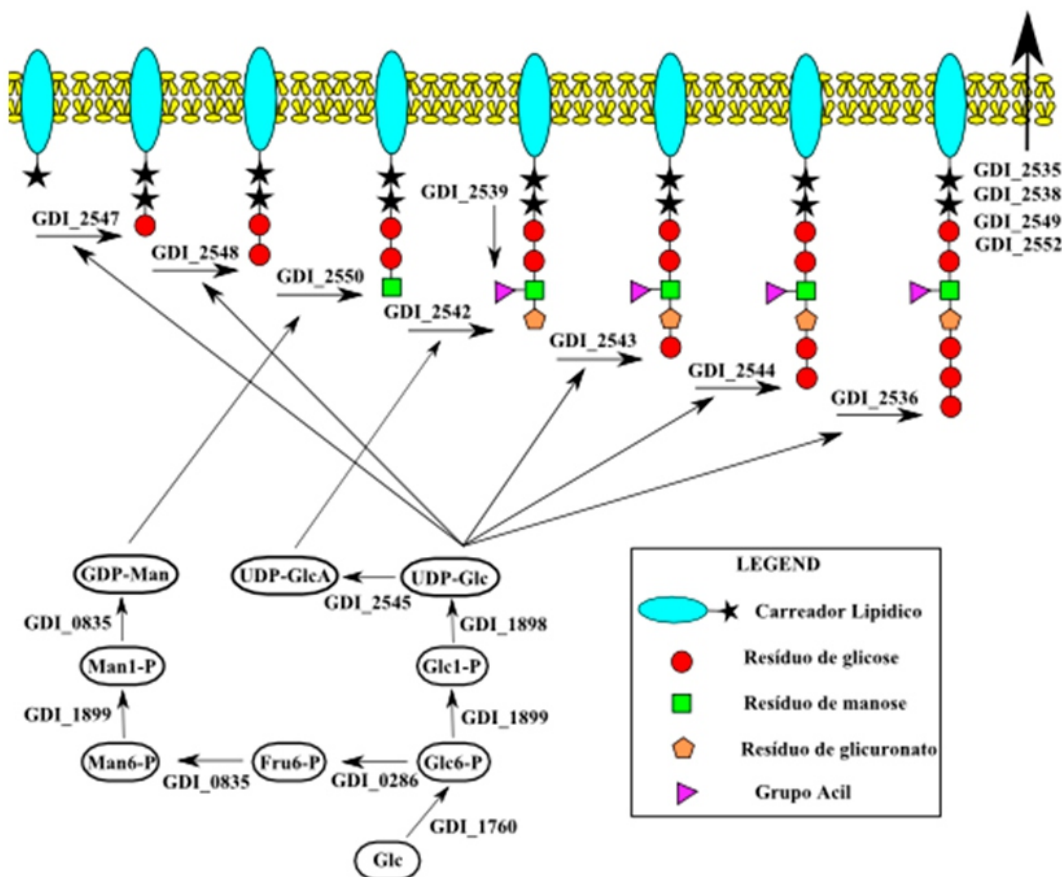


O uso do genoma de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 para reconstrução de uma via de biossíntese de exopolissacarídeos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 81

O uso do genoma de *Gluconacetobacter* *diazotrophicus* PAL5 para reconstrução de uma via de biossíntese de exopolissacarídeos

Carlos Henrique S. Gadelha Meneses
Luc Felicianus Marie Rouws
Jean Luiz Simões Araújo
Márcia Soares Vidal
José Ivo Baldani

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno J. R. Alves, Ednaldo da Silva Araújo,
Guilherme Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luís Henrique
de Barros Soares

Supervisora editorial: Norma Gouvêa Rumjanek

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Márcia Soares Vidal

1ª edição

1ª impressão (2011): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agrobiologia

U84 USO do genoma de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 para reconstrução de uma via de biossíntese de exopolissacarídeos. / Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2011. 23 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 81).

