the onion pathogen *Enterobacter cloacae* EcWSU1. **Standards in Genomic Sciences**, v. 5, n.3, p. 279-286, 2011.

HUMANN, J. L., WILDUNG, M., POUCHNIK, D., BATES, A. A., DREW, J. C., ZIPPERER, U. N., TRIPLETT, E. W. MAIN, D., SCHROEDER, B. K. Complete genome of the switchgrass endophyte *Enterobacter cloacae* P101. **Standards in Genomic Sciences**, v.9, n.3, 2014.

INTORNE, ALINE C., DE OLIVEIRA, M. V., PEREIRA, L., DE SOUZA, G. A. Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in

Gluconacetobacter diazotrophicus PAI 5. **International Microbiology**, v.15, n.2, p. 69-78, 2012.

JONES, P. M.; GEORGE, A. M. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n.6, p.682-699, 2004.

KIDARSA, T. A., SHAFFER, B. T., GOEBEL, N. C., ROBERTS, D. P., BUYER, J. S., JOHNSON, A., KOBAYASHI, D., ZABRISKIE, T., PAULSEN, I., LOPER, J. E. Genes expressed by the biological control bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 on seed surfaces under the control of the global regulators GacA and RpoS. **Environmental Microbiology**, v.15, n.3, p.716-735, 2013.

KLAPONSKI, N., SELIN, C., DUKE, K., SPICER, V., FERNANDO, D. W., BELMONTE, M. F., DE KIEVIT, T. R. The requirement for the LysR-type regulator PtrA for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol revealed through proteomic and phenotypic analysis. **BMC Microbiology**, v.14, n.1, p.94, 2014.

LAU, Y. Y., SULAIMAN, J., CHEN, J. W., YIN, W. F., CHAN, K. G. Quorum sensing activity of *Enterobacter asburiae* isolated from lettuce leaves. **Sensors**, v.13, n.10, p.14189-14199, 2013.

LEE, S. W., COOKSEY, D. A. Genes Expressed in *Pseudomonas putida* during Colonization of a Plant-Pathogenic Fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7, p.2764-2772, 2000.

LEITE, H. A. C., SILVA, A. B., GOMES, F. P., GRAMACHO, K. P., FARIA, J. C., DE SOUZA, J. T., LOGUERCIO, L. L. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, n.6, p.2639-2651, 2013.

LIU, S., HU, X., LOHRKE, S. M., BAKER, C. J., BUYER, J. S., DE SOUZA, J. T., ROBERTS, D. P. Role of *sdhA* and *pfkA* and catabolism of reduced carbon during

colonization of cucumber roots by *Enterobacter cloacae*. **Microbiology**, v.153, n. 9, p.3196-3209, 2007.

LIU, W. Y., CHUNG, K. M. K., WONG, C. F., JIANG, J. W., HUI, R. K. H., LEUNG, F. C. C. Complete genome sequence of the endophytic *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* strain ENHKU01. **Journal of Bacteriology**, v.194, n.21, p.5965-5965, 2012.

LLAMA-PALACIOS, A., LÓPEZ-SOLANILLA, E., RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. The *ybiT* gene of *Erwinia chrysanthemi* codes for a putative ABC transporter and is involved in competitiveness against endophytic bacteria during infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1624-1630, 2002

MADDOCKS, S. E., OYSTON, P. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. **Microbiology**, v.154, n.12, p. 3609-3623, 2008.

MADHAIYAN, M., PENG, N., JI, L. Complete Genome Sequence of *Enterobacter* sp. Strain R4-368, an Endophytic N-Fixing Gammaproteobacterium Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Jatropha curcas* L. **Genome Announcements**, v.1, n. 4, e00544-13, 2013.

MAO, W., LUMSDEN, R. D., LEWIS, J. A., HEBBAR, P. K. Seed treatment using pre-infiltration and biocontrol agents to reduce damping-off of corn caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. **Plant Disease**, v.82, n.3, p.294-299, 1998.

MARCO, M. L., LEGAC, J., LINDOW, S. E. *Pseudomonas syringae* genes induced during colonization of leaf surfaces. **Environmental Microbiology**, v.7, n.9, p. 1379-1391, 2005.

MARTÍNEZ-GIL, M; YOUSEF-CORONADO, F; ESPINOSA-URGEL, Manuel. LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. **Molecular Microbiology**, v.77, n.3, p. 549-561. 2010.

MILLS, S. D., JASALAVICH, C. A., COOKSEY, D. A. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.6, p.1656-1664, 1993.

MISHRA, R. N., SINGLA-PAREEK, S. L., NAIR, S., SOPORY, S. K., REDDY, M. K. Directional genome walking using PCR. **Biotechniques**, v.33, n.4, p.830-834, 2002.

NAVEED, M., MITTER, B., YOUSAF, S., PASTAR, M., AFZAL, M., SESSITSCH, A. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. **Biology and Fertility of Soils**, v.50, n.2, p. 249-262, 2014.

NAWAPAN, S., CHAROENLAP, N., CHAROENWUTTITAM, A., SAENKHAM, P., MONGKOLSUK, S., VATTANAVIBOON, P. Functional and expression analyses of the cop operon, required for copper resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.19, n.16, p.5159-5168, 2009.

