



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LEANDRO PIO DE SOUSA

“Pseudomonas spp. associadas ao cafeeiro: genômica comparativa, especificidade de nicho e potencial biotecnológico”

“Pseudomonas spp. associated with coffee plants: comparative genomics, nichespecificity and biotechnological potential”

CAMPINAS
(2020)

LEANDRO PIO DE SOUSA

**“*Pseudomonas* spp. associadas ao cafeeiro: genômica comparativa,
especificidade de nicho e potencial biotecnológico”**

**“*Pseudomonas* spp. associated with coffee plants: comparative genomics,
nichespecificity and biotechnological potential”**

Dissertação/Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção de título de Doutor
em Genética e Biologia Molecular na área de
Microbiologia.

Dissertation/thesis presented to the Biology
Institute of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for the
degree of Doctor in the area of Genetic and
Molecular Biology

Orientador: Jorge Mauricio Costa Mondego

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE / DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO LEANDRO PIO DE
SOUSA E ORIENTADA PELO PROF. DR JORGE
MAURICIO COSTA MONDEGO

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So85p Sousa, Leandro Pio de, 1989-
Pseudomonas spp. associadas ao cafeeiro : especificidade de nicho e potencial biotecnológico / Leandro Pio de Sousa. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Jorge Mauricio Costa Mondego.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
Em regime interinstitucional com: Instituto Agronomico de Campinas; Instituto Biológico.

1. *Pseudomonas*. 2. Cafeeiro. 3. Genômica. I. Mondego, Jorge Mauricio Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Pseudomonas* spp. associated with coffee plants : comparative genomics, niche specificity and biotechnological potential

Palavras-chave em inglês:

Pseudomonas

Coffee plant

Genomics

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Jorge Mauricio Costa Mondego [Orientador]

Ricardo Harakava

Sara Adrian Lopez de Andrade

Suzete Aparecida Lanza Dêstefano

Marcelo Falsarella Carazzolle

Data de defesa: 12-08-2020

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3637-7665>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1721847043721676>

Campinas, 12 de agosto de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge Mauricio Costa Mondego

Prof. Dr. Ricardo Harakava

Prof. Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle

Prof(a). Dra. Sara Adrian Lopez de Andrade

Prof(a). Dra. Suzete Aparecida Lanza Déstefano

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa (Genética e Biologia Molecular) da Unidade (Instituto de Biologia).

Agradecimentos

O presente trabalho foi financiado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – (Capes) – Código de Financiamento: 001

This study was financed in part by the da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – (Capes) – Finance Code: 001

Também gostaria de agradecer a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio dado ao projeto (Número do processo: 2014/11544-4)

Resumo

Pseudomonas é um grupo bacteriano com capacidade de colonizar uma grande gama de ambientes. As do grupo fluorescente são conhecidas principalmente por serem benéficas aos vegetais, conferindo um ganho na produção e dando maior proteção contra possíveis patógenos. Durante as anotações do banco de ESTs de *Coffea arabica* detectou-se uma grande quantidade de sequências de *Pseudomonas* no banco. Através de isolamentos feitos nas folhas, rizosfera e das raízes de *Coffea arabica* constatou-se a presença destas bactérias e, posteriormente, foram selecionados três isolados distintos de cada ambiente mencionado; seus genomas foram sequenciados e em paralelo foram executados experimentos para verificar diferenças fisiológicas entre os isolados. Os genes identificados a partir do isolado de folha sugerem que ele está adaptado às tensões abióticas do ambiente da superfície foliar, o que confirmamos por experimentos de estresse osmótico e privação de ferro. O isolado a partir da região interna das raízes possui receptores sideróforos de acromobactina e aerobactina, mas não possui os genes responsáveis pela produção desses sideróforos, sugerindo uma interessante estratégia de competição baseada no furto de sideróforos de outras espécies. Todas as três bactérias foram capazes de aumentar o crescimento de plântulas de alface, principalmente o isolado de rizosfera. Curiosamente, o isolado de folha foi capaz de colonizar as folhas das plantas após a bacterização das sementes, sugerindo uma inespecificidade quanto ao hospedeiro. Além disso, os três isolados foram capazes de degradar compostos fenólicos, e em alguns casos utilizando-os como fonte metabólica. Entretanto, elas não foram capazes de utilizarem cafeína como fontes de nitrogênio e carbono. Em termos de análise de controle biológico, o isolado de folha foi capaz de diminuir o dano provocado pela ferrugem-do-café, podendo ser uma alternativa para o controle dessa praga. A partir dos nossos dados, discutimos a relação entre o conteúdo gênico e os dados experimentais indicando que existem adaptações dessas bactérias para viverem em associação com o cafeeiro em diferentes nichos.

Abstract

Pseudomonas is a bacterial group capable of colonizing a wide range of environments. The fluorescent group are known mainly for being beneficial to plants, providing a gain in production and providing great protection against possible pathogens. During the annotations of the EST bank of *Coffea arabica*, a large number of *Pseudomonas* sequences were detected in the bank. Through isolations made on the leaves, rhizosphere and roots of *Coffea arabica*, the presence of these bacteria was found and, subsequently, three distinct isolates from each mentioned environment were selected; their genomes were sequenced and in parallel experiments were performed to verify physiological differences between the isolates. The genes identified from the leaf isolate suggest that it is adapted to the abiotic stresses of the leaf surface environment, which is confirmed by experiments on osmotic stress and iron deprivation. The isolate from the inner region of the roots has siderophores of acromobactin and aerobactin receptors, but does not have the genes responsible for the production of these siderophores, suggesting an interesting competition strategy based on the theft of siderophores of other species. All three bacteria were able to increase the growth of lettuce seedlings, mainly the rhizosphere isolate. Interestingly, the leaf isolate was able to colonize the leaves of the plants after bacterization of the seeds, suggesting a non-specificity regarding the host. In addition, the three isolates were able to degrade phenolic compounds, and in some cases using them as a metabolic source. However, they were unable to use caffeine as sources of nitrogen and carbon. In terms of biological control analysis, the leaf isolate was able to reduce the damage caused by coffee rust, and could be an alternative for the control of this pathogen. From our data, we discussed the relationship between gene content and experimental data indicating that there are adaptations of these bacteria to live in association with coffee in different niches.

Sumário

1. Introdução	10
1.1 O cafeeiro	10
1.2 <i>Pseudomonas</i> spp.	11
1.3 Genômica comparativa de <i>Pseudomonas</i>	11
2. Justificativa	14
3. Objetivos	15
4. Material e métodos	16
4.1 Isolamento e identificação dos isolados	16
4.2 Cultivo de <i>Pseudomonas</i> e extração de DNA	16
4.3 Sequenciamento e anotação	17
4.3.1 Construção de biblioteca e sequenciamento	17
4.3.2 Montagem dos genomas	17
4.3.3 Anotação dos genomas	17
4.3.4 Análise genômica comparativa <i>in silico</i>	18
4.4 Testes Fisiológicos nas bactérias	18
4.4.1 Ensaios de produção de sideróforos e de IAA e limitação de crescimento em concentrações baixas de ferro	18
4.4.2 Produção de EPS em ambiente estressante	19
4.4.3 Verificação de taxia, potencial de degradação e resistência para cafeína	19
4.4.4 Ensaios de degradação de fenóis	20
4.5 Detecção de colonização e promoção do crescimento vegetal	21
4.6 Antagonismo e indução de resistência entre MN1F e ferrugem-do-café	22
5. Resultados	23
5.1 Isolamentos	23
5.2 Anotação geral do genoma	23
5.3 Aquisição de ferro	25
5.4 - Resistência a estresses ambientais	27
5.5 Sistemas de secreção	28
5.6 Antibióticos, bacteriocinas e defesa contra microorganismos concorrentes	30
5.7 Degradação de fitoquímicos	30
5.8 Taxia e resistência a cafeína	33

5.9 Transferência horizontal de genes.....	34
5.10 Ácido Indoleacético (IAA) e promoção do crescimento das plantas.....	36
5.11 Antagonismo e indução de resistência entre MN1F e ferrugem-do-café.....	38
6. Discussão.....	41
7. Conclusão.....	45
8. Referências.....	46
9. Apêndices.....	57
10. Anexos.....	96

1. Introdução

1.1 O cafeeiro

O café é uma das bebidas com maior consumo no mundo, sendo uma das mais valorizadas commodities do mercado (FAO, 2018). A cadeia produtiva da cafeicultura tem enorme impacto sócio-econômico movimentando cerca de 90 bilhões de dólares por ano e envolvendo por volta de 500 milhões de pessoas no mundo, entre produtores, trabalhadores rurais, comerciantes e beneficiadores do café (DaMatta e Ramalho, 2006). No Brasil, a cultura do café tem importância histórica, cultivando-o desde o século XVIII. Atualmente, o país ocupa um lugar de destaque no mercado, sendo o maior produtor com 51 milhões de sacas produzidas, gerando quase US\$ 5,5 bilhões em exportações (ABIC, 2016). Os maiores produtores do país são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná (ABIC, 2016).

O cafeeiro é uma planta pertencente à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea* cujo centro de origem se localiza no leste africano, provavelmente na Etiópia (Lashermes *et al.*, 1999). Apesar de serem descritas mais de 100 espécies desse gênero, somente *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são efetivamente cultivadas e comercializadas. *C. arabica* (Arábica) é uma planta alotetraplóide autógama, fruto de um cruzamento recente entre *C. canephora*, ou espécies aparentadas, e *C. eugenioides* (Tra *et al.*, 2016). Tal autogamia leva a uma base genética estreita, agravada pelo fato de que grande parte dos cafés plantados hoje em dia tem como populações base somente duas variedades, Typica e Bourbon (Mondego *et al.*, 2011). De clima subtropical, Arábica é suscetível a várias doenças como a ferrugem-do-café (causado pelo fungo *Hemileia vastatrix*), mancha do olho pardo (causada pelo fungo *Cercospora coffeicola*), mancha de Phoma (causado por *Phoma* spp.) e também é atacada pelo inseto lepidóptero minador conhecido como “bicho-mineiro” (*Leucoptera coffeella*).

Por outro lado, seus grãos dão origem a uma bebida de melhor qualidade comparada com a advinda de *C. canephora* sendo muito valorizada no mercado externo. O fato do café Arábica possuir baixa resistência a patógenos (quando

comparado com *C. canephora*), provavelmente pela sua baixa diversidade genética, e sua melhor qualidade de bebida, gera demanda para a busca de soluções quanto ao combate de organismos agressores e no aprimoramento de outras características agrônomicas como o vigor de crescimento (Fazuoli *et al.*, 2008).

1.2 *Pseudomonas* spp.

O gênero bacteriano *Pseudomonas* compreende um conjunto bastante diverso de microrganismos que podem ser isolados de diversos ambientes, tais como água doce e salgada, solo, interior das plantas, alimentos e outros (Clarke, 1982). Pertencentes à classe das *Gammaproteobacteria*, as *Pseudomonas* compreendem pouco mais de 200 espécies diferentes descritas até a presente data. Dentro deste grupo destacamos as *Pseudomonas* do grupo fluorescente, espécies conhecidas tanto por sua fluorescência (devido a produção do pigmento verde fluorescente pioverdina) quanto pela capacidade de colonizar uma grande variedade de ambientes; além disso, possuem a habilidade de degradar vasto espectro de produtos químicos, incluindo compostos naturais e artificiais (Nelson *et al.*, 2002). Em relação ao ambiente vegetal, normalmente *Pseudomonas* habitam o solo e a rizosfera (Patten e Glick 2002), porém também são encontradas nos tecidos internos das plantas bem como na superfície foliar (Vega *et al.*, 2005). Podem ser patógenos agressivos como *P. syringae* como também benéficas para a saúde do hospedeiro vegetal (Patten e Glick, 2002). Tais benefícios podem ser explicados pela produção de auxinas e sideróforos que melhoram o desenvolvimento vegetal, diretamente conferindo um ganho significativo na produção ou conferindo uma proteção maior contra possíveis patógenos (Patten e Glick, 2002). Desse modo, as *Pseudomonas* fluorescentes são um dos grupos preferidos para o desenvolvimento de biofertilizantes para a agricultura (Patten e Glick, 2002).

1.3 Genômica comparativa de *Pseudomonas*

Como mencionado anteriormente, *Pseudomonas* é um grupo fisiologicamente bastante diverso, e por consequência seus genomas são alvos principalmente em investigações quanto sua habilidade de lidar com xenobióticos, de colonizar plantas

e promover crescimento nas mesmas, seja via produção de hormônios vegetais, seja na supressão de patógenos (Rodriguez e Pfender 1997, Naseby *et al.*, 2001, Haas e Defago 2005). Dada a importância destas bactérias e seu papel na saúde das plantas, ao longo dos anos várias cepas, principalmente de *Pseudomonas fluorescens*, tiveram seus genomas e transcriptomas revelados (Paulsen *et al.*, 2005; Loper *et al.*, 2007., Silby *et al.*, 2009). Os sequenciamentos revelaram vários genes preferencialmente expressos quando em contato com a planta, genes estes responsáveis pelo aporte de nutrientes, produção de hormônios e controle de patógenos, além dos responsáveis pelo processo de colonização da raiz (Vethagen, 2006). Em relação a *P. fluorescens* a diversidade dessa espécie ainda não tinha sido verificada até que Silby *et al* (2009) montaram e compararam os genomas de três cepas isoladas do solo e da superfície foliar (*P. fluorescens* Pfo-1, SBW25 e Pf-5). O trabalho mostrou que as amostras compartilhavam apenas 61,4% dos genes e uma grande quantidade de genes cepa-específicos. Para fins de comparação, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (PsG), um conhecido patógeno de plantas, tem por volta de 90% do genoma conservado (Qi *et al.*, 2011). Discute-se que provavelmente a habilidade maior de adaptar-se a diversos ambientes colabora para um genoma mais aberto (ou seja, uma genoma com maior capacidade para receber e doar material genético) em *P. fluorescens* do que em PsG, ou seja, *P. fluorescens* teria como característica do seu genoma a maior facilidade em incorporar e/ou perder elementos genéticos em comparação com PsG. Interessante notar que em PsG a diversidade intraespecífica, reside em genes provindos de transferência horizontal, principalmente genes de virulência. Então, neste caso, a mudança na composição genética destes genomas de PsG teria como principal força motriz a aquisição de novos genes via plasmídeos. PsG e *P. fluorescens* mesmo pertencendo ao mesmo gênero teriam estratégias evolutivas completamente diferentes onde *P. fluorescens* "buscaria" uma maior plasticidade adaptativa refletida no seu genoma altamente diverso e aberto, enquanto PsG teria um genoma mais fechado e padrão, arriscando a aquisição de genes plasmidiais importantes num determinado nicho. (Qi *et al.*, 2011).

No caso de *Pseudomonas putida*, Wu *et al.* (2011) realizaram uma análise comparativa entre os genomas de quatro isolados provindos de ambientes como riacho contaminado (F-1; Choi *et al.*, 2003), água doce não contaminada (GB-1;

Okazaki *et al.*, 1997), rizosfera (KT2440; Nakazawa 2002) e interior do tecido radicular (W619; Taghavi *et al.*, 2009). Wu *et al.* (2011) mostraram uma clara adaptação ao meio em que os isolados foram obtidos. As bactérias isoladas de ambientes contaminados possuíam ilhas gênicas especializadas no processamento dos xenobióticos e na minimização dos seus danos colaterais. Nos isolados de plantas, foram encontrados inúmeros genes responsáveis por motilidade, aderência a superfícies, além de produção de hormônios vegetais como auxinas e ácido salicílico, passando por compostos antifúngicos como os sideróforo tioquinolobactin. Neste caso, vemos uma especialização dos genomas para que o microrganismo possa estabelecer um relacionamento positivo com o hospedeiro vegetal. É justamente este bom relacionamento com a planta que pode ser aproveitado na agricultura prevendo um ganho de produção na lavoura quando a semente é inoculada com esse microrganismo.

2. Justificativa

Durante a anotação do banco de dados de ESTs de café para o projeto genoma do cafeeiro (Brazilian Coffee Genome Project; BCGP) verificou-se que *C. arabica* continha grande quantidade de sequências de *Pseudomonas* ‘contaminantes’ (dados não publicados), quantidades essas muito maiores em comparação com outras bactérias também detectadas, principalmente na folha (Mondego *et al.*, 2011). Anteriormente, em outros trabalhos, também se tinha verificado a grande quantidade destas bactérias, isoladas desde rizosfera passando pelo ambiente interior dos tecidos vegetais, até na superfície foliar do próprio cafeeiro (Vega *et al.*, 2005). Uma vez que o gênero bacteriano, que é conhecido promotor de crescimento em plantas, parecia abundar em toda a planta, sendo inclusive o gênero largamente dominante particularmente na folha, buscamos verificar a autenticidade dos dados por intermédio primeiro de isolamento direto na rizosfera, endosfera e filosfera.

3. Objetivos

Comparar o genoma de três *Pseudomonas spp.* isoladas em três ambientes distintos do cafeeiro buscando entender as preferências de habitat, correlacionando estas informações com os dados fisiológicos dos isolados. Também buscamos verificar se estes organismos promoveriam crescimento em plantas e se seriam bons agentes de biocontrole da ferrugem-do-café.

4. Material e métodos

4.1 Isolamento e identificação dos isolados

Com o auxílio do grupo da Dra. Sueli Freitas do IAC, realizou-se o isolamento de bactérias da rizosfera, raiz e superfície foliar mediante a seguinte metodologia: solo rizosférico, raiz e folhas de mudas com cerca de 30 cm de altura de *C. arabica* (cv. Catuaí Amarelo IAC 62) foram coletadas na Fazenda Santa Elisa, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, Campinas, Brasil, 22°53 'S / 47°5' W, 664 m, solo Latossolo Vermelho distrófico típico). A rizosfera e as folhas foram embebidas em tampão $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mM e agitadas (3000 rpm) durante 15 minutos. A raiz foi devidamente limpa com hipoclorito de sódio (0,1%) por dois minutos, lavada com água esterilizada e maceradas no mesmo tampão mencionado antes. O lavado e o macerado resultante foram usados para a série de diluição em placas de Petri contendo Meio B de King (King *et al.*, 1954). As placas foram então incubadas a 28°C e o crescimento de colônias individuais fluorescentes características de *Pseudomonas* foi monitorado em até 48 horas após o plaqueamento. Foi escolhido um isolado para cada parte da planta: um para o solo rizosférico, um para raiz e um para superfície foliar. Os três isolados escolhidos foram identificados de fato como *Pseudomonas* via amplificação e sequenciamento de uma região intergênica (ITS) usando-se os primers *fPs* e *rPs* de acordo como descrito por Locatelli *et al.*, 2002.

4.2 Cultivo de *Pseudomonas* e extração de DNA

Das cepas previamente isoladas, escolheu-se uma de rizosfera (nomeado MNR3A), uma de raiz (nomeada EMN2) e uma superfície foliar (MN1F). Estas foram plaqueadas em meio B de King sólido a 30° C overnight para a coleta de uma única colônia. A colônia escolhida foi colocada no mesmo meio B de King agora líquido a 30° C overnight 120 rpm. Uma parte do crescido serviu para formar cultura permanente em glicerol 50% e outra para extração de DNA. Neste caso centrifugou-se o meio à 12000g por 3 minutos para se obter um sedimento que seguiu para a extração de DNA com reagente Trizol® (Life Technologies Corporation) conforme as especificações do fabricante. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de

agarose 1,5% TAE 1X para verificar sua integridade. A concentração das amostras de DNA foi medida utilizando-se o Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) e reservada para posterior sequenciamento.

4.3 Sequenciamento e anotação

4.3.1 Construção de biblioteca e sequenciamento

Os genomas de MNR3A, EMN2 e MN1F foram sequenciados usando a plataforma MiSeq (Illumina) alocado no Centro de Ciências Genômicas da Universidade da Carolina do Norte (University of North Carolina High Throughput Sequencing Facility), sob colaboração e supervisão do Dr. Piotr Mieczowski. A partir dos DNAs fragmentados em 300 pb, foram produzidas bibliotecas paired-end (PE) para determinar a orientação e posição relativa dos contigs produzidos pelo sequenciamento. As bibliotecas foram produzidas usando os kits TruSeq sample preparation (Illumina).

4.3.2 Montagem dos genomas

A montagem dos reads foi realizada com o montador Velvet (Zerbino e Bimney, 2008) com o auxílio do Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle (LGE, UNICAMP). Os números de acesso para o NCBI dos genomas são PRJNA573636 (EMN2), PRJNA573634 (MN1F) e PRJNA573640 (MNR3A).