ISSN 1676-6709

1. Bactéria diazotrófica. 2. Exopolímero. 3. Rota metabólica. I. Rouws, Luc Felicianus Marie. II. Simões-Araujo, Jean Luiz. III. Vidal, Márcia Soares. IV. Baldani, José Ivo. V. Embrapa Agrobiologia. VI. Série.

572.566 CDD 23. ed.

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	10
Anotação das vias metabólicas de EPS em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5	10
Predição da estrutura do EPS	14
Conclusões	16
Referências Bibliográficas	18

O uso do genoma de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 para reconstrução de uma via de biossíntese de exopolissacarídeos

Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses¹,
Luc Felicianus Marie Rouws², Jean Luiz Simões
Araújo², Márcia Soares Vidal², José Ivo Baldani²

Resumo

Análises genômicas da bactéria diazotrófica endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 revelaram a presença de um agrupamento de 15 regiões abertas de leitura (ORFs, do inglês *Open Reading Frame*), semelhantes aos genes gum presentes em *Xanthomonas campestris* e responsáveis pela biossíntese de exopolissacarídeo nessa bactéria. A presença de algumas ORFs envolvidas na síntese de açúcares precursores e a existência de genes relacionados à montagem da estrutura de exopolissacarídeos (EPS) sugeriram que *G. diazotrophicus* é capaz de sintetizar um novo tipo de EPS. As análises *in silico* realizadas sugerem que esse EPS consiste provavelmente em uma molécula heptassacarídica com unidades repetitivas montadas através da adição sequencial de glicose-1-fosfato, glicose, manose, ácido glucurônico, glicose, glicose e glicose em um carreador lipídico poli-prenol fosfato. As análises *in silico* evidenciaram a presença de uma rota de biossíntese de EPS em *G. diazotrophicus*. Os resultados obtidos sugerem que *G. diazotrophicus* produz uma nova molécula de EPS.

¹ Bolsista no Laboratório de Genética e Bioquímica, Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil.

² Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil.

Using the *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 genome for reconstruction of an exopolysaccharide biosynthesis pathway

Abstract

*Genomic analysis of the endophytic diazotrophic *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain PAL5 revealed the presence of a cluster containing ORFs, similar to the *Xanthomonas campestris* gum genes, which are responsible for the exopolysaccharide biosynthesis in these bacteria. The presence of some ORFs involved in the synthesis of sugar precursors and exopolysaccharide (EPS) assembly suggested that *G. diazotrophicus* is able to synthesize a novel EPS. Analyses suggest that this EPS probably consists of polymerized heptasaccharide repeat-units assembled by the sequential addition of glucose-1-phosphate, glucose, mannose, glucuronic acid, glucose, glucose and glucose on a polyprenol phosphate carrier. In silico analyses showed the presence of a pathway of EPS biosynthesis in *G. diazotrophicus*. The results suggest that *G. diazotrophicus* produces a new EPS molecule.*

Keywords: Endophytic diazotrophic, Exopolymer, Prediction, Metabolic pathway.

Introdução

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria diazotrófica endofítica encontrada colonizando plantas como cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988), batata-doce (*Ipomoea batatas*), café (*Coffea arabica*), abacaxi (*Ananas comosus*) (BALDANI e BALDANI, 2005) e arroz (*Oryza sativa*) (MUTHUKUMARASAMY et al., 2007). Além da capacidade de fixar nitrogênio em associação com plantas (SEVILLA et al., 2001), foi demonstrado que essa bactéria tem outras habilidades fisiológicas interessantes, tais como: a produção de hormônios vegetais, a solubilização do fosfato e do zinco e o controle de fitopatógenos (SARAVANAN et al., 2007).

Bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas ou associativas geralmente são produtoras de EPSs, como tem sido demonstrado para aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azoarcus*, *Azospirillum* e *Azotobacter* (MORRIS e GONZALEZ, 2009). Os EPSs podem tanto contribuir para o crescimento como para a sobrevivência da bactéria dentro da planta, auxiliando na colonização e na criação de um microambiente favorável, quando atuar como barreira física contra os mecanismos de defesa da planta (DOW et al., 2000). Outro papel funcional dos EPSs tem sido atribuído ao mecanismo envolvido na adaptação e na sobrevivência de bactérias cultivadas em condições adversas, como salinidade (XAVIER et al., 1998), alta temperatura (OSA-AFIANA e ALEXANDER, 1982) e estresse osmótico (CUNNINGHAM e MUNNS, 1984).