NIE, L., SHAH, S., RASHID, A., BURD, G. I., GEORGE DIXON, D., GLICK, B. R. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, n. 4, p.355-361, 2002.

O'GRADY, E. P., NGUYEN, D. T., WEISSKOPF, L., EBERL, L., SOKOL, P. A. The *Burkholderia cenocepacia* LysR-type transcriptional regulator ShvR influences expression of quorum-sensing, protease, type II secretion, and *afc* genes. **Journal of Bacteriology**, v.193, n.1, p.163-176, 2011.

RAIMUNDA, D., GONZÁLEZ-GUERRERO, M., LEEBER, B., ARGÜELLO J. M. The transport mechanism of bacterial Cu⁺-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. **Biometals**, v.24, n. 3, p. 467-475, 2011.

REINHOLD-HUREK, B., MAES, T., GEMMER, S., VAN MONTAGU, M., HUREK, T. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v.19, n.2, p.181-188, 2006.

RENSING, C., FAN, B., SHARMA, R., MITRA, B., ROSEN, B. P. CopA: an *Escherichia coli* Cu (I)-translocating P-type ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, n.2, p.652-656, 2000.

ROBERTS, D. P., DERY, P. D., YUCEL, I., BUYER, J., HOLTMAN, M. A., KOBAYASHI, D. Y. Role of *pfkA* and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n. 6, p.2513-2519, 1999.

ROBERTS, D.P., LOHRKE, S.M., MCKENNA, L., LAKSHMAN, D.K., KONG, H., LYDON, J. Mutation of a *degS* Homologue in *Enterobacter cloacae* Decreases Colonization and Biological Control of Damping-Off on Cucumber. **Phytopathology**, v.101, n. 2, p. 271-280, 2011.

ROBERTS, D.P., MCKENNA, L., LOHRKE, S.M., REHNER, S., DE SOUZA J.T. Pyruvate dehydrogenase activity is important for colonization of seeds and roots by *Enterobacter cloacae*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, n.8, p. 2150-2159, 2007.

SESSITSCH, A., HARDOIM, P., DÖRING, J., WEILHARTER, A., KRAUSE, A., WOYKE, T., MITTER, B., HAUBERG-LOTTE, L., FRIEDRICH, F., RAHALKAR, M., HUREK, T., SARKAR, A., BODROSSY, L., VAN OVERBEEK, L., BRAR, D., VAN ELSAS, J.D., REINHOLD-HUREK, B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.25, n.1, p. 28-36. 2012.

SHAFEEQ, S., YESILKAYA, H., KLOOSTERMAN, T. G., NARAYANAN, G., WANDEL, M., ANDREW, P. W., KUIPERS, O. P., MORRISSEY, J. A. The cop

operon is required for copper homeostasis and contributes to virulence in *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v.81, n.5, p.1255-1270, 2011.

TAGHAVI, S., VAN DER LELIE, D., HOFFMAN, A., ZHANG, Y. B., WALLA, M. D., VANGRONSVELD, NEWMAN, L., MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PLoS Genetics**, v.6, n. 5, e1000943, 2010.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J., LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, v.5, n.1, p.25-40, 1994.

XU, Z., SHAO, J., LI, B., YAN, X., SHEN, Q., ZHANG, R. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p.808-815, 2013.

YUAN, J., RAZA, W., HUANG, Q., SHEN, Q. The ultrasound-assisted extraction and identification of antifungal substances from *B. amyloliquefaciens* strain NJN-6 suppressing *Fusarium oxysporum*. **Journal of Basic Microbiology**, v.52, n.6, p.721-730, 2012.

ZAIM, J, KIERZEK, A. M. The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.5, p.1444-1454, 2003.

ZHANG, X. X., RAINEY, P. B. The role of a P1-type ATPase from *Pseudomonas fluorescens* SBW25 in copper homeostasis and plant colonization. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.20, n.5, p.581-588, 2007.

ZHU, B., ZHOU, Q., LIN, L., HU, C., SHEN, P., YANG, L., AN, Q., XIE, G., LI, Y. *Enterobacter sacchari* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with sugar

cane (*Saccharum officinarum* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.2577-2582, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O análise de genes adicionais *gyrA*, e *recA* além do 16S rRNA permitiu reclassificar o isolado 629 em *Bacillus amyloliquefaciens*.

Tanto *Enterobacter cloacae* como *Bacillus amyloliquefaciens* podem multiplicarse em diferentes tipos de cultivo, apresentando melhor colonização em condições estéreis colonizando principalmente folhas. Conhecer a preferência das bactérias benéficas por colonizar diferentes hospedeiros e tecidos vegetais poderá ser útil ao utiliza-las em controle biológico. Podendo de essa forma direcionar o manejo adequado á cultura e ao patógeno.

As informações geradas nesse trabalho sobre os genes envolvidos em colonização endofítica poderão contribuir para a procura de isolados mais eficientes na colonização. É esperado que em longo prazo, esses conhecimentos ajudem no emprego de bactérias endofíticas em plantas de interesse econômico.

Utilizando a estratégia de mutações sítio-dirigida continuaremos a explorar os dados obtidos neste trabalho visando verificar se outros genes já reportados na literatura como importantes na colonização endofítica também apresentarão tal comportamento em *E. cloacae* 344.