4.3.3 Anotação dos genomas

A anotação dos genes foi executada através do anotador RAST version 2.0 (<https://rast.nmpdr.org>). Rotas metabólicas foram preditas através de buscas no banco de dados KEGG (Ogata *et al.*, 1999). RNAs ribossomais foram preditos verificando similaridade com o banco de dados usando o BLAST. RNAs transportadores foram preditos pelo software tRNAscan-SE version 2.0 (Lowe e

Eddy, 1997). A filogenômica foi realizada através do programa Type Strain Genome Server - TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) que realiza digitalmente uma hibridização DNA-DNA e calcula/compara os conteúdos G+C entre o genoma estudado e os depositados no NCBI. As sequências de inserção (ISs) foram identificados usando IS-Finder (<https://www-is.biotoul.fr/>) de acordo com Siguier *et al.* (2006). A análise de transferência horizontal de genes (HGT; verificamos se ocorriam sequências ou pedaços de sequências de plantas nos genomas bacterianos) foi realizada de acordo com Levy *et al.*, 2018. Os *reads* provindos do sequenciamento foram traduzidos em proteínas usando o programa CLC Sequence Viewer 6. O conjunto de seqüências foi analisado usando o software PHYLO-GLM version 1.03 para eliminar seqüências que pudessem ser explicadas por ancestralidade compartilhada. Proteínas com mais de 40 aminoácidos foram alinhados com o banco de dados de referência usando o HMMsearch version 2.41.1. Resultados que compartilharam mais de 40% de identidade com proteínas vegetais foram aceitos como similares e possivelmente de origem comum.

4.3.4 Análise genômica comparativa *in silico*

Os genomas foram comparados dois a dois usando análises de TBLASTX presentes nas ferramentas de comparação de genomas ARTEMIS 18.1.0 (Carver *et al.*, 2005) e mGenome Subtractor (<https://tool-mml.sjtu.edu.cn/mGS2/>) (Shao *et al.*, 2010). Os genes compartilhados e únicos foram representados num diagrama de Venn.

4.4 Testes Fisiológicos nas *Pseudomonas*

4.4.1 Ensaios de produção de sideróforos e de IAA e limitação de crescimento em concentrações baixas de ferro

A produção de sideróforos foi verificada cultivando os isolados de *Pseudomonas* no meio sólido sólido CAS-blue agar segundo o procedimento descrito por Schwyn e Neilands (2001). A formação de um halo alaranjado ao redor

das colônias, o qual foi medido, denotou a produção de sideróforos. Para a avaliação da produção de IAA, os isolados foram cultivados em meio de cultura TSB 10% contendo L-triptofano (5 mM) e incubadas no escuro, a 30°C, por 24 horas. Seguiu-se então a quantificação por espectrofotometria mediante o uso do reagente de Salkoviski (Torres-Rubio *et al.*, 2010) tendo IAA comercial como padrão e as bactérias *Escherichia coli* DH5α e *Bacillus megaterium* BP4 (Sousa e Silva 2012) como controles negativo e positivo, respectivamente. Para o ensaio de limitação de ferro, os isolados foram cultivados em meio líquido mínimo (2,3 g de KH₂PO₄, 2,9 g de Na₂HPO₄.2H₂O, 1,0 g de NH₄Cl, 0,5 g de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g de NaHCO₃, 0,01 g de CaCl₂.2H₂O) suplementado com 10 mg de FeCl₂ por litro de meio mais 500 mg de EDTA. A cada 5 h, uma alíquota de 10 µl foi retirada do meio e plaqueada em meio sólido idêntico ao meio líquido usado anteriormente. O crescimento foi medido pela contagem de colônias nas placas (unidade formadora de colônias; UFC).

4.4.2 Produção de EPS em ambiente estressante

Os isolados de *Pseudomonas* foram cultivados (30°C overnight a 200 rpm) em meio LB líquido suplementados com diferentes concentrações de PEG 6000 (6.25, 12.5, 18.75 e 25 g de polietilenoglicol 6000 para um litro de água) visando simular diferentes níveis de estresse hídrico. Após centrifugação, o EPS foi extraído do sedimento bacteriano segundo Roberson & Firestone (1992) através de tratamento termoácido e posterior filtragem em filtro de fibra de vidro 0.45µm. Obteve-se a concentração via espectrofotometria através da análise de absorbância a 485nm num aparelho IL-592-LC .

4.4.3 Verificação de taxia, potencial de degradação e resistência para cafeína

Para examinar a quimiotaxia para cafeína, as *Pseudomonas* e um controle negativo que não exhibe quimiotaxia para a cafeína (*E. coli* DH5α) foram cultivadas em meio LB por 3 h. O meio de cultura foi vertido em placas de Petri esterilizadas e 3 mg de cafeína (cafeína em pó, ReagentPlus®, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foram colocados no centro da placa. Após 12 h, as placas foram analisadas quanto à

presença de um halo de crescimento ao redor da cafeína, mostrando quimiotaxia positiva. O controle negativo não forma halo.

Para o teste de tolerância à cafeína, os isolados foram cultivados em meio líquido mínimo (2,3 g de KH_2PO_4 , 2,9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de NH_4Cl , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de NaHCO_3 , 0,01 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de FeCl_2) suplementados com diferentes concentrações de cafeína (0,8 2, 3, 6, 10, 15 g / mL). Após 8 h de crescimento, uma alíquota de 10 μL foi retirada do meio líquido e espalhado no meio sólido idêntico ao meio líquido mas suplementado com ágar. O crescimento foi medido pela contagem de colônias nas placas (UFCs).

Para o experimento de degradação de cafeína, o meio mínimo foi preparado usando-se os seguintes ingredientes (g/L): KH_2PO_4 , 3; Na_2HPO_4 , 6; NaCl , 5; MgSO_4 0,1.; 10 mg FeCl_2 . O pH do meio foi ajustado para 7. Primeiramente foi verificado o possível uso da cafeína como fonte de carbono, preparando quatro meios com quatro concentrações diferentes de glicose (8; 4; 2; 0 g/L) e uma concentração fixa de cafeína (2 g L⁻¹) e NH_4Cl (2 g/L). A objetivo foi tornar a principal fonte de carbono (glicose) menos disponível a fim de forçar o possível uso da cafeína como fonte de carbono. O mesmo procedimento foi realizado com nitrogênio, que neste caso utilizamos uma concentração fixa de glicose (8g/L) e uma concentração variável de NH_4Cl (2; 1,5; 1; 0 g/L). A concentração de cafeína sempre foi fixa. A temperatura para a condição de cultura foi mantida a 30°C. A OD₆₀₀ foi medido após 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70h de crescimento.

4.4.4 Ensaios de degradação de fenóis

Foram realizados testes de degradação de fitoquímicos aromáticos que são comumente encontrados no cafeeiro, como benzoato, quinato e cinamato (Farah and Donangelo 2006; Santos *et al.*, 2011; Stashenko *et al.*, 2013). A primeira rodada de crescimento foi realizada em meio sólido com a seguinte composição: K_2HPO_4 0,2 g / L; NaCl 1 g / L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,15 / L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g / L; KCl , 0,5 g / L; cisteína-HCl, 0,5 g / L; extrato de levedura, 0,5 g / L; 5 mM de cinamato ou benzoato ou salicilato ou quinato como fonte primária de carbono e ágar. Uma segunda rodada de cultivo, agora em meio líquido, foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente com 5 mM de cinamato ou benzoato ou salicilato ou quinato, que seriam degradados à medida que a concentração de acetato (marcador que

indicaria o consumo dos compostos e incorporação no ciclo do citrato) aumentasse. Os fitocompostos foram medidos com a coluna analítica de HPLC (Agilent) Waters μ Bondapak C18 (3,9 $\times$ 300 mm, 10 μ m) e detectados em um analisador de massa Triplo Quádruplo API-5000. O ESI (-) - MS foi realizado em tensões ajustadas de - 4000V e 70V, conforme descrito por Defnoun *et al.* (2003).

4.5 Detecção de colonização e promoção do crescimento vegetal

Uma vez que sementes do cafeeiro podem demorar até 60 dias para germinar, resolveu-se realizar os experimentos de inoculação vegetal utilizando-se sementes de alface. Os inoculantes bacterianos foram preparados colhendo células de uma cultura de 12 h no meio líquido B de King. As células foram suspensas em solução estilizada de NaCl a 0,85% até uma densidade óptica de 1,4 a 590 nm para ajuste de concentração de células (em torno de 10^6 células por mL). Uma alíquota deste crescimento inicial foi colocado em meio sólido LB para verificar a quantidade de células viáveis através da medição de UFCs. Cada semente de alface foi embebida por 5 minutos no inoculante bacteriano e depois semeada em vasos preenchidos com substrato comercial esterilizado via autoclave (Biomix, São Paulo, Brasil). O experimento foi mantido em estufa selada Dark Box Grow Indoor® a 27 ° C por 12 h/12h de fotoperíodo. Foram avaliados dez tratamentos, 20 sementes por tratamento: MN1F, EMN2, MNR3A, MN1F + EMN2, MN1F + MNR3A, EMN2 + MNR3A, todos os isolados inoculados juntos, controle negativo com tampão, controle negativo com *E. coli* DH5- α e controle positivo com *Bacillus megaterium* BP4 (Sousa e Silva, 2012). Após 5 dias da inoculação, 10 plantas foram colhidas para análise de Unidades formadoras de Colônias (CFU). Ao final de 20 dias, as 10 plantas restantes também foram coletadas para medições de peso seco, análises de UFC e detecção das bactérias por PCR. As plantas colhidas foram separadas em três partes: rizosfera, raiz e superfície foliar. A rizosfera e a superfície da folha foram lavadas com tampão (0,8% NaCl) por 1 minuto. A raiz foi limpa com hipoclorito de sódio (0,1%) por dois minutos, lavada com água esterilizada e macerada na mesma solução tampão. Nos três casos, o produto final foi colocado em meio LB e incubado a 30 ° C por 24 horas para crescimento bacteriano e inferência de células viáveis

através das UFCs. Todos os testes foram feitos em triplicata e o teste estatístico usando foi t de Student.

Para detecção das bactérias in *planta* através de PCR, o DNA foi extraído do solo rizosférico, das raízes e da superfície foliar através do kit PowerSoil® DNA Extraction da MoBio (Carlsbad, CA, EUA). A detecção foi realizada usando *primers* de ITS específicos de *Pseudomonas fPs* e *rPs* (Locatelli *et al.*, 2002). As *Pseudomonas* inoculadas foram consideradas detectadas se após 30 ciclos no termociclador as bandas de PCR aparecerem no gel de agarose. As bandas surgidas foram coletadas e purificadas. Os amplicons foram clonados e sequenciados para determinar se eles correspondiam à sequência ITS das bactérias inoculadas.

4.6 Antagonismo e indução de resistência entre MN1F e ferrugem-do-café

O experimento de antagonismo a *Hemileia vastatrix* foi executado em parceria com a pesquisadora Flávia Patrício do Instituto Biológico (IB, Campinas), especialista no fungo patogênico. Plantas de *C. arabica* IAC 62 (Catuaí Amarelo) de 6 meses de idade foram levadas ao IB. Foram realizados seis tratamentos: plantas infectadas (controle positivo), plantas aspergidas com BION (indutor de defesa vegetal análogo ao ácido salicílico; 0.01g/L) dois dias antes da infecção, plantas aspergidas com fungicida Piori (fungicida sistêmico azoxostrobina; 50% v/v) minutos antes da infecção, plantas aspergidas com MN1F dois dias antes da infecção ('Indução'), plantas aspergidas com MN1F minutos antes da infecção ('antagonismo') e plantas que foram aspergidas dois dias antes e minutos antes da infecção com MN1F ('indução + antagonismo'). A concentração de ureidósporos de *H. vastatrix* inoculados por aspersão de alta pressão foi de 0.02 g/L. Cada tratamento continha 16 plantas sendo avaliados os três primeiros pares de folhas a cada avaliação. Foram avaliados três tempos pós o aparecimento dos primeiros sintomas (dias 40, 47 e 54). A incidência (dada em %) foi calculada contando-se o número de folhas com lesão dividido pelo número de folhas totais vezes 100.

5. Resultados

5.1 Isolamentos

Foram isoladas 15 bactérias de folhas, raiz e rizosfera. O sequenciamento do ITS revelou que todos os isolados pertenciam ao gênero *Pseudomonas*, sendo que os três escolhidos tinham cerca de 97% de similaridade com *Pseudomonas putida*.

5.2 Anotação geral do genoma

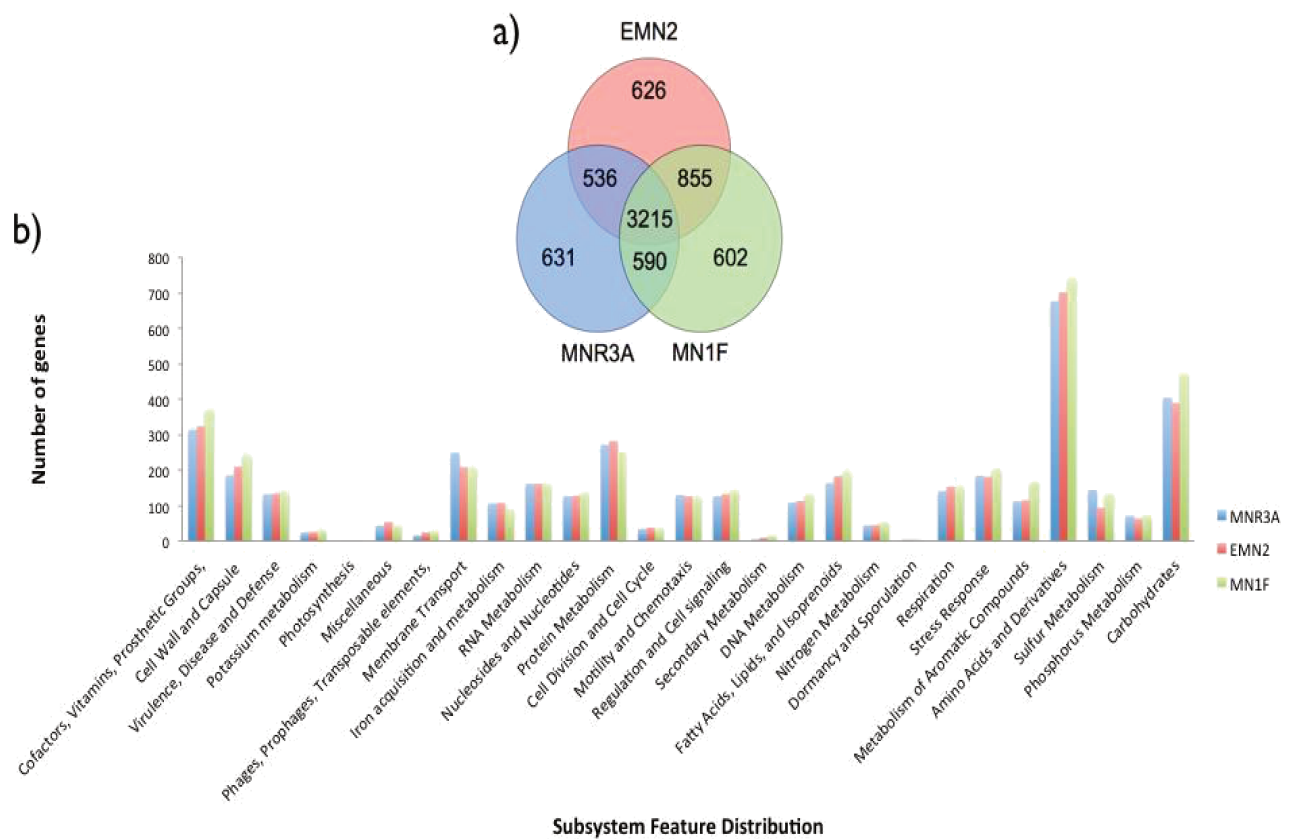
Os dados globais acerca dos genomas são dadas pela Tabela 1. Segundo a análise do TYGS, todos os isolados pertencem ao gênero *Pseudomonas*, mas, ao contrário do que se viu no sequenciamento do ITS, são de espécies desconhecidas (Material suplementar).

Tabela 1. Dados globais das montagens. Número de bases varia de 5,6 e 6 Mpb. Os conteúdos de GC são praticamente os mesmos, enquanto outros parâmetros mostram mais variações

Pseudomonas strain	MNR3A	EMN2	MN1F
Nº bases	5,592,054	5,830,201	6,075,282
Total Contigs	49	134	79
N ₅₀ scaffold length (kb)	182	63	125
CG content (%)	63,4	63,8	62,9
Nº coding sequences	4972	5232	5536
Nº tRNAs	57	49	48

Após a anotação das ORFs, foi feita uma análise comparativa entre os genomas, buscando similaridades e diferenças. O diagrama de Venn na Figura 1 mostra uma análise comparativa do conteúdo genético compartilhado ou não entre os três isolados.

Figura 1. a) Diagrama de Venn comparando o conteúdo gênico de cada *Pseudomonas*. A interseção no centro compreende genes compartilhados por todos eles (3215 genes). O restante compreende genes específicos de linhagens compartilhados ou não compartilhados por duas *Pseudomonas* b) Os gráficos de colunas indicam o número de genes divididos em categorias funcionais.



O diagrama (Fig. 1a) mostra que 3.215 genes são compartilhados pelos três isolados, correspondendo a aproximadamente 60% dos genes em cada isolado. Doze por cento dos genes são únicos para cada isolado (~ 610 genes) e os demais genes são compartilhados por dois dos três isolados. A anotação ontológica (distribuição das características do sub-sistema) dos genes foi analisada como histogramas (Fig. 1b), e mostrou perfis semelhantes entre as *Pseudomonas*,

diferindo principalmente no número de cópias de determinados genes.

Seqüências de inserção (ISs) foram detectadas pelo ISFinder em MN1F e EMN2 (valor E menor que e-100). Não foram encontrados ISs em MNR3A. A maioria dos ISs identificados eram providas de outras *Pseudomonas*. Por exemplo, verificou-se que MN1F tinha oito ISs, com ISPsy5 originárias de *Pseudomonas syringae* str. DC3000 contribuindo com 33 cópias e EMN2 continha 10 ISs sem cópias adicionais (tabela 2).