Em geral, a biossíntese de EPS por bactérias Gram-negativas é catalisada por enzimas codificadas por genes designados como *gum*, *eps* ou *exp*. Esses genes são nomeados de *gumB* a *gumM* no genoma das bactérias fitopatogênicas do tipo *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (KATZEN et al., 1998). Homólogos desses genes já foram identificados em outras bactérias fitopatogênicas como *Xylella fastidiosa* (SILVA et al., 2001) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (SILVA et al., 2002). Da mesma forma, também foram encontrados

homólogos em *Gluconacetobacter xylinus* (GRIFFIN et al., 1996a), uma bactéria do mesmo gênero da bactéria alvo deste estudo, e em *Azoarcus* sp. estirpe BH72, uma bactéria fixadora de nitrogênio que coloniza endofiticamente plantas de arroz (KRAUSE et al., 2006).

Recentemente, a sequência completa do genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* foi publicada (BERTALAN et al., 2009), facilitando assim o estudo funcional de genes envolvidos no processo de infecção e colonização de plantas hospedeiras como, por exemplo, os genes com provável função na biossíntese de polissacarídeos capsulares (CPS), lipo-polissacarídeos (LPS), proteínas de superfície envolvidas na motilidade e adesão (pili e flagelos) e polissacarídeos extracelulares (EPS), os quais foram identificados no genoma desta estirpe.

A comparação entre sequências primárias de proteínas deduzidas a partir do sequenciamento de genes que codifiquem proteínas de mesma função em diferentes organismos é uma ferramenta poderosa para a construção de novas rotas metabólicas com características definidas, sendo estas depois validadas por meio de técnicas de engenharia genética, como já executado para *Xylella fastidiosa* (HOPKINS et al., 1989).

Neste trabalho, discutimos as características dessas ORFs (genes *gum* envolvidos na síntese de EPS) e predizemos uma rota metabólica putativa para a biossíntese de exopolissacarídeos por *G. diazotrophicus* PAL5, bem como a sua natureza química.

Material e Métodos

A identificação e a anotação das ORFs relacionadas à biossíntese de exopolissacarídeos presentes no genoma de PAL5 foi realizada por meio do programa ARTEMIS (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>), com o auxílio de ferramentas tais como: BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), associada a consultas ao KEGG (*Kyoto Encyclopedia*

of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/>), ao NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e ao Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). Essas ferramentas permitiram a comparação das sequências derivadas do genoma de *G. diazotrophicus* com sequências de ácidos nucleicos e proteínas, a disponibilização de *links* para mapas metabólicos e a busca por motivos proteicos conservados e/ou evidências experimentais, que são essenciais nas predições manuais ou computacionais de rotas putativas de biossíntese.

A significância estatística das similaridades de sequências entre genes homólogos foi determinada através dos programas RDF2 (PEARSON e LIPMAN, 1988) e Gap (DEVEREUX et al., 1984). As sequências homólogas foram alinhadas empregando-se o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997). A identidade entre homólogos foi calculada de acordo com o percentual de resíduos idênticos em um alinhamento. As análises de hidropaticidade foram realizadas conforme descrito por Kyte e Doolittle (KYTE e DOOLITTLE, 1982) com uma janela deslizante de 20 resíduos. O programa PSort (NAKAI et al., 1999) foi utilizado para prever a localização celular e domínios transmembrana das proteínas.