Tabela 2. Sequências de inserção de MN1F e EMN2. *Pseudomonas syringae* foi o principal doador de IS. Nenhum IS foi encontrado no genoma MNR3A

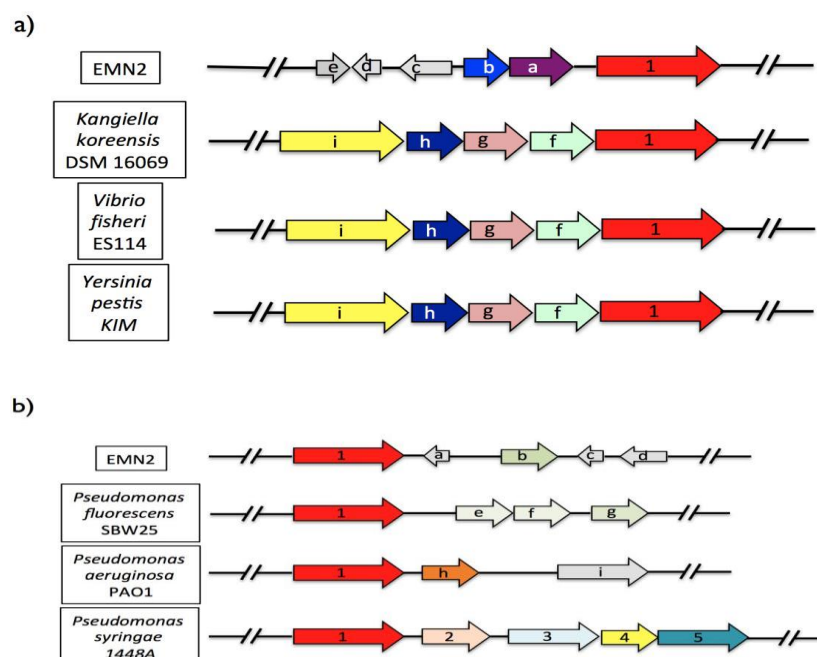
	Family	Name	Origin	Size (pb)	Copies
MN1F	IS66	ISPpu14	<i>P. putida</i> KT2440	2383	6
		ISPpu15	<i>P. putida</i> KT2440	2041	4
		ISPsy5	<i>P. syringae</i> str. DC3000	2059	33
	IS3	ISPen2	<i>P. entomophila</i> str. L48	1232	1
		ISPpu22	<i>P. putida</i> GB-1	1232	1
	IS30	ISpa37	<i>P. aeruginosa</i> strain S04 90	1454	1
	IS684	IS684	<i>P. syringae</i> strain B728a	2040	1
	IS256	ISPa27	<i>P. putida</i> W619	1361	1
EMN2	IS5	ISPpu21	<i>P. putida</i> S12	1190	1
		ISPst5	<i>P. stutzeri</i> strain Q	1191	1
		ISAch1	<i>Achromobacter</i> sp. BP3	1192	1
		ISPa16	<i>P. aeruginosa</i> plasmid rms149	1192	1
		ISThi1	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> HL-EbGr7	1191	1
		ISPpu18	<i>P. putida</i> transposon Tn1332	1192	1
		ISPre2	<i>P. resinovorans</i> NBRC	1190	1
		ISPsp1	<i>P. mandelli</i> JR-1	1188	1
		IS1384	<i>P. putida</i> plasmid pPGH-1	1178	1
		ISPst7	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17587	1192	1

5.3 Aquisição de ferro

A anotação do genoma indicou a presença de 31 genes responsáveis pela síntese de pioverdinas. A anotação também mostrou que os três isolados de *Pseudomonas* possuem aproximadamente o mesmo número de genes, variando de

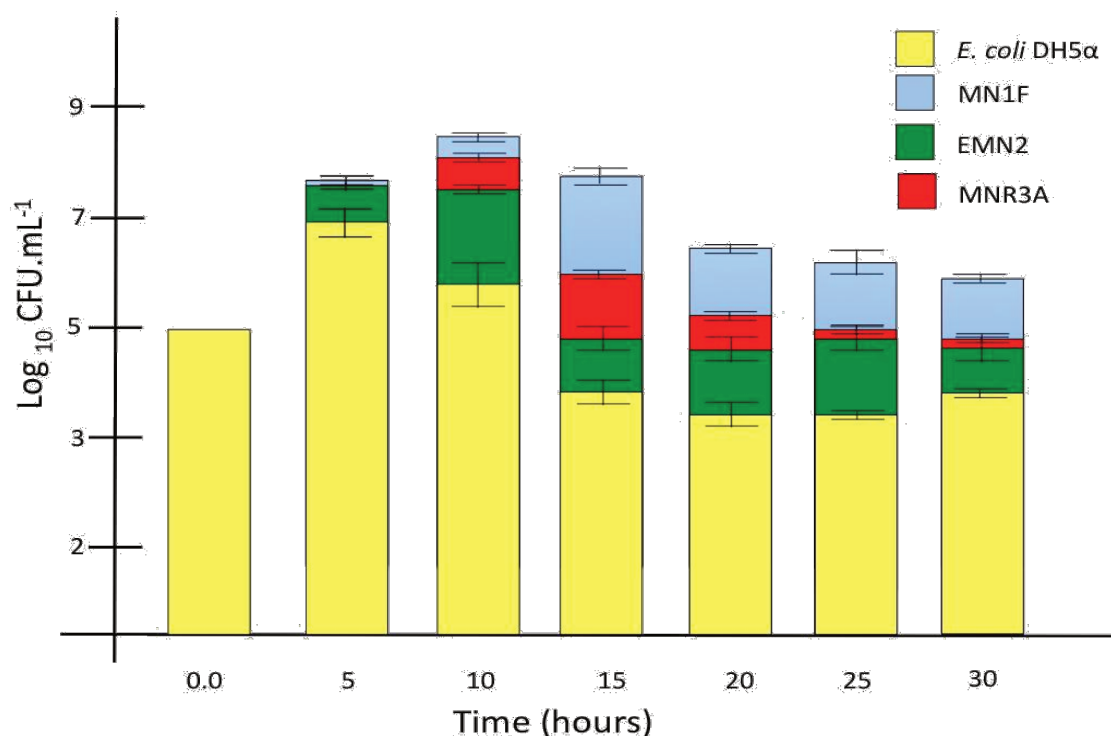
49 a 55, envolvidos na captação de ferro independente da pioverdina (alguns dos quais variam em número de cópias) e a produção de hemina, uma porfirina que acomoda íons de ferro em seu núcleo (Martins *et al.*, 2018). A anotação de genômica estrutural do RAST indicou que EMN2 possui dois genes que codificam receptores de sideróforos, mas não apresentam os genes de síntese dos sideróforos correspondentes; são eles *iutA* que codifica um receptor de aerobactina (2418 pb; 806 aminoácidos) (Fig. 3a) e *Psyr_2582* que codifica um receptor de acromobactina dependente de *TonB* (2412 pb; 804 aa (Figura 3b). Em geral, o operon da acromobactina contem os genes *AcsF*, *AcsD*, e *AcsE* responsáveis pela biossíntese da acromobactina, o que não foi detectado em EMN2. Uma situação semelhante foi observada com o operon aerobactina, cujos genes de biossíntese (*iucA*, *iucB*, *iucC* e *iucD*) estavam ausentes no EMN2 (Fig. 3a). O gene *iutR* que codifica o repressor de *iutA* também estava ausente, sugerindo que o receptor de aerobactina possa ser constantemente expresso (Fig. 3b).

Figure 3. Comparação dos cluster gênicos para a biossíntese de a) aerobactina e b) acromobactina. Para aerobactina (1) *iutA* (a) Iron siderophore sensor protein (b) RNA polymerase sigma 70 factor (c) lipoprotein (d) acetyltransferase (e) hypotetical protein (f) *lucD* (g) *lucC* (h) *lucB* (i) *lucA* . Para acromobactina (1) TonB-dependent ferric achromobactin receptor protein *Psyr_2585* (2) *AcsF* 3) *AcsD* (4) *AcsE* (5) Permease (a) HPA2 (b) *UbiH* (c) *MerR* (d) Flovohemoprotein (e) *FecB* (f) *FecC* (g) *FecD* (h) Putative iron-regulated membrane protein (i) Carboxylic ester hydrolase



O teste de produção de sideróforos mostrou que M1NF produziu maior quantidade dessas moléculas, evidenciado pelo halo de $3,5 \pm 0,2$ mm, enquanto EMN2 produziu um halo $3 \pm 0,1$ mm e MNR3A $2,1 \pm 0,5$ mm. O ensaio de limitação de ferro (Fig. 4) mostrou que MN1F (barra azul) foi capaz de crescer mais em meio ferro-limitante em comparação com as outras *Pseudomonas*. EMN2 e MNR3A mostraram crescimentos parecidos dentro da margem de erro. Mesmo assim, as três bactérias mostraram crescimento maior em relação a *E. coli*.

Figura 4. Ensaio de crescimento bacteriano (mediante contagem de CFUs) em meio com restrição de ferro.



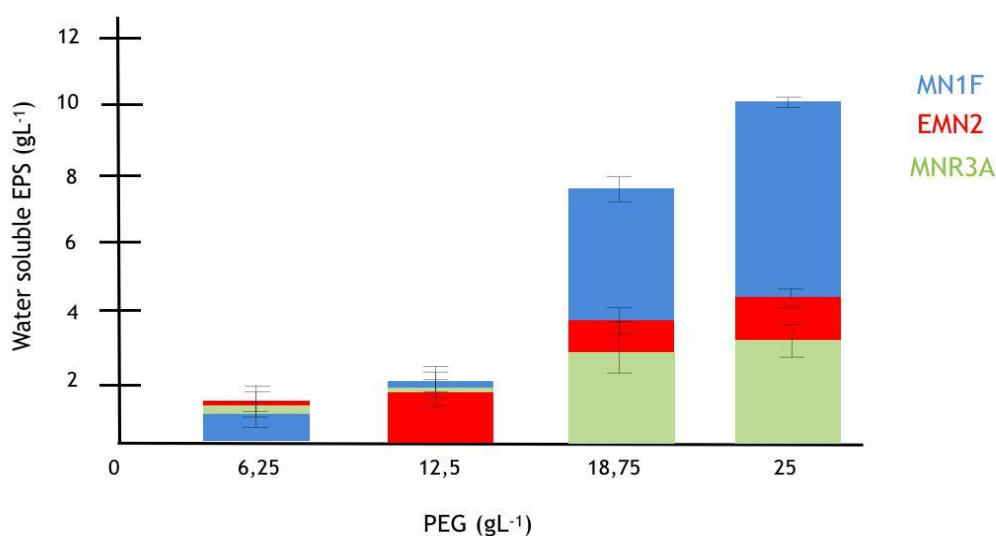
5.4 - Resistência a estresses ambientais

Foram identificados uma série de genes relacionados a mecanismos de resistência à estresses ambientais. Foram encontrados dois genes associados ao metabolismo do óxido nítrico, que são conservados nas três *Pseudomonas*: óxido nítrico dioxigenase (*NOD*) que catalisa a conversão do óxido nítrico em nitrato, e o regulador de transcrição da óxido nítrico redutase (*NorR*). Esses genes podem em certas situações desempenharem um papel para minimizar os danos de um ataque

oxidativo do hospedeiro contra o suposto invasor (D'Autréaux *et al.*, 2018; Helmick *et al.*, 2005). EMN2 contém um gene que codifica uma proteína da família Rhodanese que é responsável por proteger a célula contra danos induzidos por cianeto (Cipollone *et al.*, 2007). Além disso, os genes dos sistemas toxina-antitoxina (TA) *vapB / C* e *YoeB / M*, ambos relacionados a tolerância a estresses variados (Janssen *et al.*, 2015, Lopes *et al.*, 2014) foram encontrados apenas em MN1F.

Como exopolissacarídeos (EPS) estão envolvidos nos mecanismos que promovem tolerância à dessecação em bactérias e fungos (Schnider-Keel *et al.*, 2001) evitando a perda de água para o meio extracelular, medimos a produção de EPS com aumento da pressão osmótica via PEG. MN1F respondeu ao estresse induzido pela seca produzindo mais do dobro de EPS em comparação com as demais (Fig. 5; barras azuis, > 10 g / L em altas concentrações de PEG).

Figura 5. Produção de EPS (medida em g/L) mediante estresse osmótico induzido por PEG. Barras azuis para MN1F; barras vermelhas para EMN2; barras verdes para MNR3A



5.5 Sistemas de secreção

Os sistemas de secreção I e VI (T1SS e T6SS) foram identificados (Tabela 3). O T1SS está envolvido no transporte de íons, drogas e proteínas para o ambiente

extracelular, enquanto o T6SS é responsável pela produção e secreção de moléculas efetoras que podem atuar no hospedeiro e em outros microorganismos (Ho *et al.*, 2014). Foi encontrado o T1SS nas três *Pseudomonas*, constituídos por um cluster Lap (*LapB*, *C*, *D* e *E*) e proteína RXT, que desempenham papéis importantes na nodulação, produção de toxinas e atividade lipásica (Linhartová *et al.*, 2010). Além disso, foi encontrado o cluster T6SS completo em MNR3A e MN1F e o cluster incompleto em EMN2, uma vez que o gene *Hcp* estava ausente (Shrivastava *et al.*, 2008).

Tabela 3. Variação dentro de MN1F, EMN2 e MNR3A em termos de presença ou ausência de genes do sistema de secreção

Sistema	Genes	MN1F	EMN2	MNR3A
T1SS	<i>LapB, C, D, E</i>	X	X	X
	<i>LapP</i>		X	X
	<i>Agglutinin RTX</i>	X	X	X
T6SS	<i>ImpA, B, C, D, E, F</i>	X	X	X
	<i>VgrG</i>	X	X	X
	<i>ClpB</i>		X	X
	<i>IcmF</i>	X	X	X
	<i>Vas A</i>	X		X
	<i>VasB, C, D, E, F</i>	X	X	X
	<i>VasI</i>	X		
	<i>VCA0109</i>	X		
	<i>GacS</i>	X	X	X

5.6 Antibióticos, bacteriocinas e defesa contra microorganismos concorrentes

Foram pesquisados genes envolvidos na defesa bacteriana contra microorganismos, e identificamos o gene da beta-lactamase (BL) e três cópias do gene repressor *blaI* em MN1F. O gene *ArnT* e o operon da polimixina *PmrJ / PmrL / PmrM*, envolvidos na resistência ao antibiótico polimixina (Kleine *et al.*, 2008) também foram identificados em MN1F. Além disso, MN1F possui um agrupamento de genes relacionados à produção de colicina V, uma bacteriocina peptídica que mata células sensíveis destruindo a membrana plasmática (Cascales *et al.*, 2007). Por outro lado, em EMN2 e MNR3A, foram identificados genes de resistência a múltiplas drogas, *CmeA / B* e *MexC / D*, que codificam proteínas da bomba de efluxo responsáveis pela extrusão de agentes antimicrobianos das células bacterianas (Gotoh *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2002). Não foram identificados genes que codificam proteínas da bomba de efluxo em MN1F. Além disso, genes envolvidos na produção de peptídeos não ribossômicos (NRPS) e bacteriocinas foram identificados nos três isolados; duas bacteriocinas e duas NRPS em MN1F, seis bacteriocinas e sete NRPS em EMN2 e quatro bacteriocinas e seis NRPS em MNR3A.

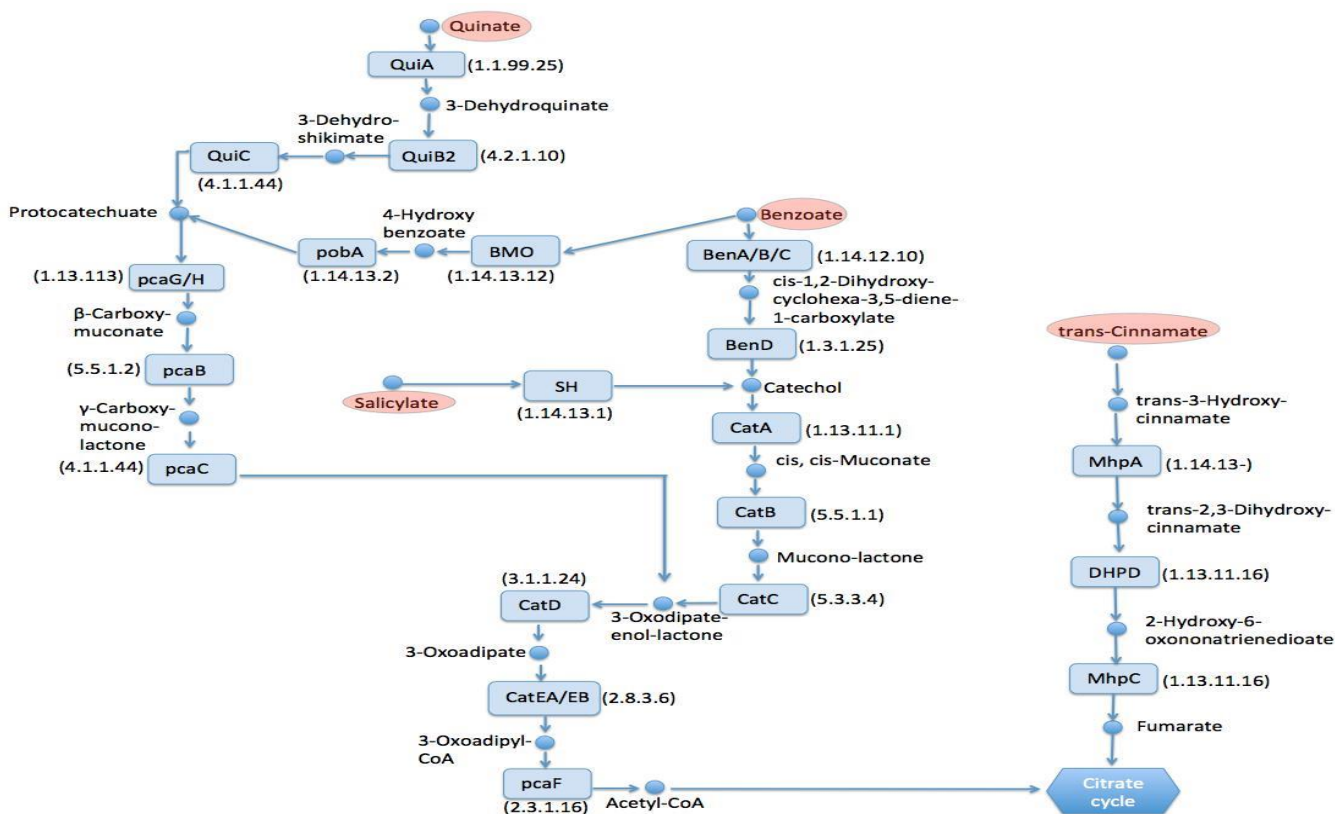
5.7 Degradação de fitoquímicos

Foram pesquisados genes envolvidos na degradação de fitoquímicos aromáticos que são comumente encontrados no cafeeiro, como cafeína, benzoato, quinato e cinamato (Farah and Donangelo 2006; Santos *et al.*, 2011; Stashenko *et al.*, 2013). Além disso, buscamos genes envolvidos na degradação do salicilato, um importante indicador da resposta imune da planta e crucial para a interação entre bactérias e plantas (Wang *et al.*, 2016). Observou-se que MN1F e EMN2 possuem a maquinaria genética necessária para a decomposição de benzoato, quinato, cinamato e salicilato. Por outro lado, o MNR3A não possui os genes *BenA*, *B*, *C* e *D* responsáveis pela degradação inicial do benzoato, e os genes *QuiA*, *B2* e *C* responsáveis pela degradação inicial do quinato. A interconexão entre esses sistemas de degradação culmina na formação de acetil-CoA, um precursor do ciclo do citrato (Fig. 6). As vias de degradação do benzoato e salicilato convergem na conversão em catecol pelas enzimas BenD e SH, respectivamente. A via do quinato converge na via do benzoato através da formação de 3-oxoadipato-enol-lactona,

mas o inverso também pode ocorrer quando a via do benzoato (via 4-hidroxi benzoato) converge para a via do quinato.

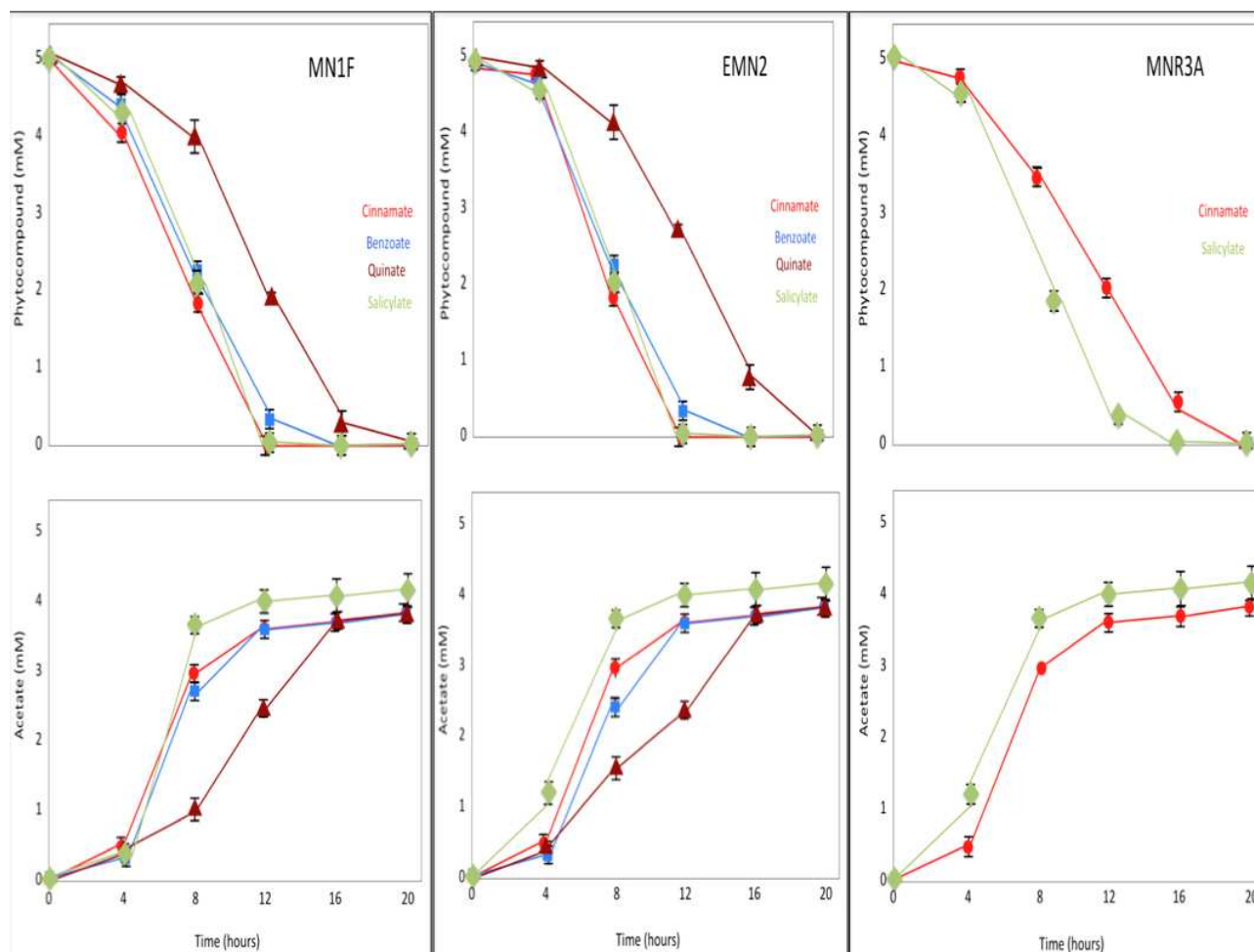
Essas três vias terminam em acetil-CoA. A via do cinamato, no entanto, não se interconecta com nenhuma outra e é incorporada ao ciclo do citrato, terminando no fumarato ao invés de acetil-CoA.