Resultados e Discussão

Anotação das vias metabólicas de EPS em *G. diazotrophicus* PAL5

A anotação do genoma de *G. diazotrophicus* possibilitou a identificação de uma região contendo 15 ORFs homólogas aos genes que compõem o agrupamento responsável pela produção de exopolissacarídeos nas bactérias *Xanthomonas campestris* (SIMPSON et al., 2000), *Xylella fastidiosa* (SILVA et al., 2001), *Azoarcus* sp. BH72 (KRAUSE et al., 2006) e *Gluconacetobacter xylinus* (ISHIDA et al., 2002). Essas 15 ORFs também estão arranjadas na forma de um agrupamento e ocupam aproximadamente 19,7 kb no genoma de *G. diazotrophicus*. Conforme observado na Fig. 1, a análise de sintenia realizada no programa

ARTEMIS revelou um alto grau de similaridade entre os operons desses genes em *G. diazotrophicus* com os de *X. campestris* pv. *campestris* e *G. xylinus*.

Análises comparativas de bioinformática mostraram que a maioria das ORFs (Tab. 1) e a organização dos genes *gum* (Fig. 1) na estirpe PAL5 é mais semelhante ao agrupamento ace de *G. xylinus*, que é responsável pela produção da goma produzida por essa bactéria, conhecida como acetan (ISHIDA et al., 2002). Em contrapartida, não foram encontrados homólogos aos genes *gum* no genoma *Gluconobacter oxydans*, outro membro da família Acetobacteriaceae, cujo genoma já foi sequenciado. Não foram encontrados homólogos em *G. xylinus* para quatro ORFs do agrupamento gum (*gumE*, *gumJ*, *gumK* e *eglA*) da estirpe PAL5; contudo, essas mesmas ORFs são similares a genes de fitopatógenos filogeneticamente mais distantes, como: *X. campestris* pv. *campestris*, *X. fastidiosa* e ao endófito *Azoarcus* sp. BH72 (Fig. 1).

Doze genes (*gumB*, *gumC*, *gumD*, *gumE*, *gumF*, *gumG*, *gumH*, *gumI*, *gumJ*, *gumK*, *gumL* e *gumM*) compõem o agrupamento *gum* de *X. campestris* e codificam enzimas responsáveis pela biossíntese de EPS.

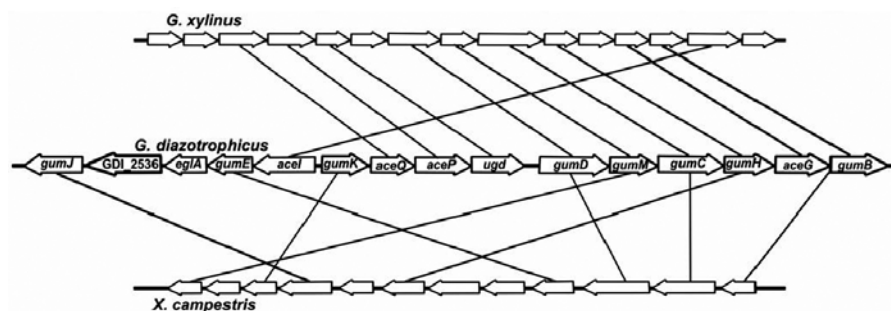


Fig. 1. Comparação dos agrupamentos de genes para biossíntese de exopolissacarídeo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *G. xylinus* e *Xanthomonas campestris*.

Tabela 1. Classificação, relação, homologia e função das ORFs encontradas no genoma de *G. diazotrophicus* possivelmente envolvidas na biossíntese de EPS.

Classe	ORFs*	Gene provavelmente homólogo a	Função
Precursor	GDI_0286	<i>Tal</i>	Transaldolase/fosfoglicose isomerase
Precursor	GDI_0835	<i>xanB</i>	Fosfomanose isomerase/GDP-manose pirofosforilase
Precursor	GDI_1760	<i>Glk</i>	Glicoquinase (hexoquinase)
Precursor	GDI_1898	<i>galU</i>	UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase
Precursor	GDI_1899	<i>xanA</i>	Fosfoglicomutase/Fosfomanomutase
Estrutural	GDI_2535	<i>gumJ</i>	Proteína de transporte
Estrutural	GDI_2536	-	Beta-D-1,6 glicosiltransferase
-	GDI_2537	<i>eglA</i>	Endo-1,4-beta-glicanase
Estrutural	GDI_2538	<i>gumE</i>	Polissacarídeo polimerase de superfície
Estrutural	GDI_2539	<i>aceI</i>	Aciltransferase
-	GDI_2540	-	Proteína hipotética
-	GDI_2541	-	Proteína hipotética
Estrutural	GDI_2542	<i>gumK</i>	Glucoroniltransferase
Estrutural	GDI_2543	<i>aceQ</i>	Glicosiltransferase (hexosiltransferase)
Estrutural	GDI_2544	<i>aceP</i>	Beta-D-1,6 glicosiltransferase
Precursor	GDI_2545	<i>Ugd</i>	Glucorônico-1-fosfato uridil transferase
-	GDI_2546	-	Proteína hipotética
Estrutural	GDI_2547	<i>gumD</i>	Fosfoprenol glicose-1-fosfato transferase (glicosiltransferase)
Estrutural	GDI_2548	<i>gumM</i>	Glicose-difosfoprenil beta-D-glicose transferase
Estrutural	GDI_2549	<i>gumC</i>	Proteína de transporte
Estrutural	GDI_2550	<i>gumH</i>	GDP-manose:celobiosil-difosfopoliprenol alfa-manosiltransferase
-	GDI_2551	<i>aceG</i>	Proteína hipotética
Estrutural	GDI_2552	<i>gumB</i>	Proteína de transporte

Conforme anotação do genoma de *G. diazotrophicus*, disponível no NCBI.

Desses genes, somente oito prováveis homólogos foram encontrados em *G. diazotrophicus*: *gumB*, *gumC*, *gumD*, *gumE*, *gumH*, *gumJ*, *gumK* e *gumM*. Nenhum dos outros quatro genes foi encontrado nem no agrupamento *gum* de *G. diazotrophicus*, nem em qualquer outra região do genoma, inclusive nos plasmídeos (Fig. 1).

Dez ORFs do cluster *gum* de PAL5 (*gumB*, *gumC*, *gumD*, *gumE*, *gumH*, *gumJ*, *gumK*, *gumM*, *ugd* e *eglA*) apresentaram homologia com ORFs do cluster *gum* de *Azoarcus* sp. BH72, que apresenta 15 genes responsáveis pela síntese de EPS (*gumB*, *gumC*, *gumD*, *gumE*, *gumF*, *gumH*, *gumJ*, *gumK*, *gumM*, *ugd*, *eglA*, *wzc1*, AZO 2243, AZO2244 e AZO 2245) (Fig. 1).

A maior similaridade encontrada foi entre o agrupamento *ace* de *G. xylinus* com os genes *gum* da estirpe PAL5, que também é composto por 15 genes (*aceA*, *aceB*, *aceC*, *aceD*, *aceE*, *aceF*, *aceG*, *aceH*, *aceI*, *aceJ*, *aceM*, *aceP*, *aceQ*, *aceR* e *aceS*). Em *G. xylinus*, esses genes codificam enzimas responsáveis pela biossíntese do EPS acetan. *G. diazotrophicus* possui 11 ORFs homólogas aos genes *aceA*, *aceB*, *aceC*, *aceD*, *aceG*, *aceH*, *aceI*, *aceM*, *aceP* e *aceQ* dentre os 15 genes do operon *ace* de *G. xylinus* (Fig. 1). A ORF *aceF* localiza-se em outro local do genoma de *G. diazotrophicus*, quando comparado com o genoma de *G. xylinus*.

A biossíntese de EPS depende da síntese prévia de carboidratos simples que serão incorporados nas moléculas poliméricas que compõem o EPS. Inicialmente, nucleotidil-açúcares precursores são produzidos por meio da conversão de outros açúcares do metabolismo de carboidratos. Por isso, uma análise genômica de PAL5 foi realizada visando à identificação de ORFs com provável papel na síntese desses carboidratos precursores. O genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* contém várias ORFs envolvidas na síntese de nucleotidil-açúcares (Fig. 2). As ORFs que codificam enzimas essenciais para a síntese desses nucleotidil-açúcares precursores encontrados em *G. diazotrophicus* são os genes *xanA*