Figura 6. Mapa de interconexão entre sistemas de degradação. Os compostos iniciais são representados em vermelho, as enzimas nos quadrados azuis e os compostos intermediários em pequenos círculos azuis.



Para verificar se houve de fato a degradação dos fitocompostos e sua subsequente incorporação no ciclo do citrato, as concentrações de quinato, benzoato, cinamato, salicilato e acetato foram medidas por HPLC, sendo estes fontes únicas de carbono (Fig. 7). Como esperado da anotação, MN1F e EMN2 foram capazes de degradar todos os fitocompostos testados, e há forte indício de incorporação ao ciclo do citrato. Por outro lado, MNR3A sequer cresceu em meio contendo benzoato e quinato como fontes de carbono.

Figura 7. Teste de degradação de fitocompostos e síntese de acetato, evidenciando um processo



Foram buscados genes relacionados ao metabolismo da cafeína no genoma das três *Pseudomonas*. Apesar de conterem genes que codificam quatro subunidades da xantina desidrogenase (*XDHFeS*, *XDHFAD*, *XDH-Mo* e *xdhC*) que catalisa a oxidação da cafeína em ácido 1,3,7-trimetilúrico (Molinari, 2007), as três *Pseudomonas* não contêm cafeína-N3-desmetilase e nem cafeína-N1-desmetilase, cruciais na degradação completa do composto (Molinari, 2007).

Para verificar a precisão da anotação do genoma, pretendeu-se realizar um ensaio de degradação da cafeína semelhante ao feito anteriormente com os outros fitocompostos. No entanto, as bactérias não foram capazes de crescer em meio mínimo no qual a cafeína era a única fonte de carbono ou nitrogênio. Também foram

realizados experimentos adicionando cafeína como fonte secundária de carbono e nitrogênio, para verificar se a cafeína poderia ser usada após o consumo de glicose e NH_4Cl , respectivamente. Em ambas as situações as bactérias não foram capazes de crescer após o consumo das fontes primárias (Material suplementar).

5.8 Taxia e resistência a cafeína

Realizou-se um teste de quimiotaxia para avaliar a afinidade quimiotática de EMN2, MNR3A e MN1F para cafeína. Os três isolados de *Pseudomonas*, mas não o controle negativo (*Escherichia coli*), apresentaram quimiotaxia positiva para a cafeína (Fig. 8).

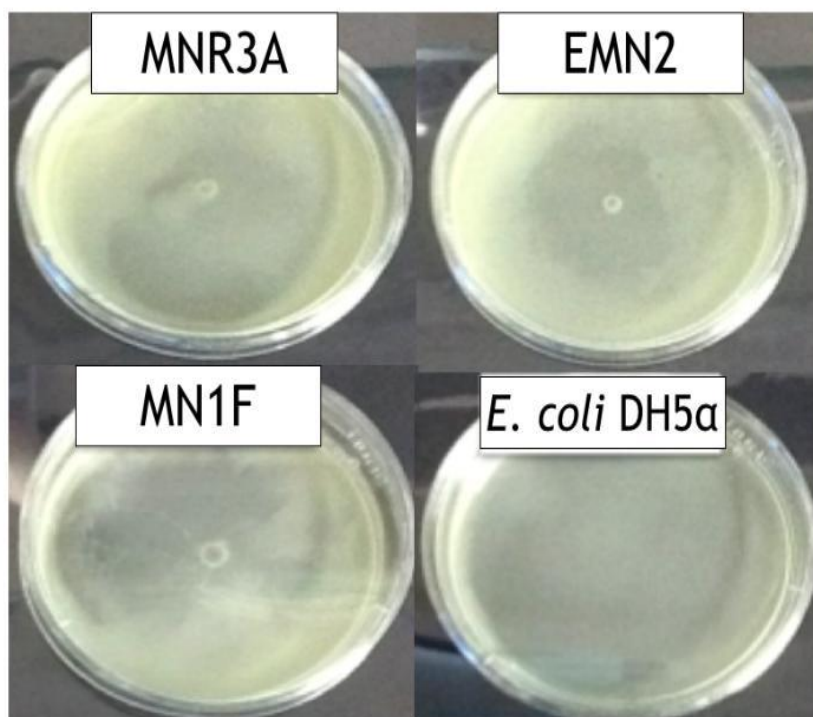
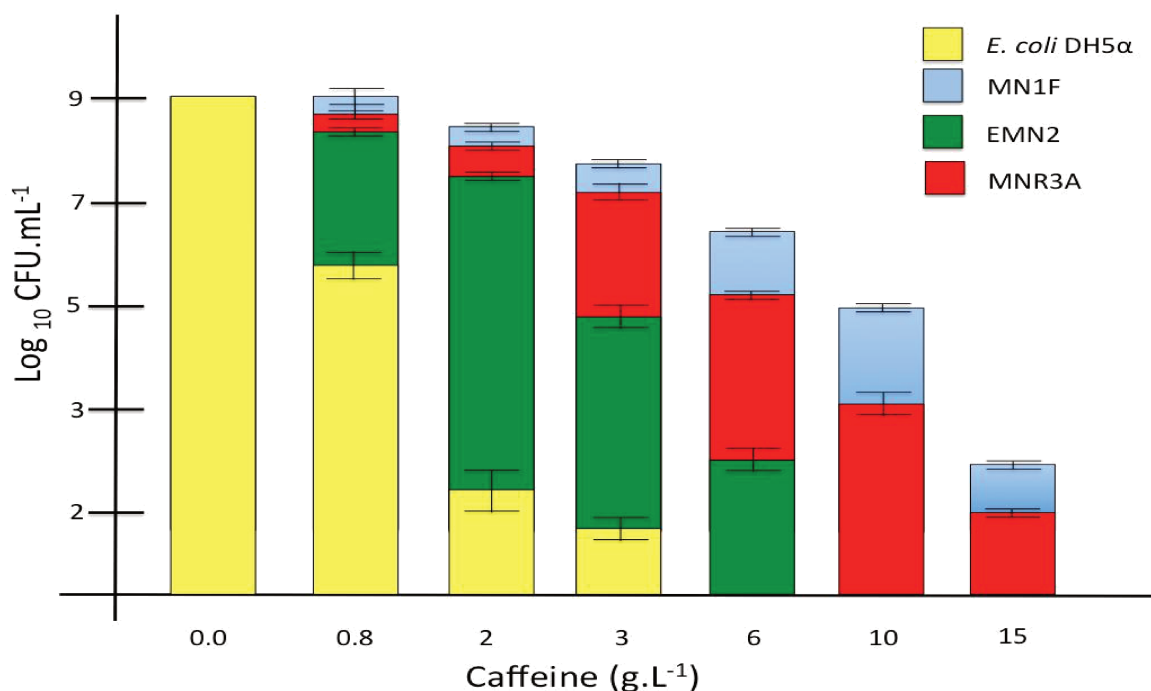


Figura 8. Teste *in vitro* de taxia para cafeína. A taxia é mostrada pelo pequeno halo no centro onde há crescimento bacteriano ao redor do cristal de cafeína.

Avaliou-se também a resistência dessas bactérias à cafeína. Foram adicionadas diferentes concentrações de cafeína (0,8, 2, 3, 6, 10, 15 g / mL) e mediu-se o crescimento bacteriano após 8 horas de incubação. Todas as *Pseudomonas* foram mais resistentes à cafeína do que o controle de *E. coli* (Fig. 9). MN1F foi a mais resistente. Concentrações maiores que 3g/L inibiram o crescimento de EMN2 (Fig. 9).

Figura 9. Teste de crescimento (mediante verificação de crescimento via CFU em diferentes concentrações de cafeína. Vê-se que MN1F (barra azul) mostrou-se a mais tolerante



5.9 Transferência horizontal de genes

Para identificar possíveis eventos de transferência horizontal entre plantas e bactérias, a análise foi realizada de acordo com o método publicado por Levy *et al.*, 2018. Foram encontradas cinco seqüências de DNA (três de MNR3A, uma de MN1F e uma de EMN2) que são compartilhadas entre esses genomas e plantas. Surpreendentemente, nenhuma das seqüências exibiu semelhança com outra vinda do cafeeiro. Essas proteínas foram anotadas como uma proteína hipotética (EMN2; identidade de 53% com *Ricinus communis*), canal mecanossensível de pequena condutância (MNR3A; identidade de 62% com *R. communis*), RING-finger protein (MNR3A; identidade de 68% com *Corchorus olitorius*), GABA permease (MN1F; 50% de identidade com *Cajanus cajan*) e aldeído desidrogenase (MNR3A; 50% de identidade com *Selaginella moellendorffii*).

Figura 10. Resultado no Blast-NCBI para Proteínas bacterianas similares a vegetais em a) MN1F b) EMN2 c) MNR3A

a)

GABA permease, partial [Cajanus cajan]

Sequence ID: [KYP78876.1](#) Length: 415 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 382 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
357 bits(916)	5e-108	Composition-based stats.	192/383(50%)	254/383(66%)	9/383(2%)
Query 1259	LGEMAVAI PGVGSFTEYARLG-----LGNWVGFTSGWLYWYFWVIVVAEAVVGADILK				1312
Sbjct 1	LGE+A A P GSF YAR L GF +GW+YWFVWIV+A+EA+VGA + LGELATASPVSFSFYAYARHAFQDSPYLSRLAGFMTGWMYWFVWIVIALEAIVGAKLFA				60
Query 1313	QWIP-LPAWAIGLSLLAINTAINCLSVKSYCEFEYWFASLKVFVFIIVFICGLCAYLFG-W				1370
Sbjct 61	W+P P W + L LLA++TA N SVKS+GEFE+WF+S+KV AI +FI L Y+FG W YWLPDTPQWIVSLVLLALLTATNLFVSVKSFGEFEFWFSSIKVAAIGLFIPLCTLYMFGLW				120
Query 1371	APSTGALLDNLVNRGFMFPGISAVLAGVPTVIFAVGGAETIAAAESDDPSKSVAAMT				1430
Sbjct 121	A L+N GFMP G VL+G GAEI TIAAAE+ DP KSAV T PNHQAAGFGLLNHGGFMFNGWGPVLSGAVAATGFYFGAEIVTIAAAETKDPEKSVAKAT				180
Query 1431	RSVIFRVITFYVVSILLIVCIVPWGSIAGHSPFVTAMEVMHVPATLIMEAVVLVAVLS				1490
Sbjct 181	+SVI RV+ FYV SILL+VCIVPW S E +P+V+A++V+++P IM V+LVAVLS QSVISRVLIFYVCSILLVVCIVPWNSPEIA-TPYVSALKVLNIPFVADIMNVVILVAVLS				239
Query 1491	ALNSGLYVSSRILFGLSERGDAPAALSQLTGHRVPRLA VLLSSVIGYIAIAAASPGQV				1550
Sbjct 240	LNSG+Y +SR+LF L++ GDAP +L++L+ + VP A+L S++ GY++I A+ SP V CLNSGVYAASRMLFALTQNGDAFRSLTKLSKNGVPIRAILFSTLFGYLSILASYFSPDAV				299
Query 1551	FLFLVNASGAIMLFVYLAIAIAQVRLRRQLEREAPQRLTLRMWLPGLSYAVIAAIVGVFL				1610
Sbjct 300	FLV + G + LFVY+ IA +Q+RLRR LER AP+ L +RMW FP LSY I ++ + FFFLVESYGVVLFVYIVIAFSQIRLRRHLERVAPECLKVRMWCFFYLSYFAIIGMLSIF				359
Query 1611	VAMAFQEGRLTQLLASVLSLAVV 1633				
Sbjct 360	AMAF GL+ + S ++ TAMAFIPGLQKAFWFGIASAGIL 382				

b)

conserved hypothetical protein, partial [Ricinus communis]

Sequence ID: [EEF24230.1](#) Length: 199 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 187 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
200 bits(508)	4e-56	Compositional matrix adjust.	99/187(53%)	124/187(66%)	31/187(16%)
Query 655	VEGMPKPTALEVEGRDVIYIREGCVGCHSQMIRPFRAETERYGHYSVAGESVWDHPFLWGS				714
Sbjct 2	V+G++P + LE+ GR++YIREG C HSQMIRPF+ E ERYGHYS+A ES +DHPF WGS VDGVRPYSPELAGRNIIYIREGCYLCHSQMIRPFKDEVERYGHYSLAAESQYDHPFQWGS				61
Query 715	KRTGPDARVGGRYSDWHRAHLYNPRNVVPESKMPSPYWLVENKLDGKDTAKKLEVLRT				774
Sbjct 62	KRTGPDARVGG+Y++DWH HL NPR+VVPES MP YP L + L D A+ L+ LR KRTGPDARVGGKYTNDWVRHLINPRDVPESVMPGYPHL-KRPLKYDDIAEHLKTLRV				120
Query 775	LGTPTYDDEDIAGARDAVKGK-----TEM DALVAYL				804
Sbjct 121	+P PA HA G VPGRGQDDP+PG HVQPL HL R DR IESSHST+FWRAL D + Q VGVFPYTDDDIANAKADLEEQVRADSPDGAVMLKRYPKARVGAADGNPQVVSEMDALVAYL				180
Query 805	QGLGTLI 811				
Sbjct 181	Q LGT + QVLGTFV 187				

c)

RING finger protein, partial [Corchorus olitorius]

Sequence ID: [OMP13055.1](#) Length: 186 Number of Matches: 1

Range 1: 19 to 186 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
182 bits(461)	7e-50	Compositional matrix adjust.	114/168(68%)	126/168(75%)	0/168(0%)
Query 1623	RRECHVQTSGSVDDGLAVLRGCRPPPELHRRRRRAAPDPERCQAGGTARRNAASPPVPA				1682
Sbjct 19	RR+ +VQTPG++ D AVLR C P PEL+ RRRRAAPDPER QQAGG ARR+AA P VPA RRDYRVQTPGALHDPVAVLRSCSPSELYPRRRRAAPDPERGQAGGAARRDAAPPLVPA				78
Query 1683	HPPTPAAHAGGLAVPGRGQDDPHPGGHVQPLCPHLWRTRDSIESSHSTEFWRALVDSSAQ				1742
Sbjct 79	+P PA HA G VPGRGQDDP+PG HVQPL HL R DR IESSHST+FWRAL D + Q YPQAPATHACGQVPVGRGQDDPYPGRHVQPLRAHLRRADRDIESHSTQFWRALADPAQ				138
Query 1743	GLWQTPPEHPGHPORNGALRPAAGLGRRGVLLRSCHLAGCDLRGTVR 1790				
Sbjct 139	L QT EHPP HPQR+G + AAGLG GVLL GHLG LRG VR RLRQTAREHPPRHPQRDGTVCIAAGLGCGVLLWPGHLAGGHLRGAVR 186				

Small-conductance mechanosensitive channel, putative, partial [Ricinus communis]

Sequence ID: [EEF24591.1](#) Length: 143 Number of Matches: 1

Range 1: 23 to 143 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
135 bits(339)	4e-34	Compositional matrix adjust.	75/121(62%)	101/121(83%)	0/121(0%)
Query 212	RLLQDVVGALIFLAATAVAAAAYVLQLPVKGLLATSGVMAIVIGLALQSTLADVPFSGIVLN	271	RL DV GA++FLAAAVAA +VL+LPV+GL+ATSG +AIV+GLA+QSTL+DVF+GIV+N		
Sbjct 23	RLFSDFVGAVVFLAAVAALGFVLELPVRGLVATSGALATVGLAIQSTLSDVFAIVIN	82			
Query 272	TTTPYQIGDSISIDGTEGKVVDIDWRATRLITGTGSLAVIPNSVAAKARLLNHSRPPADRH	331	TT PY IG+ + IDG ECKV++++WRAT L+T G++ ++PN+VAKA++ N SRP H		
Sbjct 83	TTTPYHIGNWVIIDGVEGKVLEMMWRATHLLTSQGNIVIVPNAVAAKAKITNSSRPPALH	142			
Query 332	G 332				
Sbjct 143	G 143				

aldehyde dehydrogenase family 7 member B4 isoform X2 [Selaginella moellendorffii]

Sequence ID: [XP_002961173.1](#) Length: 511 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 45 to 511 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
465 bits(1197)	6e-145	Compositional matrix adjust.	240/479(50%)	317/479(66%)	14/479(2%)
Query 368	DYPVHTPIDGSQIASVKLLGKAETIAR-IDQAQTAFAEAWRNVPAPRRGELVRLFGVELRA	426	+ P+ T I+GS E R + ++A E+W PAP+RGE+VR G+ R		
Sbjct 45	NQPIATVIEGS-----LEDYERSLKACESARESWM LTPAPKRGEIVRQIGDAFRK	94			
Query 427	HKADLGELVSIKAGKITQEGGLGEVQEMIDICDFAVGLSRQLYGLTIASERPGHHMRESWH	486	+ +LG L+S+E GKI EG+GEVQE+ID+CDFAVGLSRQL GL + SERP H M E W+		
Sbjct 95	NLENLGRLLSLEMGKILVEGIGEVQEVVIDMCDFAVGLSRQLSGLILPSEPNHMMMEVWN	154			
Query 487	PLGVVGVISAFNFPVAVWAWNTTLALVAGNSVWVKPSEKPTLTALACQALFEKALKAFGE	546	PLG+VGV+AFNFP AV WN +ALV GN VVWK + TPL ++A + L+ G		
Sbjct 155	PLGIVGVITAFNFPFCAVLGWNACIALVCGNCVWKGAPTTPLVSIATTKIAGVLERNG-	213			
Query 547	APQGLSQLVIGGREAGEALVDDPRVPLVSATGSTRMGREVGPRVAARFGRSILELGGNNA	606	P + + GG E GEA+ D R+PLVS TGS+++G+ V V +RFG+ +LEL GNNA		
Sbjct 214	LPGAIFTICCGGAEIGEAIAKDSRIPLVSFTGSSKVGQIVQCHVNSRFGKCLELGGNNA	273			
Query 607	MILAPSADLDLAVRGILFSAVGTAGQRCITTLRRLIVHSIKDEVVARVKAAYGKVRIGDP	666	+++ ADL LAVR +LF+AVGTAGQRCIT RRL VH++I + + ++ AYG+++GDP		
Sbjct 274	IVVMDDADLSLAVRSVLFRAVGTAGQRCITTCRRRLFVHQAIYKDFIEKLVTAYGQLKVGDP	333			
Query 667	RK-DNLVGPLIDKLSFDAMQCALAKARDEGGQVFGGERQLADQYPNAVYVSPAIAEMPAQ	725	K D+LVGPL S A + L +GG+ G P YV+P+I E+		
Sbjct 334	LKHDSLVLGPLHSSQSKQAFEGGLEAIA SQGKFLTGVGTTTS-PGENYVTPSIVEISHD	392			
Query 726	SEVVHETFPFAPILYVLAYDDFEALRLNNEVPQGLSSCIFTTDIREAERFQSASGSDCGI	785	++VV+ E F P+LYV + +EA+ +NN VPQGLSS IFT ++ +GSDCGI		
Sbjct 393	ADVVKELFLGPLLYVVFQKTLDEAIAMNSVPQGLSSSIFTKSHETIFKWIPTGSDCGI	452			
Query 786	ANVNICTSGAEIGGAFGGEKETGGGREGSDAWKGYMRRQNTNVNYSRELPLAQGIVFD	844	NVNI T+GAIEGAFGGEK TGGGRE+GSD+WK YM R T T+NY + LPLAQGI F+		
Sbjct 453	VNVNIPTNGAEIGGAFGGEKATGGGREAGSDSWKQYMERATCTINYGKTLPLAQGINFN	511			

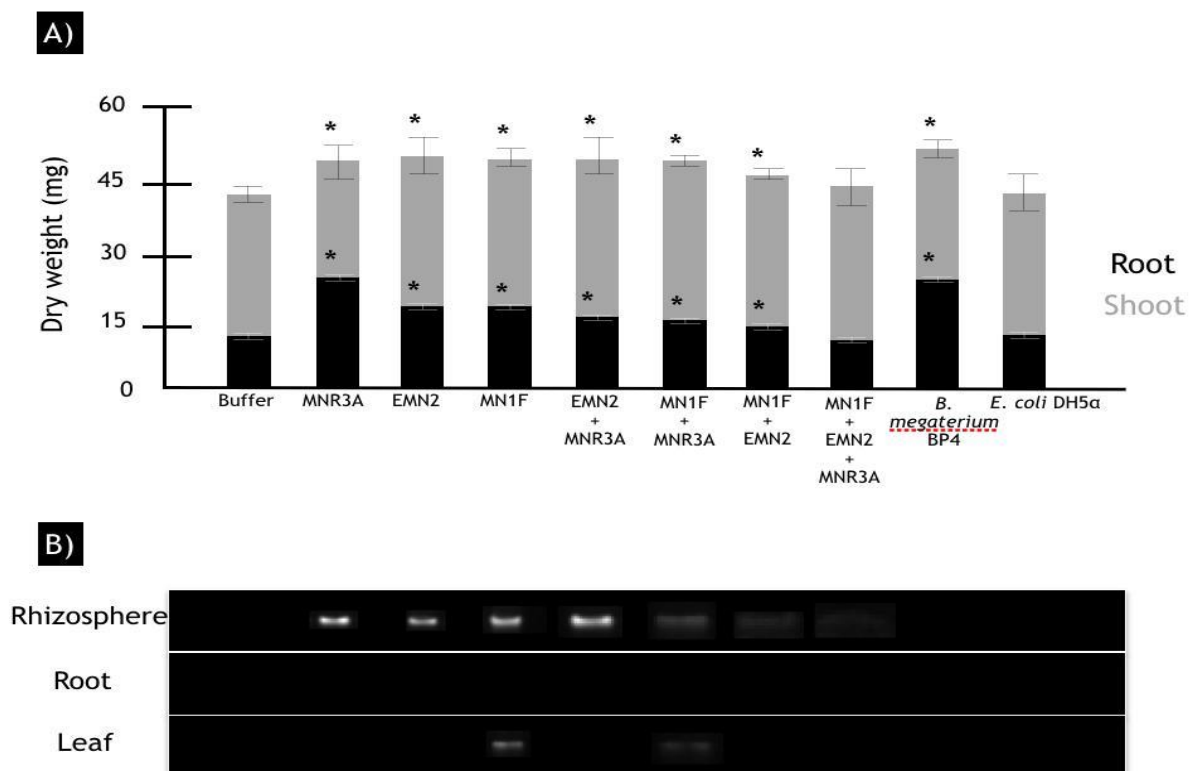
5.10 Ácido Indoleacético (IAA) e promoção do crescimento das plantas

Identificou-se genes responsáveis pela síntese de auxina (Glick, 2005), com o triptofano como precursor, nos três isolados. A produção de IAA foi confirmada por ensaios *in vitro*. Realizou-se um experimento de promoção do crescimento de plantas usando alface como modelo heterólogo. A bacterização de sementes de alface apresentou os maiores resultados de crescimento quando MNR3A foi inoculado

isoladamente, resultando em crescimento de peso para os sistemas de raízes e parte aérea (aumento de 67% e 9%, respectivamente). Estes resultados são semelhantes aos observados após o tratamento com o promotor de crescimento *Bacillus megaterium* (Fig. 11a).