(fosfoglicomutase/fosfomanomutase) e *xanB* (fosfomanose isomerase/GDP-D-mannose pirofosforilase) (GDI_1899 e GDI_0835) (KOPLIN et al., 1992). A biossíntese desses precursores também depende de outros genes como: *glk* (GDI_1760), uma glicoquinase; *tal* (GDI_0286), uma glicose-6-fosfato isomerase; *galU* (GDI_1898), uma UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase; e *ugd* (GDI_2545), uma UDP-glicose 6-dehidrogenase. Quatro das oito reações que definem essa via de biossíntese ramificada são controladas pelos genes *xanA* e *xanB*, em que ambos codificam enzimas bifuncionais (Tab. 1). A maioria desses genes codifica enzimas envolvidas no metabolismo basal de carboidratos comuns a quase todos os organismos vivos. Em microrganismos, esses genes são regulados por processos dirigidos com exigências específicas relacionadas ao hábitat ou a mudanças ambientais e são frequentemente organizados em *operons* (KATZEN et al., 1998).

Além dos genes descritos anteriormente, cuja função na biossíntese de precursores para a produção de EPS pode ser predita, alguns genes adicionais, com possível função na produção de EPS, também foram identificados. A ORF GDI_2551 apresenta homologia com o gene *aceG* de *G. xylinus*, sem função conhecida (ISHIDA et al., 2002). A presença de uma aciltransferase (ORF GDI_2539), homóloga a *acel* de *G. xylinus*, que catalisa a acetilação do resíduo de manose, foi observada no *operon gum* de *G. diazotrophicus*, embora o gene *gumF*, que codifica uma acetiltransferase I, esteja ausente, indicando uma provável acetilação do heptassacarídeo predito no presente estudo. Um gene que codifica uma endoglicanase (ORF GDI_2537) foi encontrado no agrupamento *gum* de *G. diazotrophicus*. Esse gene apresentou alta similaridade com *eglA* de *Azoarcus* sp. BH72 que, como mostrado por Reinhold-Hurek et al. (2006), parece estar envolvido com o estilo de vida endofítico dessa bactéria.

Predição da estrutura do EPS

Com base na presença de sete homólogos a genes que codificam glicosiltransferases (*gumD*, *gumM*, *gumH*, *gumK*, *aceQ*, *aceP* e uma

nova glicosiltransferase anotada como *GDI_2536*), podemos especular que o EPS produzido pela estirpe PAL5 seja composto de uma unidade de repetição heptassacarídica semelhante ao acetan e/ou à xantana (JANSSON et al., 1975; COLQUHOUN et al., 1995; GRIFFIN et al., 1996b).

O esquema representado na Fig. 2 mostra a ORF *GDI_2547* homóloga ao gene *gumD*, que codifica uma glicosiltransferase iniciadora, responsável pela adição da glicose-1-fosfato ao fosfato poliprenol,