Quando outras *Pseudomonas* colonizaram a rizosfera, também demonstraram capacidade de promover o crescimento das plantas, mesmo MN1F sendo isolado inicialmente da superfície foliar (Fig. 6a; Tabela 1). Usando os primers de ITS específicos de *Pseudomonas*, detectamos a colonização da rizosfera e das folhas de alface via PCR (Fig. 11b). Todos os isolados bacterianos foram detectados separadamente na rizosfera, mas nenhum foi detectado nas raízes, e apenas MN1F foi detectado nas folhas, tanto quando inoculadas sozinhas, quanto com EMN2 e MNR3A separadamente. Curiosamente, quando todos os três isolados foram inoculados juntos, não houve promoção do crescimento e as bactérias não foram detectadas por PCR nos tecidos (Fig. 11b).

Figura 11. A) Massa seca das plântulas de alface inoculadas com diferentes tipos de tratamentos. Os tratamentos com resultados estatisticamente significativos foram marcados com *. B) Detecção das *Pseudomonas* nas amostras vegetais. As bandas mostram a amplificação do ITS específico de *Pseudomonas*. Foram detectadas *Pseudomonas* na rizosfera em todos os tratamentos (bandas evidentes), na folha somente em MN1F e MN1F + MNR3A, e nenhuma na raiz.



De fato, a contagem de CFU / placa de plantas inoculadas confirmou os resultados da PCR (Tabela 4). A análise por CFU / placa também indicou antagonismo, principalmente entre MN1F e EMN2, e MN1F e MNR3A. Quando todas são inoculadas, o antagonismo é maior ainda.

Tabela 4. CFUs detectadas pré e pós inoculação nas sementes de alface

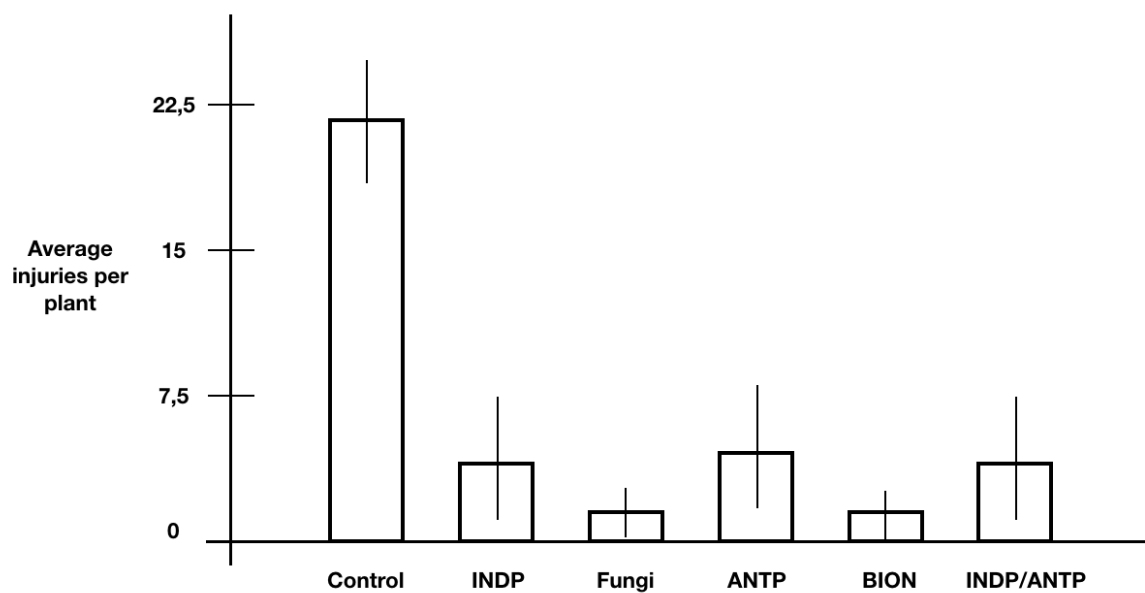
	Pre-inoculation (CFU/plate)	Post-harvest (CFU/plate)
Control	---	---
MNR3A	121	23
EMN2	126	21
MN1F	122	20
MNR3A + EMN2	125	22
MNR3A + MN1F	126	11
EMN2 + MN1F	122	10
MNR3A+MN1F+EMN2	123	3
<i>B. megaterium</i>	122	21
<i>E. coli</i> DH5α	125	1

5.11 Antagonismo e indução de resistência entre MN1F e ferrugem-do-café

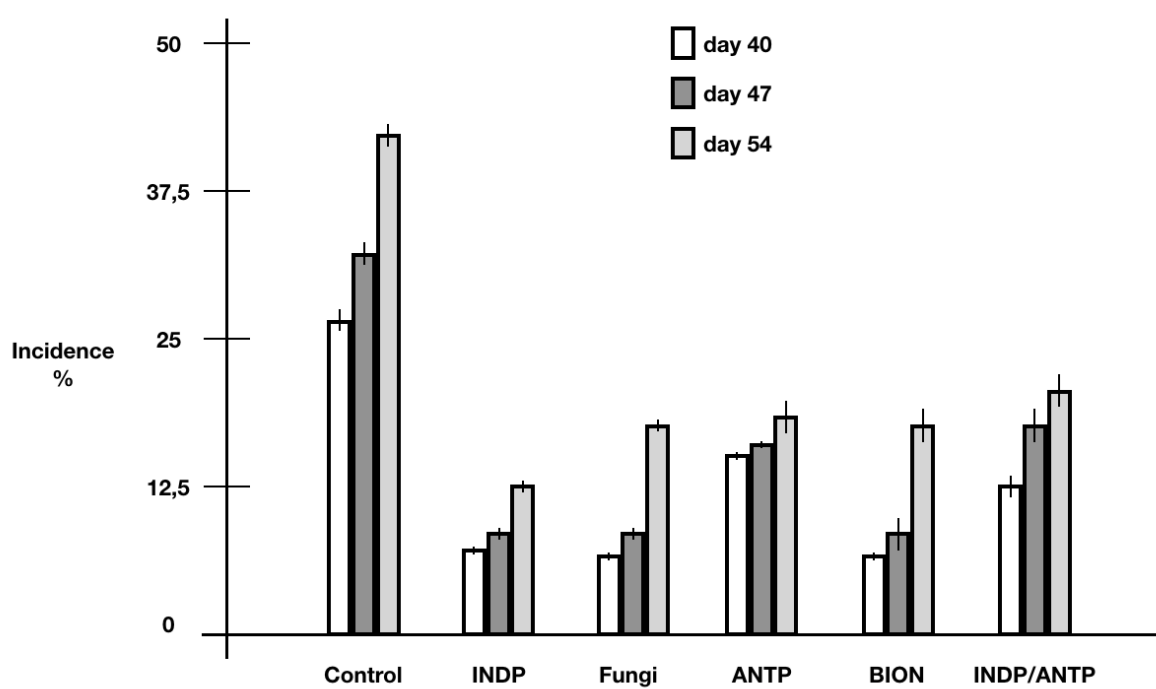
O antagonismo de MN1F foi verificado através do número de lesões nas folhas (Fig. 12a) e da porcentagem de folhas danificadas (Fig. 12b). Todos os tratamentos mostraram efeito positivo em diminuir as lesões por *Hemileia vastatrix*, uma vez que todos tiveram médias menores que o controle sem tratamento nenhum (Figura 12a).

Figura 12. a) Número médio de lesões Gráfico com a incidência de ferrugem no cafeeiro em diferentes tratamentos ao longo de 20 dias. **b)** Os dados passaram pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%

a)



b)



O uso de Bion conteve a ação do fungo satisfatoriamente nas duas primeiras medições (nos dias 09/02/2017 em azul e 16/02/2017 em vermelho na Figura 12b) porém parece ter perdido o efeito na terceira medição (pulando de cerca de 8% para 18% de incidência). Apesar disso, mostrou efeito final melhor que o fungicida e semelhante à indução e indução/antagonismo. Após a terceira medição, o antagonismo mostrou o melhor resultado de todos com incidência de cerca de 12% (menor porcentagem dentre todos os tratamentos), superior até que o tratamento com prévia indução de resistência. O melhor resultado se viu no antagonismo, tratamento esse que mais mostrou plantas sem nenhum sintoma aparente da doença (Figura 13). Curiosamente o tratamento com antagonismo/indução se mostrou inferior ao antagonismo sozinho, mas superior ao fungicida.

Figura 13. Fotos representando todos os tratamentos. Os círculos vermelhos mostram as lesões por *Hemileia vastatrix*. A) Testemunha; B) Antagonismo; C) Indução/Antagonismo; D) Indução; E) Bion; F) Fungicida.



6. Discussão

Neste trabalho, utilizou-se a tecnologia de sequenciamento de alto rendimento para estudar o genoma dos três isolados *Pseudomonas* obtidos a partir de três ambientes distintos de *C. arabica*, buscando pistas que expliquem as preferências de colonização de cada isolado. Descobriu-se que havia aproximadamente 60% de similaridade de sequência entre os genomas. Isso é consistente com comparações feitas anteriormente em genomas de *P. fluorescens* (Silby *et al.*, 2008; Loper *et al.*, 2012), mostrando alto potencial para trocas genômicas. A presença de sequências de inserção pode estar relacionada à adaptação do habitat. De fato, as ISs desempenham um papel fundamental na adaptação aos estresses (Wery *et al.*, 2001). Identificou-se um número maior de cópias IS em MN1F do que nos outros isolados. É interessante notar que o MN1F adquiriu 70% de seus ISs (ISPsy5 e IS684) de *Pseudomonas syringae* (uma colonizadora de folhas que pode se comportar como patógeno, embora não seja obrigatória esta característica (Buell *et al.*, 2003) e *Pseudomonas entomophila*, uma bactéria entomopatogênica que também pode colonizar as folhas (Vodovar *et al.*, 2006). A similaridade da história de vida e ecologia entre as bactérias doadoras e receptoras de IS sugere que essa troca pode ocorrer com bastante frequência e ser promovida pela proximidade física no habitat foliar (Bailey *et al.*, 2006). O fato de MNR3A não conter nenhum IS é surpreendente porque a rizosfera é um ambiente altamente competitivo e um mecanismo como o IS que promove maior variabilidade, seria de grande valia para superar possíveis concorrentes (Mira *et al.*, 2002).

O seqüestro de ferro livre por sideróforos como a pioverdina (Kloepper *et al.*, 1980) é uma das características mais notáveis de *Pseudomonas* (Vasil, 1999). MN1F e EMN2 produzem mais sideróforos que MNR3A, como visto no teste do halo. Esses dados estão de acordo com os testes de crescimento com limitação de ferro, nos quais MN1F teve o melhor desempenho, seguido por EMN2 e por MNR3A (Figura. 3). Em comparação com as bactérias da rizosfera, MN1F e EMN2 colonizam habitats com limitação de ferro na superfície da folha e no tecido interno da raiz (Lindow e Brandl, 2003) respectivamente, o que pode explicar o aumento da produção de sideróforos. Curiosamente, EMN2 contém dois receptores de sideróforos alternativos, (aerobactina e acromobactina), apesar da ausência de

genes relacionados a suas sínteses e seus respectivos repressores. Isso pode sugerir que o EMN2 sequestre os compostos de ligação ao ferro produzidos por outras bactérias, competindo pelo ferro no ambiente endofítico (Sessitsch *et al.*, 2012). Estratégia semelhante não foi totalmente descrita para bactérias associadas às plantas, mas é bem conhecida em patógenos de animais como *Pseudomonas aeruginosa* (Liu e Shokrani, 1978; Bitter *et al.*, 1991), atuando como um fator de virulência, melhorando a invasão e a colonização do hospedeiro.

Bactérias associadas às plantas sofrem de vários estresses, bióticos e abióticos (Lindow and Brandl, 2003). Testes de resistência ao estresse hídrico indicaram que o MN1F tem a maior resistência osmótica (Figura 5). De fato, a superfície da folha é um ambiente particularmente estressante quanto há baixa disponibilidade de água (Vorholt, 2012). MN1F possui os sistemas toxina-antitoxina *vapB / C* e *YoeB / M*, sendo o primeiro o sistema mais encontrado no genomas de procariontes, desempenhando um papel importante na resposta ao choque térmico (Cooper *et al.*, 2009). Já *YoeB/M* possui atividade de ribonuclease e serve como uma toxina para outras bactérias, causando severa inibição do crescimento celular (Nieto *et al.*, 2007).

Sabe-se que plantas como o cafeeiro produzem uma infinidade de compostos fenólicos, alguns dos quais são responsáveis pelo aroma e sabor típicos da bebida (Joet *et al.*, 2014). Esses compostos também atuam para proteger as plantas contra danos por radiação solar (Close e McArthur, 2002). Tem sido sugerido também que os compostos fenólicos presentes nas folhas alteram a composição da microbiota endógena porque defendem a planta contra microorganismos (Yadav *et al.*, 2005). EMN2 e MN1F contêm genes que codificam enzimas das vias de degradação do cinamato, salicilato, quinato e benzoato, enquanto o MNR3A apenas degrada o cinamato e o salicilato (Figura 7b). Além disso, há uma convergência entre essas vias de degradação, levando à formação de intermediários no ciclo do citrato (detecção do acetato), envolvidos na geração de energia (Figura 7a). Assim, a degradação dos compostos fenólicos não apenas protegeria a bactéria de seus efeitos deletérios, mas também contribuiria para o metabolismo dos carboidratos. A capacidade de MN1F e MNR3A de degradar o salicilato corrobora com os dados genômicos que revelaram que esses isolados contêm genes que codificam a enzima salicilato hidroxilase, responsável pela conversão do salicilato em catecol (Bhushan

et al., 2004). A presença desta enzima em microrganismos associados às plantas é importante para a evasão do sistema de defesa das plantas (Ambrose *et al.*, 2015). O ácido salicílico (SA), um hormônio importante na defesa das plantas, media as relações entre patógenos vegetais induzindo a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) e contribuindo para a resistência adquirida sistêmica. A falta de salicilato hidroxilase no genoma EMN2 é surpreendente, uma vez que essas bactérias são capazes de degradar SA (Figura 7b). É possível que o EMN2 use uma enzima desconhecida para catabolizar o SA.

Esperava-se encontrar evidências do uso de cafeína. Surpreendentemente, não encontramos os genes que codificam as desmetilases da cafeína, responsáveis pelos primeiros passos do catabolismo da cafeína. De fato, as três bactérias não foram capazes de crescer em meio mínimo contendo cafeína como fonte única de carbono e também como fonte secundária de carbono e nitrogênio (Figuras 8 e 9). Análises anteriores mostraram que *Pseudomonas* degradam a cafeína, especialmente em solos sob cafeeiros (Woolfolk *et al.*, 1975), e que são atraídos pela cafeína. As bactérias estudadas aqui têm quimiotaxia positiva para a cafeína e são tolerantes à ela (Figuras 8 e 9). Seguindo o cenário de que MN1F, MNR3A e EMN2 não metabolizam cafeína, mas toleram e são atraídos pela cafeína, hipotetiza-se que as bactérias analisadas possam viver em ambientes com alto teor de cafeína e serem atraídas pela molécula como um 'sensor de colonização', mas evitando sua internalização por algum tipo de mecanismo de extrusão.

Como mencionado anteriormente, as sementes do cafeeiro levam muito tempo para germinar e não têm uma germinação uniforme, por isso decidiu-se usar alface para um experimento de promoção do crescimento das plantas. MNR3A aumentou mais o crescimento de raízes e parte aérea do que outros isolados (Figura 6a), embora o EMN2 e o MN1F também demonstrassem capacidade de colonizar a rizosfera e promover o aumento da biomassa (Figura 6). Isso sugere que a rizosfera não requer especificidade estrita das bactérias hospedeiras e, em vez disso, depende de habilidades mais gerais de *Pseudomonas* para colonizar a superfície da planta (*e.g.* formação de biofilme). Curiosamente, essa capacidade de promover o crescimento das plantas diminui quando as bactérias são inoculadas em pares e desaparecem quando as três são inoculadas juntas (Figura 11). Sugere-se que esse fenômeno possa ser o resultado de um ambiente altamente competitivo, onde mais

de um isolado prejudicará o crescimento de todos os outros, o que também é prejudicial aos efeitos benéficos da planta. O resultado da tabela 4 corrobora com essa hipótese, onde na inoculação com todas juntas, foram recuperadas poucas bactérias. De fato, dados metagenômicos recentes mostraram que o aumento da diversidade bacteriana na rizosfera afeta negativamente o crescimento, talvez devido à competição (Mehrabi *et al.*, 2016). Curiosamente, MN1F foi detectado nas folhas (Figura. 6b); é provável que, durante o processo de germinação, MN1F tenha aderido ao epicótilo da plântula e permanecido nas folhas durante o desenvolvimento da planta. MN1F não foi detectado nas folhas quando co-inoculado com outras bactérias. Talvez a competição no solo possa ter interrompido a colonização do epicótilo por MN1F.

Verificou-se, por fim, se MN1F teria alguma habilidade de combater e/ou prevenir os danos causados pela ferrugem-do-café. Estudos prévios já demonstraram o efeito benéfico de bactérias (principalmente *Pseudomonas* e *Bacillus*) no controle da ferrugem (Shiomi *et al.*, 2006; Haddad *et al.*, 2009), rivalizando até com a aplicação de fungicida. Os mecanismos envolvidos poderiam ser de dois tipos: por antagonismo direto (competindo por recursos com o patógeno) e por indução prévia de resistência (a bactéria benéfica induz os mecanismos de defesa da planta do mesmo modo que um patógeno induziria, mas sem os danos do mesmo). Esperava-se que o tratamento indução/antagonismo fosse o mais eficiente ao longo do tempo, o que não se mostrou verdadeiro. O experimento sugeriu que no caso da ferrugem e de MN1F, a ação direta parece ser o mecanismo predominante no efeito positivo sobre a doença. Outro aspecto a ser mencionado diz respeito à época do experimento. Haddad *et al.*, (2009) verificaram que o sucesso do biocontrole dependeu do mês da aplicação da suspensão bacteriana. A aplicação feita em novembro surtiu mais efeito (incidência de 7,5%) do que a aplicação em janeiro (incidência de 23,8%). Esses dados indicam que o sucesso do biocontrole deve levar em consideração o ciclo de vida do fungo, já que novembro é um dos meses com menor incidência e janeiro o de maior incidência (Salgado *et al.*, 2007). O presente trabalho foi realizado em fevereiro, mês com incidência alta, o que não impediu de verificarmos o efeito positivo da aplicação nas plantas. Deste modo MN1F tem bom potencial como agente de biocontrole da ferrugem do café.