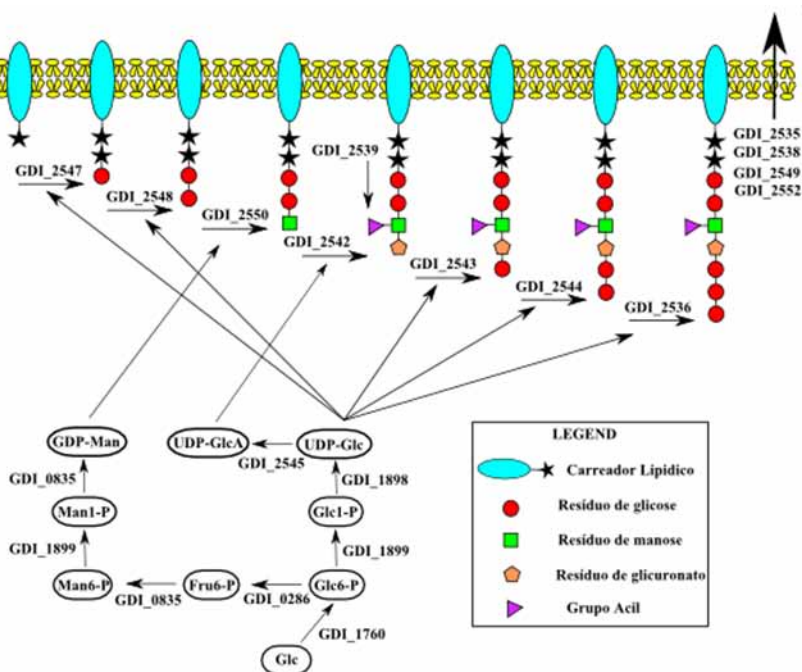


Foto: Carlos Henrique S. G. de Menezes

Fig. 2. Representação esquemática das sucessivas etapas da biossíntese de EPS por *G. diazotrophicus* PAL5. Esta figura é parcialmente baseada no modelo de *X. campestris* (SIMPSON et al., 2000) e *G. xylinus* (ISHIDA et al., 2002), com modificações baseadas na referência Bertalan et al. (2009).

formando o monossacarídeo-lipídio (P-Glc). A ORF GDI_2548 codifica a glicosiltransferase II (*gumM*), que adiciona a segunda unidade de glicose, formando um dissacarídeo-lipídio (P-Glc-Glc). Uma vez sintetizado o dissacarídeo, a cadeia lateral começa a ser formada com a adição de uma manose por uma manosiltransferase I (*gumH*) codificada pela ORF GDI_2550, gerando uma cadeia com estrutura representativa P-Glc-Glc_Man. A próxima etapa seria a adição de uma molécula de ácido glucurônico à manose, catalisada por uma glucuroniltransferase (GumK), codificada pela ORF GDI_2542, gerando uma cadeia com estrutura representativa P-Glc_Glc_Man_GlcAc. Em seguida, a aciltransferase codificada pela ORF GDI_2539 catalisaria a acilação da manose. A próxima enzima é uma glicosiltransferase II, codificada pela ORF GDI_2543, que adicionaria mais uma unidade de glicose à cadeia, gerando P-Glc_Glc_Man_GlcAc_Glc. Novamente outra glicosiltransferase II, codificada pela ORF GDI_2544, adicionaria outra molécula de glicose à cadeia gerando P-Glc_Glc_Man_GlcAc_Glc_Glc. E, finalmente, uma quinta glicosiltransferase II, codificada pela ORF GDI_2536, transferiria um resíduo de glicose para a cadeia polissacarídica, originando P-Glc_Glc_Man_GlcAc_Glc_Glc_Glc. As enzimas codificadas pelas ORFs GDI_2535 (*gumB*), GDI_2538 (*gumE*), GDI_2549 (*gumJ*) e GDI_2552 (GDI 2549) possivelmente estão envolvidas na polimerização e na exportação do polissacarídeo pela membrana plasmática bacteriana (Fig. 2)

Conclusões

Com base nas análises de bioinformática do genoma de *G. diazotrophicus* (estirpe PAL5), sugere-se que o EPS produzido por essa bactéria é composto por repetições de β -1,4-D-glicose e uma cadeia lateral formada por um heptassacarídeo. Esse heptassacarídeo provavelmente possui uma unidade de manose acetilada, uma unidade de ácido glucurônico e três unidades de D-glicose.

As análises *in silico* mostraram que existe pelo menos uma via de biossíntese de EPS em *G. diazotrophicus*: a rota dos genes *gum*. Os

resultados obtidos sugerem que *G. diazotrophicus* produz uma nova molécula de EPS, que deve ser confirmada através da caracterização estrutural por ressonância magnética nuclear.

Referências Bibliográficas

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHAES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMAO, T.; MACEDO, J.; VALADAO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; DE SOUZA FILHO, G.; MARTIN QUINTANA FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; RAELE PEREIRA, A.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; VON KRUGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, p. 450, 2009.

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

COLQUHOUN, I. J.; DEFERNEZ, M.; MORRIS, V. J. Nmr-studies of acetan and the related bacterial polysaccharide, cr1/4, produced by a mutant strain of *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Research**, v. 269, n. 2, p. 319-331, 1995.