7. Conclusão

Neste estudo mostrou-se o valor da genômica comparativa no levantamento de variações genéticas intra-específicas entre três linhagens de *Pseudomonas* isoladas de diferentes partes de *C. arabica*. Mostrou-se que as diferenças genômicas podem refletir diferentes estratégias de sobrevivência de bactérias em sua planta hospedeira, principalmente MN1F, devido às peculiaridades de seu habitat foliar. Os genomas de EMN2 e MNR3A sugerem que a rizosfera/raiz é um ambiente mais competitivo que a superfície foliar, o que é suportado pelo fato de que os habitats da superfície foliar são menos povoados devido à falta de recursos Vorholt (2012). No entanto, o MN1F parece ser mais adaptado às inúmeras tensões abióticas na superfície da folha (e.g. insolação, seca e estresse térmico). Além disso, descobriu-se que todas as três bactérias são tolerantes e atraídas pela cafeína, mas surpreendentemente não a metabolizam. Estudos futuros poderão focar na dinâmica da colonização, buscando entender se há de fato migração diferencial entre as diferentes bactérias nos diferentes ambientes.

8. Referências

- ABIC (Associação Brasileira da Indústria do Café).
<https://www.abic.com.br/estatisticas/desempenho-do-setor-2/>;
[https://www.abic.com.br/estatisticas/producao-agricola-2/Dados referentes a 2016](https://www.abic.com.br/estatisticas/producao-agricola-2/Dados%20referentes%20a%202016)
- Ambrose KV, Tian Z, Wang Y, Smith J, Zylstra G, Huang B and Belanger FC. Functional characterization of salicylate hydroxylase from the fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Sci. Rep.* 2015; 5, 10939.
- Bailey MJ, Lilley AK and Diaper JP. Gene transfer between micro-organisms in the phyl-losphere. p 103-123. In *Aerial Plant Surface Microbiology*. 1996. Springer Boston MA
- Bitter W, Marugg JD, De Weger LA, Tommassen J and Weisbeek PJ. The ferric-pseudo-bactin receptor PupA of *Pseudomonas putida* WCS358: homology to TonB-dependent *Escherichia coli* receptors and specificity of the protein. *Mol. Microbiol.* 1991; 5, 647-655.
- Bhushan B, Halasz A, Spain JC and Hawari J. Initial reaction(s) in biotransformation of CL-20 is catalyzed by salicylate 1-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain ATCC 29352. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70, 4040-4047
- Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Daugherty S, Brinkac L, Beanan MJ, Haft DH, Nel-son WC, Davidsen T, Zafar N, Zhou L, Liu J, Yuan Q, Khouri H, Fedorova N, Tran B, Rus-sell D, Berry K, Utterback T, Van Aken SE, Feldblyum TV, D'Ascenzo M, Deng WL, Ramos AR, Alfano JR, Cartinhour S, Chatterjee AK, Delaney TP, Lazarowitz SG, Martin GB, Sch-neider DJ, Tang X, Bender CL, White O, Fraser CM and Collmer A. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100, 10181-10186

Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, Cavard D. Coli-cin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007; 71, 158-229

Carver, T., Berriman, M., Tivey, A., Patel, C., Bohme, U., Barrell, B.G., Parkhill, J., Rajan-dream, M. 2008. Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics* 24, 2672–2676.

Cipollone R, Ascenzi P and Visca P. 2007. Common themes and variations in the rhoda-nese superfamily. *IUBMB life.* 2007; 59, 51-59

Choi, E.N., Cho, M.C., Kim, Y., Kim, C.K., Lee, K. 2003. Expansion of growth substrate range in *Pseudomonas putida* F1 by mutations in both *cymR* and *todS*, which recruit a ring-fission hydrolase *CmtE* and induce the *tod* catabolic operon, respectively. *Microbio-logy* 149: 795–805.

Clarke, P. H. 1982. The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenho-ek*, 48(2), 105-130.

Close DC and McArthur C. Rethinking the role of many plant phenolics—protection from photodamage not herbivores? *Oikos.* 2002; 99, 166-172.

Cooper CR, Daugherty AJ, Tachdjian S, Blum PH, Kelly RM. Role of vapBC toxin–antitoxin loci in the thermal stress response of *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. Soc. Trans.* 2009; 371, 123-126.

DaMatta, F. M., & Ramalho, J. D. C. (2006). Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 55-81.

D'Autréaux B, Tucker N, Spiro S and Dixon R. Characterization of the nitric oxide-reactive transcriptional activator NorR. *Methods Enzymol.* 2008; 437, 235–251

Defnoun, S., Ambrosio, M., Garcia, J. L., Traoré, A., & Labat, M. (2003). Degradation of cinnamate via β -oxidation to benzoate by a defined, syntrophic consortium of anaerobic bacteria. *Current microbiology*, 46(1), 0047-0052.

Farah A and Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. *Brazil. J. Plant Physiol.* 2006; 18, 23-36

Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/faostat>. Dados referentes a 2018.

Fazuoli, L.C., Carvalho, C.S., Carvalho, G.R. 2008. Cultivares de café arábica de porte alto. In Carvalho CHS (ed) Cultivares de café: origem, características e recomendações. Embrapa Café, Brasília. pp. 157-226.

Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 251, 1-7

Gotoh N, Tsujimoto H, Tsuda M, Okamoto K, Nomura A, Wada T, Nakahashi M and Nishi-no T. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in mexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42, 1938-1943.

Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S., & Teixeira, H. (2009). Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control*, 49(2), 114-119.

Haas, D., Defago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3, 307-319.

Helmick RA. Fletcher A.E. Gardner A.M. Gessner C.R. and Hvitved A.N. Imidazole antibiotics inhibit the nitric oxide dioxygenase function of microbial flavohemoglobin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1837-1843.

Ho BT, Dong TG and Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe* 2014; 15, 9-21.

Janssen BD, Garza-Sánchez F, Hayes CS. YoeB toxin is activated during thermal stress. *Microbiology* 2015; 4: 682-697

Joet , Laffargue A, Salmona J, Doubeau S, Descroix F, Bertrand B, Lashermes P and Dussert S. Regulation of galactomannan biosynthesis in coffee seeds. *J. Exp. Bot.* 2014; 65, 323–337

King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301-307.

Kline T, Trent MS, Stead CM, Lee MS, Sousa MC, Felise H.B, Nguyen HV and Miller SI. Synthesis of and evaluation of lipid A modification by 4-substituted 4-deoxy arabinose ana-logs as potential inhibitors of bacterial polymyxin resistance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008; 18, 1507-1510

Kloepper JW Leong, J, Teintze M and Schroth MN. *Pseudomonas* siderophores: a mecha-nism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 1980; 4, 317-320

Lashermes, P., Combes, M.C., Robert, J., Trouslot, P., D'Hont, A., Anthony, F., Charrier, A. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular Genomics and Genetics* 261, 259–266

Levy, A., Conway, J. M., Dangl, J. L., & Woyke, T. (2018). Elucidating bacterial gene func-tions in the plant microbiome. *Cell host & microbe*, 24(4), 475-485.

Levy A, Salas Gonzalez I, Mittelviefhaus M, Clingenpeel S, Herrera Paredes S, Miao J, Wang K, Devescovi G, Stillman K, Monteiro F, Rangel Alvarez B, Lundberg DS, Lu TY, Le-beis S, Jin Z, McDonald M, Klein AP, Feltcher ME, Rio TG, Grant SR, Doty SL, Ley RE, Zhao B, Venturi V, Pelletier DA, Vorholt JA, Tringe SG, Woyke T, Dangl JL. Genomic featu-res of bacterial adaptation to plants. *Nat Gen.* 2018; 50: 138-150.

Lindow SE and Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69, 1875-1883.

Linhartová I, Bumba L, Mašín J, Basler M, Osička R, Kamanová J, Procházková K, Adkins I, Hejnová-Holubová J, Sadílková L, Morová J and Sebo P. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34, 1076-1112.

Lin J, Michel LO and Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46, 2124-2131.

Liu PV and Shokrani F. Biological activities of pyochelins: iron-chelating agents of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 1978; 22, 878-890.

Locatelli, L., Tarnawski, S., Hamelin, J., Rossi, P., Aragno, M., Fromin, N. 2002. Specific PCR Amplification for the Genus *Pseudomonas* targeting the 3' Half of 16S rDNA and the whole 16S–23S rDNA Spacer. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 220-227.

Lowe, T.M., Eddy, S.R. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* 25, 955–64.

Lopes AP, Lopes LM, Fraga TR, Chura-Chambi RM, Sanson AL, Cheng E, Nakajima E, Morganti L and Martins EA. VapC from the leptospiral VapBC toxin-antitoxin module displays ribonuclease activity on the initiator tRNA. *PLoS One.* 2014; 9:e101678.

Loper JE, Hassan KA, Mavrodi DV, Davis EW 2nd, Lim CK, Shaffer BT, Elbourne LD, Stockwell VO, Hartney SL, Breakwell K, Henkels MD, Tetu SG, Rangel LI, Kidarsa TA, Wilson NL, van de Mortel JE, Song C, Blumhagen R, Radune D, Hostetler JB, , Weller DM, Thomashow LS, Allen AE, Paulsen IT. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genetics.* 2012; 8: e1002784

Loper, J. E., Kobayashi, D. Y., & Paulsen, I. T. (2007). The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: insights into biological control. *Phytopathology*, 97(2), 233-238.

Mehrabi Z, McMillan VE, Clark IM, Canning G, Hammond-Kosack KE, Preston G and Mauchline TH. *Pseudomonas* spp. diversity is negatively associated with suppression of the wheat take-all pathogen. *Sci. Rep.* 2016; 6.

Mondego, J.M., Vidal, R.O., Carazzolle, M.F., Tokuda, E.K., Parizzi, L.P., Costa, G.G., Pe-reira, L.F., Andrade, A.C., Colombo, C.A., Vieira, L.G., Pereira, G.A. 2011. Brazilian Coffee Genome Project Consortium. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC Plant Bio-logy*. 8, 11:30.

Nakazawa, T. 2002. Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ-mental Microbiology* 4, 782–786.

Naseby, D.C., Way, J.A., Bainton, N.J., Lynch, J.M. 2001. Biocontrol of *Pythium* in the pea rhizosphere by antifungal metabolite producing and non-producing *Pseudomonas* strains. *Journal of Applied Microbiology* 90, 421-429.

Nelson, K. E., Weinell, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P. et al., 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 4(12), 799-808.

Ogata, H. 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Rese-arch* 27, 29-34.

Nieto C, Chemy I, Khoo SK, de Lacoba MG, Chan WT, Yeo CC, Gazit E and Espinosa M. The yefM-yoeB toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: functional and structural correlation. *J. Bacteriol.* 2007; 189, 1266-1278

Martins D, Mesquita MQ, Neves MG, Faustino MA, Reis L, Figueira E and Almeida A. Pho-toinactivation of *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae in kiwifruit plants by cationic porphy-rins. *Planta*. 2018; 248, 409-421
 Mira A, Klasson L and Andersson SG. Microbial genome evolution: sources of variability. *Curr. Opinion Microbiol*. 2002; 5, 506-512.

Molinari S. New developments in understanding the role of salicylic acid in plant defence. *CAB Rev*. 2007; 67: 1-10

Okazaki, M., Sugita, T., Shimizu, M., Ohode, Y., Iwamoto, K., de Vrind-de Jong, E.W., de Vrind, J.P., Corstjens, P.L. 1997. Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Applied and Environmental Microbio*-logy 63: 4793–4799.

Patten, C. L., Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in deve-lopment of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8), 3795-3801.

Paulsen, I.T., Press, C.M., Ravel, J., Kobayashi, D.Y., Myers, G.S., Mavrodi, D.V., DeBoy, R.T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Gwinn, M.L., Zhou, L., Schneider, D.J., Cartinhour, S.W., Nelson, W.C., Weidman, J., WatkinsK, T.K., Khouri, H., Pierson, E.A., Pierson, L.S., Thomashow, L.S., Loper, J.E. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology* 23, 873-878.

Qi, M., Wang, D., Bradley, C. A., Zhao, Y. 2011. Genome sequence analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and subtractive hybridization-based comparative genomics with nine pseudomonads. *PLoS One* 6(1), e16451.

Roberson, E. B., Firestone, M. K. 1992. Relationship between desiccation and exopoly-saccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 58(4),1284-1291.

Rodriguez, F., Pfender, W.F. 1997. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta. *Phytopathology*, 87, 614-621.

Salgado, B. G., Macedo, R. L. G., Carvalho, V. L. D., Salgado, M., & Venturin, N. (2007). Progresso da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro consorciado com grevêlea, com in-gazeiro e a pleno sol em Lavras-MG. *Ciência e agrotecnologia*, 31(4), 1067-1074.

Santos SA, Freire CS, Domingues MR, Silvestre AJ and Neto CP. Characterization of phe-nolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59, 9386-9393

Silby, M. W., Cerdeño-Tárraga, A. M., Vernikos, G. S., Giddens, S. R., Jackson, R. W., Preston, G. M, et al.,. 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology* 10(5), R51.

Schnider-Keel U, Lejbølle KB, Baehler E, Haas D and Keel C. The Sigma Factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and os-motic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67, 5683-5693.

Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160, 47–56.

Shao, Y., He, X., Harrison, E. M., Tai, C., Ou, H. Y., Rajakumar, K., Deng, Z. 2010. mGe-nomeSubtractor: a web-based tool for parallel in silico subtractive hybridization analysis of multiple bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 38 (suppl 2), W194-W200.

Shiomi, H. F., & de Almeida MINHONI, M. T. (2008). Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. *Scientia Agraria*, 9(4), 535-538.

Shrivastava S. and Mande SS. Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes. PloS One 2008; 3(8): e2955.

Stashenko EE, Martínez JR, Cárdenas-Vargas S, Saavedra-Barrera R, and Durán DC. GC–MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. J Sep Sci. 2013; 36: 2901-2914.

Siguier, P., Pérochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: the re-ference centre for bacterial insertion sequences. Nucleic acids research, 34(suppl_1), D32-D36.

Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lot-te L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, van Overbeek L, Brar D, van Elsas JD, Reinhold-Hurek B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. Mol. Plant-Microbe Interact. 2012; 25, 28-36

Sousa, LP de, Silva. M.J. 2012. Differential growth of *Jatropha curcas* L. by different strains of endophytic *Bacillus* sp. International Research Journal of Agricultural Science 8, 306-311.

Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., Barac, T., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. Applied and Environmental Microbiology 75, 748–757.

Torres-Rubio, M. G., Valencia-Plata, S. A., Bernal-Castillo, J., Martínez-Nieto, P. 2000. Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. and Pseudomonas sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from colombian rice rhizosphere. Revista Latinoamericana de Microbiología 42(4), 171-176.

Tran, H. T., Lee, L. S., Furtado, A., Smyth, H., & Henry, R. J. (2016). Advances in genomics for the improvement of quality in coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(10), 3300-3312.

Vasil ML, Ochsner UA. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics biochemistry and virulence. *Mol Microbiol*. 1999; 34: 399-413.

Vega, F. E., Pava-Ripoll, M., Posada, F., Buyer, J. S. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal of Basic Microbiology* 45(5), 371-380.

Verhagen, B. W., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H. S., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(8), 895-908.

Vodovar N, Vallenet D, Cruveiller S, Rouy Z, Barbe V, Acosta C, Vacherie B. Complete ge-nome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseu-domonas entomophila*. *Nature Biotech*. 2006; 24: 673-679.

Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Rev Microbiol*. 2012; 10: 828-840.

Wang CH, Zhang C, Xing XH. Xanthine dehydrogenase: an old enzyme with new knowledge and prospects. *Bioengineered*. 2016; 7: 395-405.

Wery J, Hidayat B, Kieboom J, de Bont JA. An insertion sequence prepares *Pseudomonas putida* S12 for severe solvent stress. *J Biol Chem*. 2001; 276: 5700-5706

Woolfolk CA. Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *J Bacteriol*. 1975; 123: 1088-1106.

Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., & van der Lelie, D. (2011). Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Reviews* 35(2), 299-323.

Yadav RK, Karamanoli K, Vokou D. Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microb Ecol.* 2005; 50: 185-196

Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.

9. Apêndices

Filogenômica

TYGS gerado a partir dos genomas sequenciados. Na primeira imagem tem-se o veredicto do software quanto o carácter novo ou não da espécie estudada. No presente caso o software acusou “potencial new species” para as três *Pseudomonas*. Na segunda imagem tem-se a árvore filogenética com os isolados e espécies aparentadas.

Para MNR3A



TYPE (STRAIN)
GENOME SERVER

JOB SUMMARY

PRINT DATE: 2020-01-24 12:33:38 +0100

JOB ID: 813b6cbe-79e4-49e1-a73a-c75c169ae335

RESULT PAGE: https://tygs.dsmz.de/user_results/show?guid=813b6cbe-79e4-49e1-a73a-c75c169ae335

Table 1: Phylogenies

Publication-ready versions of both the genome-scale GBDP tree and the 16S rRNA gene sequence tree can be customized and exported either in SVG (vector graphic) or PNG format from within the phylogeny viewers in your TYGS result page. For publications the **SVG format is recommended** because it is lossless, always keeps its high resolution and can also be easily converted to other popular formats such as PDF or EPS. Please follow the link provided above!

Table 2: Identification

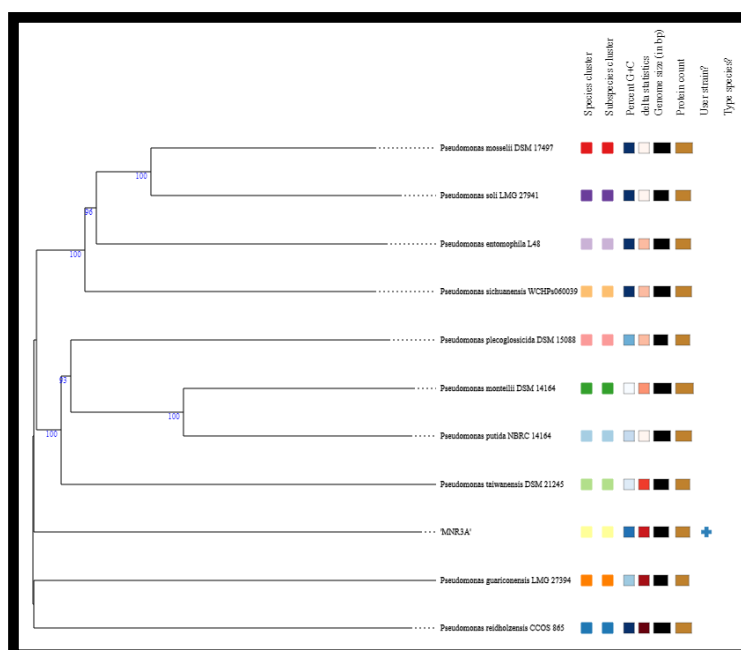
The below list contains the result of the TYGS species identification routine.

Explanation of remarks that might occur in the below table:

remark [R1]: The TYGS type strain database is automatically updated on an almost daily basis. However, if a particular type strain genome is not available in the TYGS database, this can have several reasons which are detailed in the FAQ. You can request an extended 16S rRNA gene analysis via the 16S tree viewer found in your result page to detect **not yet genome-sequenced** type strains relevant for your study.

remark [R2]: > 70% dDDH value (formula d_d) and (almost) minimal dDDH values for gene-content formulae d_g and d_s indicate potentially unreliable identification result and should thus be checked via the 16S rRNA gene sequence similarity.

Strain	Conclusion	Identification result	Remark
'MNR3A'	potential new species		see [R1]



EMN2

TCGG
TYGS
TTGG

TYPE (STRAIN)
GENOME SERVER

JOB SUMMARY

PRINT DATE: 2020-01-24 12:36:28 +0100

JOB ID: 523d77c9-6f58-4f22-a4e4-09e9b09965fa

RESULT PAGE: https://tygs.dsmz.de/user_results/show?guid=523d77c9-6f58-4f22-a4e4-09e9b09965fa

Table 1: Phylogenies

Publication-ready versions of both the genome-scale GBDP tree and the 16S rRNA gene sequence tree can be customized and exported either in SVG (vector graphic) or PNG format from within the phylogeny viewers in your TYGS result page. For publications the **SVG format is recommended** because it is lossless, always keeps its high resolution and can also be easily converted to other popular formats such as PDF or EPS. Please follow the link provided above!

Table 2: Identification

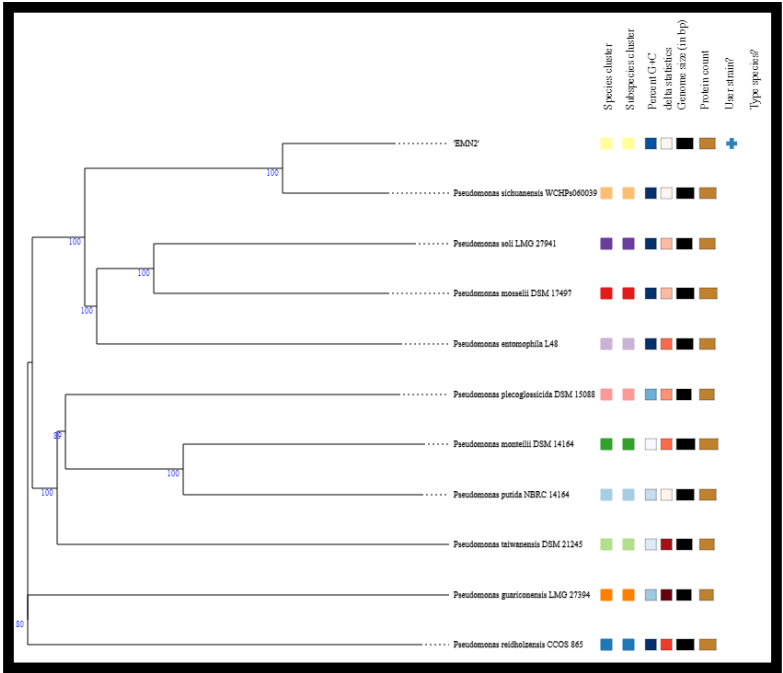
The below list contains the result of the TYGS species identification routine.

Explanation of remarks that might occur in the below table:

remark [R1]: The TYGS type strain database is automatically updated on an almost daily basis. However, if a particular type strain genome is not available in the TYGS database, this can have several reasons which are detailed in the FAQ. You can request an extended 16S rRNA gene analysis via the 16S tree viewer found in your result page to detect **not yet genome-sequenced** type strains relevant for your study.

remark [R2]: > 70% dDDH value (formula d_s) and (almost) minimal dDDH values for gene-content formulae d_g and d_i indicate potentially unreliable identification result and should thus be checked via the 16S rRNA gene sequence similarity.

Strain	Conclusion	Identification result	Remark
EMN2	potential new species		see [R1]



MN1F

TYGS

TYPE (STRAIN)
GENOME SERVER

JOB SUMMARY

PRINT DATE: 2020-01-24 12:31:22 +0100

JOB ID: 5bb3a2c2-e572-46d7-be4b-58938cfe5667

RESULT PAGE: https://tygs.dsmz.de/user_results/show?guid=5bb3a2c2-e572-46d7-be4b-58938cfe5667

Table 1: Phylogenies

Publication-ready versions of both the genome-scale GBDP tree and the 16S rRNA gene sequence tree can be customized and exported either in SVG (vector graphic) or PNG format from within the phylogeny viewers in your TYGS result page. For publications the **SVG format is recommended** because it is lossless, always keeps its high resolution and can also be easily converted to other popular formats such as PDF or EPS. Please follow the link provided above!

Table 2: Identification

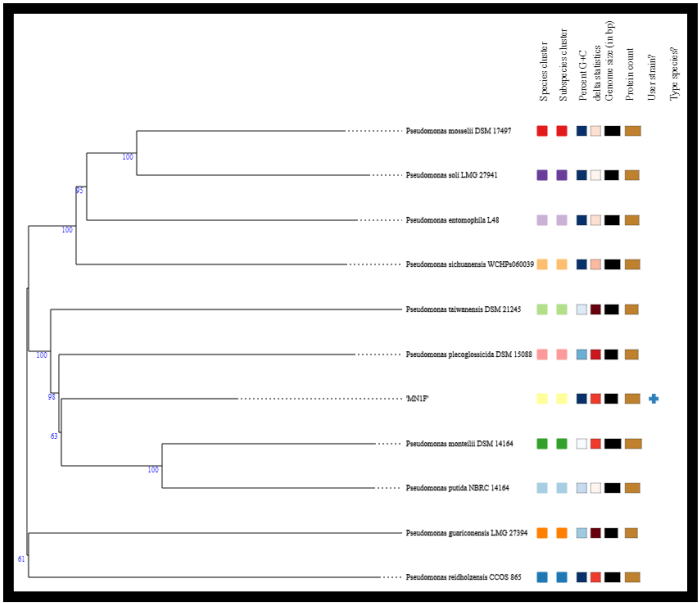
The below list contains the result of the TYGS species identification routine.

Explanation of remarks that might occur in the below table:

remark [R1]: The TYGS type strain database is automatically updated on an almost daily basis. However, if a particular type strain genome is not available in the TYGS database, this can have several reasons which are detailed in the FAQ. You can request an extended 16S rRNA gene analysis via the 16S tree viewer found in your result page to detect **not yet genome-sequenced** type strains relevant for your study.

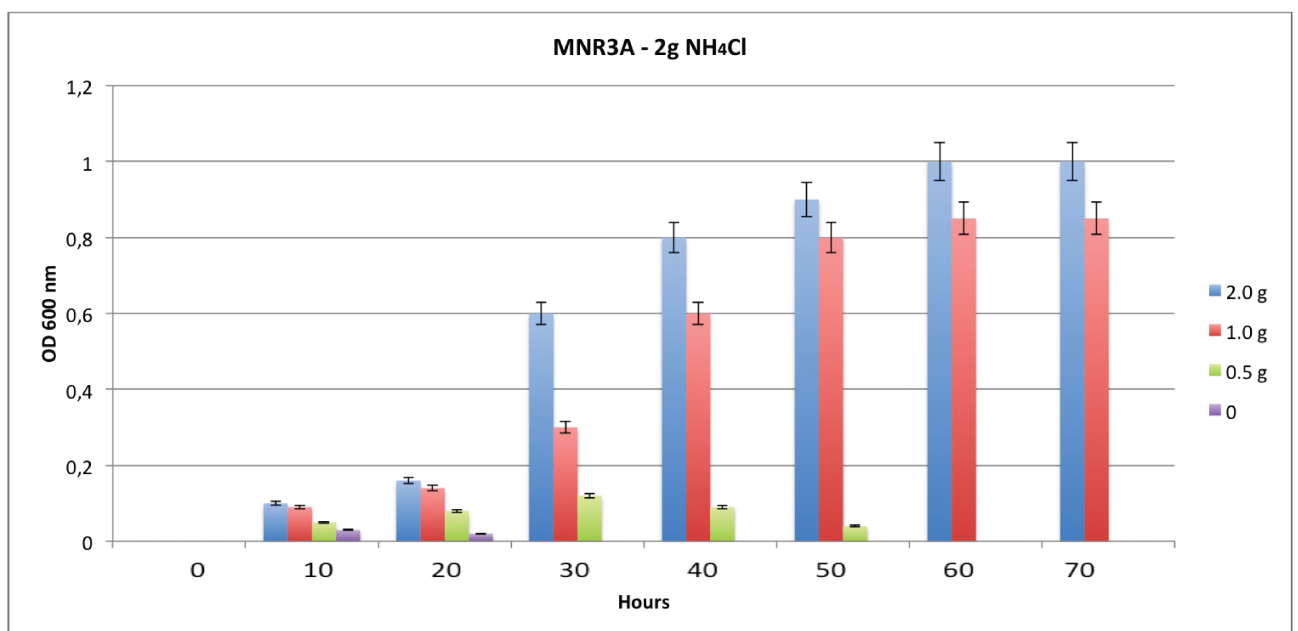
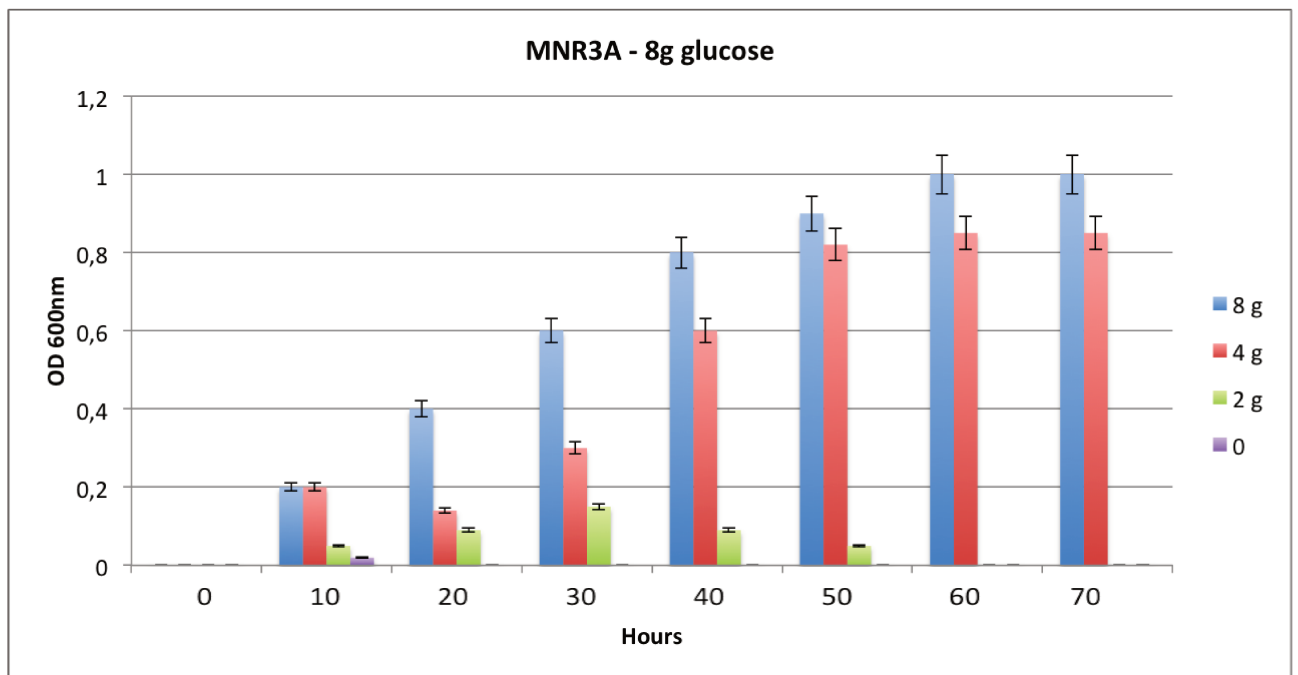
remark [R2]: > 70% dDDH value (formula d_d) and (almost) minimal dDDH values for gene-content formulae d_g and d_s indicate potentially unreliable identification result and should thus be checked via the 16S rRNA gene sequence similarity.

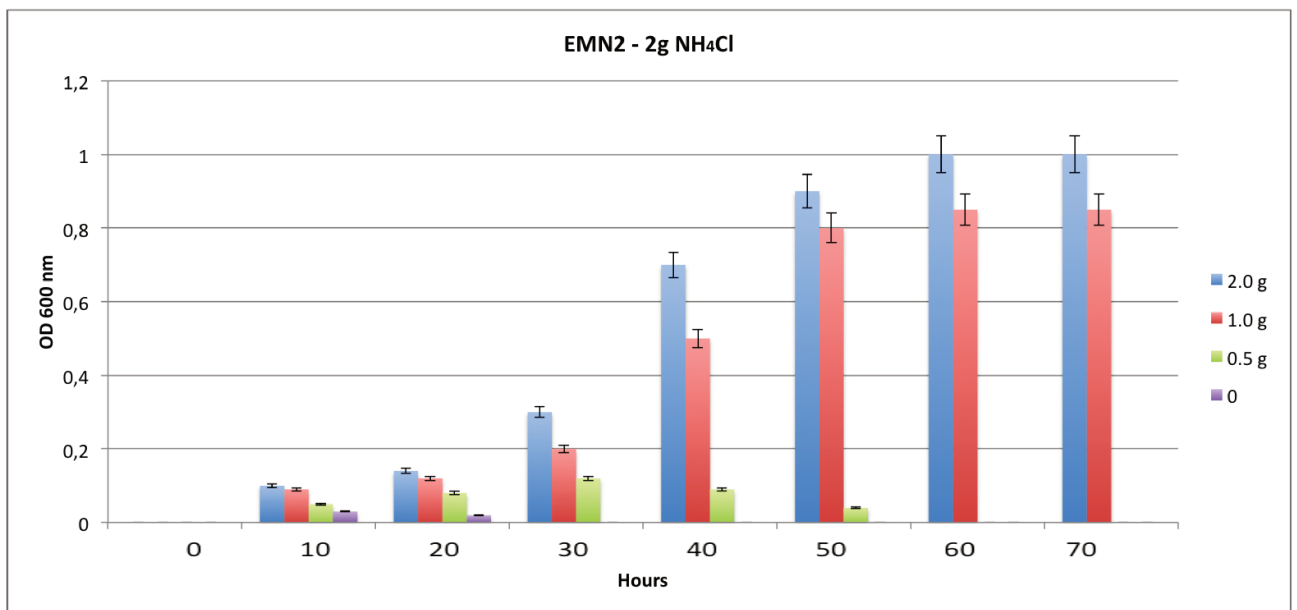
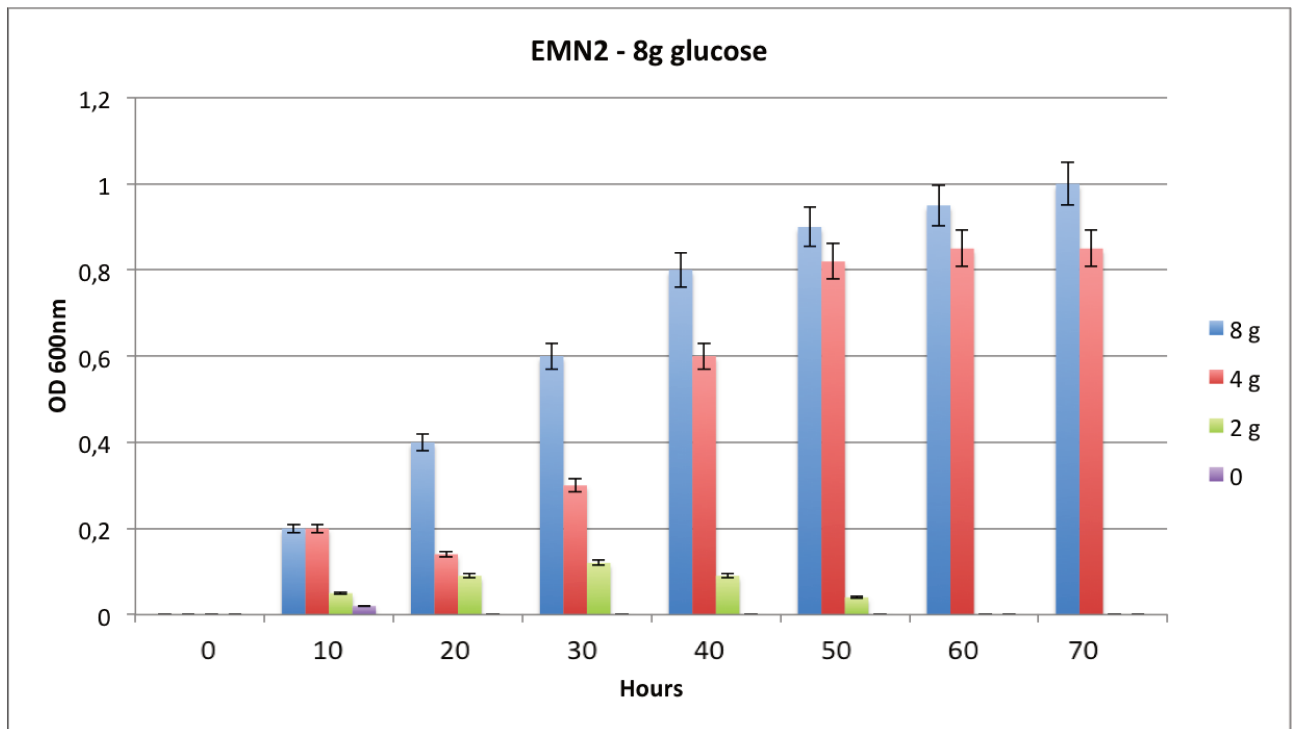
Strain	Conclusion	Identification result	Remark
MN1F	potential new species		see [R1]

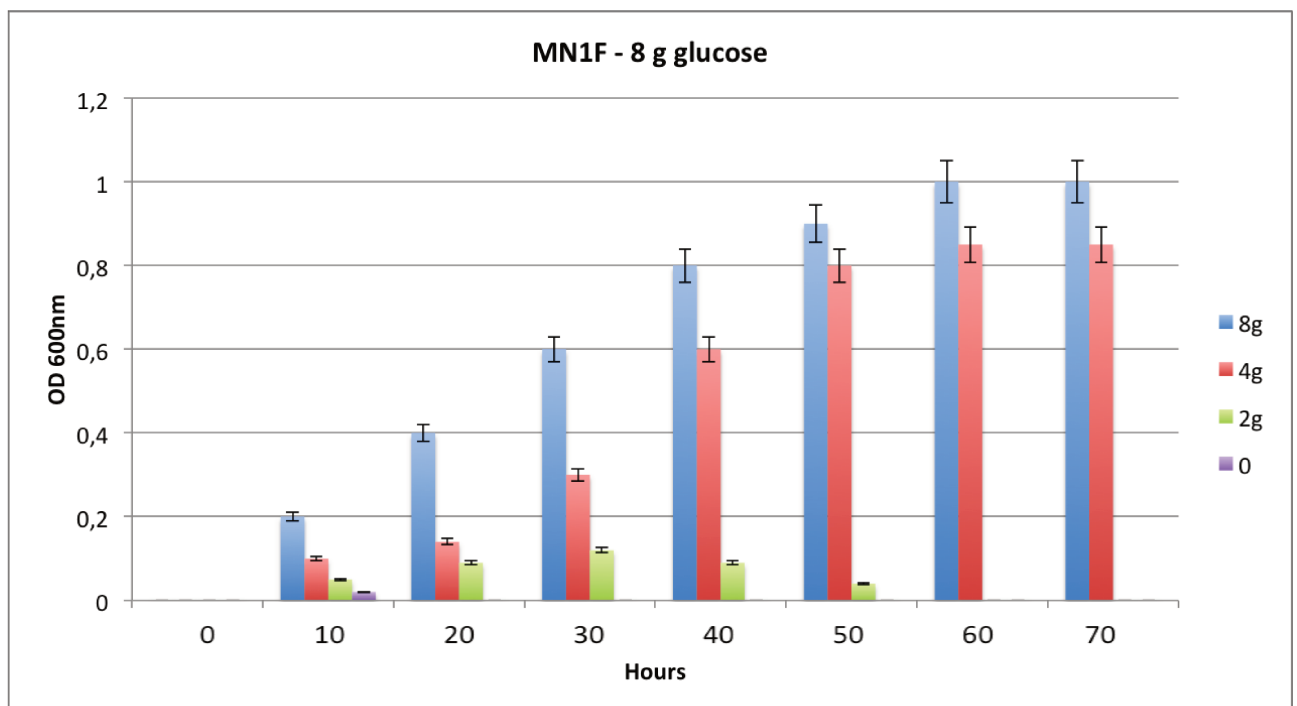
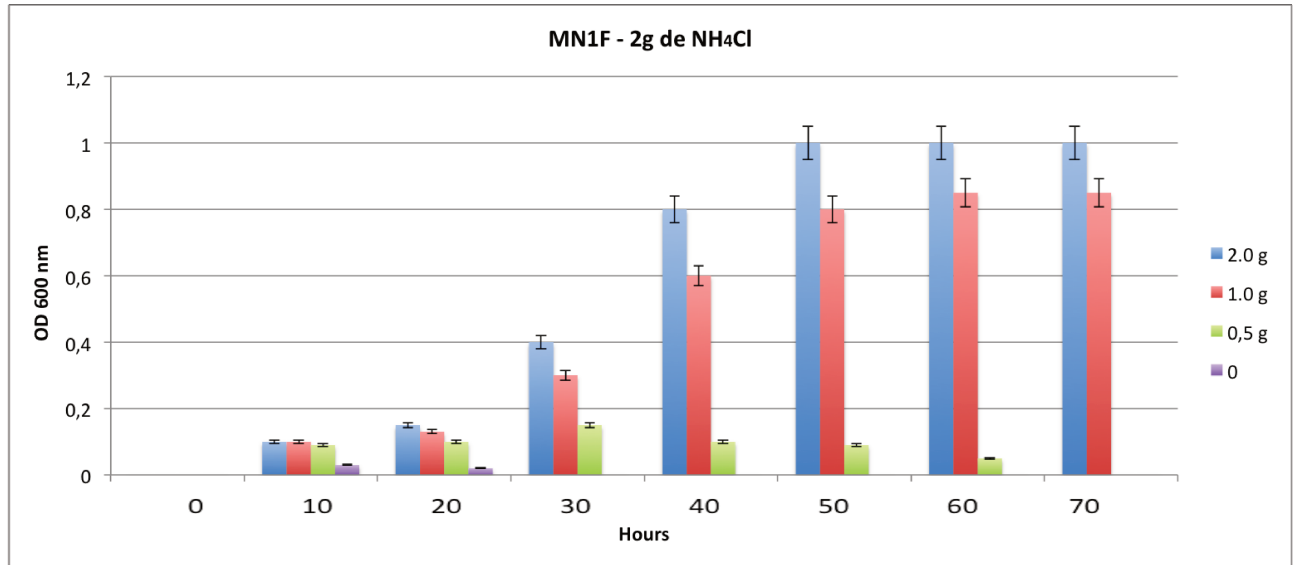


Uso da cafeína como fonte de carbono e nitrogênio

A fim de verificar a habilidade das *Pseudomonas* em incorporar a cafeína como fonte de carbono e nitrogênio, crescemos as bactérias em meios com glicose e NH_4Cl como fontes primárias e com concentrações variando 0 até 2g/L para NH_4Cl e de 0 até 8g/L para glicose, fixando a concentração de cafeína. O intuito foi induzir as células a “substituírem” glicose e NH_4Cl pela cafeína como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente, o que não ocorreu.