CUNNINGHAM, S. D.; MUNNS, D. N. Effects of rhizobial extracellular polysaccharide on ph and aluminum activity. **Soil Science Society of America Journal**, v. 48, n. 6, p. 1276-1280, 1984.

DEVEREUX, J.; HAEBERLI, P.; SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 387-395, 1984.

DOW, M.; NEWMAN, M. A.; VON ROEPENAK, E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 241-249, 2000.

GRIFFIN, A. M.; MORRIS, V. J.; GASSON, M. J. Genetic analysis of the acetan biosynthetic pathway in *Acetobacter xylinum*: nucleotide sequence analysis of the *aceB*, *aceC*, *aceD* and *aceE* genes. **DNA Sequencing**, v. 6, n. 5, p. 275-84, 1996a.

GRIFFIN, A. M.; MORRIS, V. J.; GASSON, M. J. Identification, cloning and sequencing the *aceA* gene involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 137, n. 1, p. 115-121, 1996b.

HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.

ISHIDA, T.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Novel glycosyltransferase genes involved in the acetan biosynthesis of *Acetobacter xylinum*.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 295, n. 2, p. 230-235, 2002.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, n. Dec, p. 275-282, 1975.

KATZEN, F.; FERREIRO, D. U.; ODDO, C. G.; IELMINI, M. V.; BECKER, A.; PUHLER, A.; IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p. 1607-1617, 1998.

KOPLIN, R.; ARNOLD, W.; HOTTE, B.; SIMON, R.; WANG, G.; PIIHLER, A. Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p.191-199, 1992.

KRAUSE, A.; RAMAKUMAR, A.; BARTELS, D.; BATTISTONI, F.; BEKEL, T.; BOCH, J.; BOHM, M.; FRIEDRICH, F.; HUREK, T.; KRAUSE, L.; LINKE, B.; MCHARDY, A. C.; SARKAR, A.; SCHNEIKER, S.; SYED, A. A.; THAUER, R.; VORHOLTER, F. J.; WEIDNER, S.; PUHLER, A.; REINHOLD-HUREK, B.; KAISER, O.; GOESMANN, A. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1385-91, 2006.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, p.105-132, 1982.

MORRIS, J.; GONZALEZ, J. E. The novel genes emmABC are associated with exopolysaccharide production, motility, stress adaptation, and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 5800-5900, 2009.

MUTHUKUMARASAMY, R.; KANG, U. G.; PARK, K. D.; JEON, W. T.; PARK, C. Y.; CHO, Y. S.; KWON, S. W.; SONG, J.; ROH, D. H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 981-991, 2007.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, p. 34-36, 1999.

OSA-AFIANA, L. O.; ALEXANDER, M. Differences among cowpea rhizobia in tolerance to high temperature and desiccation in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 435-439, 1982.

PEARSON, W. R.; LIPMAN, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 2444-2448, 1988.

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.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, v. 66, n. 9, p. 1794-1798, 2007.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif-mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.

SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, R. C.; FERRO, M. I.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas pathogens* with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-63, 2002.

SILVA, F. R.; VETTORE, A. L.; KEMPER, E. L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidious gum: The *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, n. 2, p. 165-171, 2001.

SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M. C.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVE, J. M.; BRIONES, M. R. S.; BUENO, M. R. P.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E. A.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C. R.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, V. C. A.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANCA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; GOMES, S.

L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C. C.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MADEIRA, H. M. F.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A. L.; MARTINS, E. M. F.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F. M.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; NETTO, L. E. S.; NHANI, A.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A. G.; PEREIRA, H. A.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; ROSA, A. J. D.; DE ROSA, V. E.; DE SA, R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; SILVA, A. C. R.; SILVA, A. M.; SILVA, F. R.; SILVA, W. A.; DA SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L. Z.; SIQUEIRA, W. J.; DE SOUZA, A. A.; DE SOUZA, A. P.; TERENCE, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAOKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J. C.; ORG, X. F. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, n. 6792, p. 151-157, 2000.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 386-392, 1998.



Agrobiologia

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