Artigo submetido na revista BMC Microbiology referente a tese

Functional genomics analysis of *Pseudomonas spp* bacteria associated with three habitats of coffee plants

Leandro Pio de Sousa^{1,2}, Matheus Aparecido Pereira Cipriano¹, Marcio José da Silva³, Sueli dos Santos Freitas¹, Marcelo Falsarella Carazzolle⁴, Jorge Maurício Costa Mondego¹

¹ Instituto Agronômico de Campinas, IAC, Campinas, SP, Brazil.

²UNICAMP, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Campinas, SP, Brazil.

³ UNICAMP, CBMEG, Campinas, SP, Brasil.

⁴UNICAMP, Instituto de Biologia, Laboratório de Genômica e Expressão, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author: Jorge M. C. Mondego. E-mail: jmcmondego@iac.sp.gov.br; jmcmondego@gmail.com

Abstract

Background

Pseudomonas spp. promotes plant growth and colonizes a wide range of environments. During the annotation of a *Coffea arabica* ESTs database, we detected a considerable number of *Pseudomonas* sequences in all plant tissues. Three bacterial strains of *Pseudomonas* were isolated, one from leaf surface (MN1F), one from rhizospheric soil (MNR3A), and one from roots (EMN2) of *C. arabica* plants.

The genomes of the three isolates were sequenced to investigate genomic differences that could offer insights about bacterial adaptation to coffee environment and to its different plant habitats. In parallel, bench experiments were performed to confirm genomic analyses results.

Results

Genes identified from the MN1F isolate suggest that it has adapted to the abiotic stresses of the leaf surface environment, which we confirmed by osmotic stress and iron-deprivation experiments. Interestingly, EMN2 has achromobactin and aerobactin siderophore receptors, but does not have the genes responsible for the production of these siderophores, suggesting an interesting competition strategy. All three bacteria were able to promote growth of lettuce plants, most especially MNR3A. Interestingly, MN1F was able to colonize plant leaves after seed bacterization, suggesting a specific ability to adhere to the epicotyl during germination. Furthermore, the three bacterial isolates were able to degrade and catabolize plant phenolic compounds for their own benefit. Surprisingly, the three bacteria did not contain caffeine methylases that are responsible for the catabolism of caffeine. In fact, experiments confirmed that the bacteria do not metabolize caffeine, but are resistant and chemically attracted to it.

Conclusion

Genetic analysis and the relationship between the gene content with experimental data suggest that there are adaptations of these bacteria to live in association with coffee plants.

Keywords: Coffee, Genomics, *Pseudomonas*, Plant Growth Promoting Bacteria, Caffeine

Background

Bacteria are ubiquitous on Earth and can be found in virtually every environment. A large number of bacterial species are found in plants, not only in the rhizosphere, but also in the internal tissues of plants and on their surfaces, notably leaves, flowers, fruits, and seeds [1]. There is an extensive list of bacterial genera that colonize plants. Several studies using either independent [2] or non-independent [3] cultivation approaches show that *Pseudomonas* spp. have a remarkable presence

in plant tissues. Bacteria of the genus *Pseudomonas* comprise a very diverse group of microorganisms that can be isolated from different environments including, but not limited to, fresh water, salt water, soil, the internal tissues of plants, and food [4]. *Pseudomonas* spp. also benefits their host by producing auxins and siderophores, which improve plant growth and development by increasing yield, mediating resistance against other pathogens and providing competitive advantages [5]. As a result, these bacteria have been recognized as potential tools for the development of biofertilizers for agriculture [6]. Moreover, due to their wide distribution and agronomical and ecological importance, *Pseudomonas* genomes have been the target of several studies [7, 8, 9, 10]. Comparisons between *Pseudomonas* genomes have gained increased interest due to the availability of the hundreds of genomes from different isolation sources including water, soil, food as well as various hosts [11, 12, 13].

Pseudomonas have been detected in coffee tissues [14]. Moreover, during annotation of the coffee expressed sequence tag (EST) database for the Brazilian Coffee Genome Project (BCGP; [15]), *Coffea arabica* was found to contain a large amount of ‘contaminant’ bacterial sequences, most of which belonged to *Pseudomonas* spp. (data not shown). In this study, to expand our knowledge of the *Pseudomonas*-coffee interaction, we isolated and sequenced the genomic DNA of three *Pseudomonas* isolates from three plant regions: the rhizosphere, the endophytic part of the root, and leaf surface. Annotation of the bacterial genomes and experiments hereby described provide insights about their adaptation to coffee tissues.

Results

Isolation and identification

Bacteria were isolated from Rhizospheric soil, roots, and leaves of one-year old plant of *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62, which was collected at the Santa Elisa farm of the Agronomic Institute of Campinas (IAC; Campinas, Brazil, 22°53' S 47°5' W, 664 m a.s.l.). Details of the isolation are in material and methods. Sixteen bacterial colonies were isolated and cultivated on King's B medium (six from rhizosphere soil, six from internal parts of roots, and four from the leaf surface). After

extracting DNA from these bacterial isolates, amplification and sequencing of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region showed that all isolates belonged to the genus *Pseudomonas* (data not shown). An isolate from each region of the plant was selected for the study and named according to each region—MNR3A from rhizosphere soil, EMN2 from the roots, and MN1F from the leaf surface.

Bacterial sequencing was performed using Illumina technology. Table 1 shows overall genomic data. After trimming and assembly, genome length (number of bases) was estimated at 5.6 mega base pairs (Mbp) for MNR3A (Rhizospheric strain), 5.8 Mbp for EMN2 (Endophytic strain), and 6 Mbp for MN1F (Phyllospheric strain). Phylogenomics analyses according to TYGS (Type Strain Genome Server) suggested that all strains belong to the genus *Pseudomonas* but are of unknown species (Additional files 1, 2 and 3). Identification and taxonomical analyses of the three *Pseudomonas* will be performed and published elsewhere.

The Venn diagram in Fig. 1a shows a comparative analysis of the shared genetic content among the three bacterial isolates studied. The diagram shows that 3,215 genes are shared by the three isolates, corresponding to approximately 60% of the genes in each isolate. Twelve percent of the genes are unique to each isolate (~610 genes) and the remaining genes are shared by two of the three isolates. The ontological annotation (subsystem feature distribution) of the genes was analyzed as histograms (Fig. 1b). There were no significant differences in the number of genes annotated for each subsystem in each *Pseudomonas* isolate.

Insertion sequences (ISs) were detected by ISFinder [16] in MN1F and EMN2 (E value less than e^{-100}). No ISs were found in MNR3A. Most ISs identified were from *Pseudomonas* species. For instance, the MN1F isolate was found to have eight ISs with ISPsy5 originating from *P. syringae* str. DC3000 contributing 33 copies. The EMN2 isolate contained 10 ISs without additional copies.

Iron acquisition

Genome annotation indicated the presence of 31 genes responsible for synthesis of pyoverdines. The annotation also showed that the three *Pseudomonas* isolates had approximately the same number of genes, ranging from 49 to 55, involved in pyoverdine-independent iron uptake—some of which vary in copy number—specifically the production of hemin [17]. RAST structural genomics annotation indicated that EMN2 has two genes encoding siderophore receptors

without having genes that encode the corresponding siderophores; *iutA* encoding an aerobactin receptor (2418 bp; 806 amino acids) (Fig. 2a) and *Psyr_2582* encoding a TonB-dependent achromobactin receptor (2412 bp; 804 aa (Fig. 2b). In general, the achromobactin operon contained the *AcsF*, *AcsD*, and *AcsE* responsible for achromobactin biosynthesis, which is absent in EMN2. *iutR* gene encoding the *iutA* repressor was also absent, suggesting that the aerobactin receptor might be constantly expressed (Fig. 2a). A similar situation is seen with the aerobactin operon, whose corresponding biosynthesis genes (*iucA*, *iucB*, *iucC*, and *iucD*) were absent in EMN2 (Fig. 2b). Iron limitation assay with EDTA as an iron chelating agent showed that MN1F was the isolate that performed the best in terms of iron restriction (Fig. 3). Siderophore production test on Blue Agar CAS medium showed that M1NF produced a halo of $3.5 \pm 0,2$ mm, EMN2 $3 \pm 0,1$ mm and MN1F $2.1 \pm 0,5$ mm.

Resistance to stress

We identified a series of genes that may be involved in stress-resistance mechanisms. We found two genes encoding proteins associated with nitric oxide metabolism, which are conserved in the three *Pseudomonas* isolates: Nitric oxide dioxygenase (*NOD*) that catalyzes the conversion of nitric oxide to nitrate and nitric oxide reductase transcription regulator (*NorR*). These genes may play a role in stress tolerance [18,19]. EMN2 contains a gene encoding a protein of the Rhodanese family, which is responsible for protecting the cell against cyanide-induced damage [20]. Additionally, genes of the toxin-antitoxin (TA) systems *vapB/C* and *YoeB/M*, both related to bacterial stress [21,22], were only found in MN1F.

Since exopolysaccharide (EPS) is involved in regulating mechanisms that promote tolerance to desiccation in bacteria and fungi [23], we measured EPS production at increasing osmotic pressure. MN1F responded to induced drought stress by producing large amounts of EPS with the highest yield (blue bars, > 10 g/L at high PEG concentrations) among the three bacterial isolates (Fig. 4). MNR3A produced the lowest yield of EPS (Fig. 4)

Secretion systems

Type I and type VI secretion systems (T1SS and T6SS) were identified in the three genomes. T1SS is involved in the transport of a diverse set of proteins to the extracellular environment, including toxins, adhesins and nutrient-scavenging

proteins, whereas T6SS is responsible for the secretion of effector proteins to eukaryotic or prokaryotic cells [24]. We found T1SS in the three isolates consisting of a Lap cluster (*LapB*, *C*, *D*, and *E*) and RXT protein, which play important roles in nodulation, toxin production, and lipase activity [25]. In addition, we found one complete T6SS gene cluster in MNR3A and MN1F and one incomplete gene cluster in the EMN2 isolate, which lacks the *hcp* gene that encodes an essential component of the machinery [26].

Antibiotics, bacteriocins, and defense against competing microorganisms

We searched for genes involved in bacterial defense against microorganisms and identified a beta-lactamase (BL) gene and three copies of the *blaI* repressor gene in MN1F. The *ArnT* gene and the polymyxin operon *PmrJ/PmrL/PmrM*, involved in the resistance to the antibiotic polymyxin [27] were also identified in MN1F. In addition, MN1F was found to have a gene cluster related to the production of colicin V, a peptide bacteriocin that kills sensitive cells by destroying the plasma membrane [28]. Conversely, in EMN2 and MNR3A, multidrug resistance genes, *CmeA/B* and *MexC/D*, which encode efflux pump proteins responsible for extruding antimicrobial agents out of bacterial cells, were identified [29, 30]. No genes encoding efflux pump proteins were identified in MN1F. Moreover, genes involved in the production of non-ribosomal peptides (NRPS) and bacteriocins were identified in all three isolates; two bacteriocins and two NRPS in MN1F, six bacteriocins and seven NRPS in EMN2, and four bacteriocins and six NRPS in MNR3A.

Indoleacetic acid (IAA) synthesis, ACC deaminase, and plant growth promotion

We identified genes that are responsible for the synthesis of auxin, with tryptophan as a precursor in the three isolates. A copy of the gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, which catalyzes the reaction $\text{AAC} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{2-oxobutanoate} + \text{NH}_3$, was also found. ACC acts as a precursor in the synthesis of ethylene, an important plant hormone involved in plant senescence and ripening [31]. IAA production and ACC activity were confirmed by *in vitro* assays (Additional table 1).

We performed a plant growth promotion experiment using lettuce as a heterologous model because coffee seeds do not uniformly germinate and have a slow germination rate (about 60 days). Bacterization of lettuce seeds showed the

greatest growth results when MNR3A was inoculated alone, resulting in weight growth for both root and shoot systems (increase of 67% and 9% in the root and shoot, respectively). These results are similar to what was observed following treatment with the growth promoting bacterium *Bacillus megaterium* (Fig 5a; Table 2). When other isolates colonized the rhizosphere they also demonstrated an ability to promote plant growth, even with *Pseudomonas* being isolated initially from root or phyllosphere (Fig. 5a; Table 2). Determination of bacterial viability by CFU analysis also revealed antagonism between *Pseudomonas* isolates, most especially between MN1F and EMN2, and MN1F and MNR3A (Table 2). In addition, using specific *Pseudomonas* primers, we detected colonization of the rhizosphere root and lettuce leaves via PCR, confirming CFU analysis (data not shown).

Degradation of phytochemicals

We searched for genes that are involved in the degradation of aromatic phytochemicals commonly found in coffee plants, such as the phenolic- like chemicals caffeine, benzoate, quinate, and cinnamate [32, 33, 34]. In addition, we searched for genes involved in the degradation of salicylate, an important indicator of the plant immune response and crucial for the interaction between bacteria and plants [35]. We observed that MN1F and EMN2 possess the genetic machinery required for the breakdown of benzoate, quinate, cinnamate, and salicylate. On the other hand, MNR3A lacks the *Ben A, B, C, and D* genes responsible for the initial degradation of benzoate and the *QuiA, B2, and C* genes responsible for the initial degradation of quinate. The interconnection between these degradation systems culminates with the formation of acetyl-CoA, a precursor for citrate synthesis (Fig. 6a). The degradation pathways of benzoate and salicylate converge on the conversion into catechol by *BenD* and *SH* enzymes respectively. The quinate pathway converges on the benzoate pathway through the formation of 3-oxoadipate-enol-lactone, but the reverse may also occur when the benzoate pathway (via 4-hydroxy benzoate) converges to the quinate pathway. These three pathways end at acetyl-CoA. The cinnamate pathway, however, does not interconnect with any other and is incorporated into the citrate cycle, ending at fumarate rather than acetyl-CoA (Fig. 6a).

To verify whether there is in fact degradation of the phytochemicals and their subsequent incorporation into citrate cycle, quinate, benzoate, cinnamate,

salicylate, and acetate were measured by HPLC, throughout bacterial growth containing quinate, benzoate, cinnamate or salicylate as unique carbon source (Fig 6b). As expected from the annotation, MN1F and EMN2 are able to degrade all phytocompounds tested, and likely incorporate them into the citrate cycle (Fig. 6b) . Conversely, MNR3A did not even grow in medium with benzoate and quinate as a carbon source (Fig. 6b).

We searched for genes related to caffeine metabolism. Despite containing genes encoding four subunits of xanthine dehydrogenase, *XDHFeS*, *XDHFAD*, *XDHMo*, and *xdhC*, which catalyzes the oxidation of caffeine to 1,3,7-trimethyluric acid [36], the three bacteria do not contain caffeine N3 demethylase neither caffeine N1 demethylase [36]. To check the accuracy of the genome annotation, we performed a caffeine degradation assay similar to that of quinate, benzoate, cinnamate and salicylate. However, bacteria were not able to grow in minimal medium at which caffeine was the only carbon or nitrogen source (data not shown). We also conducted experiments adding caffeine as a secondary source of carbon and nitrogen, to see whether caffeine could be used after the consumption of glucose and NH₄Cl, respectively. The concentration of caffeine was fixed (2.0 g/L), while glucose and NH₄Cl were added in different final concentrations (see material methods). In both situations, the bacteria were unable to grow after the consumption of the primary sources (Fig. 7).

We performed a chemotaxis assay to evaluate the chemotactic affinity of EMN2, MNR3A, and MN1F for caffeine. The three *Pseudomonas* isolates, but not the negative control (*Escherichia coli*), showed positive chemotaxis to caffeine (Supplementary table 1). In addition, we evaluated the resistance of these bacteria against caffeine. We added different caffeine concentrations (0.8, 2, 3, 6, 10, 15 g/mL) and measured bacterial growth after 8 hours of incubation. All *P. putida* bacteria were more resistant to caffeine than *E. coli* control (Fig. 8). MN1F was the most resistant, followed by MNR3A and EMN2 (Fig. 8).

Horizontal gene transfer

To identify possible horizontal transfer events between plants and bacteria, HGT analysis was performed according to published methods [37]. We found five DNA sequences (three from MNR3A, one from MN1F, and one from EMN2) that are shared between these *Pseudomonas* genomes and plants. Surprisingly, none of the

sequences exhibited the highest similarity to coffee. These genes were annotated as a hypothetical protein (EMN2; 53% identity with *Ricinus communis*), small conductance mechanosensitive channel (MNR3A; 62% identity with *R. communis*), RING finger protein (MNR3A; 68% identity with *Corchorus olitorius*), GABA permease (MN1F; 50% identity with *Cajanus cajan*), and aldehyde dehydrogenase (MNR3A; 50% identity with *Selaginella moellendorffii*).

Discussion

In this work, we used high-throughput sequencing technology to perform genome-wide surveys of three *Pseudomonas* isolates from distinct *C. arabica* environments (i.e. rhizosphere, root, and leaf surface), searching for clues that explain the preferences of each isolate by the different environments of the host.

We found that there was approximately 60% sequence similarity between the genomes. This is consistent with previous comparisons of *P. fluorescens* genomes [38,39], showing high potential for genomic exchanges, which explains why *Pseudomonas* species are found in many environments. The presence of insertions within the sequences can be related to habitat adaptation. In fact, ISs play a key role in adaptation to stress [40].

The sequestration of free iron by siderophores such as pyoverdine [41] is one of the most remarkable traits of *Pseudomonas* [42]. MN1F and EMN2 produce more siderophores than MNR3A as seen in halo test (Supplementary table 1). This data agrees with iron-limited growth tests in which MN1F performed the best in, followed by EMN2 and MNR3A (Fig. 2). In comparison to the rhizosphere bacteria, both MN1F and EMN2 populate iron-limited habitats on the leaf surface and root inner tissue, respectively, which can explain the increased siderophore production. Interestingly, EMN2 contains two receptors for the alternative siderophores aerobactin and achromobactin (Fig. 2), despite the absence of genes for their synthesis and repression. This may suggest that EMN2 sequesters iron-scavenging compounds produced by other bacteria, thus competing for iron in the endophytic environment [43]. Similar strategy has not been fully described for plant-associated bacteria, but is well known in animal pathogens such as *P. aeruginosa* [44, 45, 46, 47, 48] acting as a 'virulence-like' factor improving invasion and colonization of the host.

Bacteria associated with plants suffer from various stresses, both biotic and abiotic [49]. Drought stress resistance tests indicated that MN1F had the most osmotic resistance (Fig. 4). In fact, the leaf surface is a stressful environment, which is exposed to insolation, drought and flooding stress [50]. MN1F has resistance mechanisms to abiotic stress such as the toxin-antitoxin systems *vapB/C* and *YoeB/M*. The *VapB/C* protein family, the most abundant toxin-antitoxin system encoded by prokaryote genomes, plays an important role in heat-shock-response [51]. *YoeB/M* also has ribonuclease activity and serves as a toxin to other bacteria, causing severe inhibition of cell growth [52].

Coffee plants are known to produce a myriad of phenolic compounds, some of which are responsible for the typical aroma and flavor of the beverage [53]. These compounds were also found to protect the plants against photodamage [54]. In addition, it has been suggested that phenolic compounds present in the leaves alter the composition of the endogenous microbiota because they defend the plant against microorganisms [55]. EMN2 and MN1F contain genes encoding enzymes from the degradation pathways of cinnamate, salicylate quinate and benzoate, whereas MNR3A only degrades cinnamate and salicylate (Fig. 6b). In addition, there is a convergence between these degradation pathways leading to the formation of intermediates in the citrate cycle, which is involved in generating energy (Fig. 6a). We showed this in the detection of acetate synthesis (Fig. 6b). Thus, the degradation of phenolic compounds would not only protect the bacteria from their deleterious effects, but also contribute to the metabolism of carbohydrates.

Ability of MN1F and MNR3A to degrade salicylate, is in accordance with genomic data that revealed that these isolates contain genes encoding the enzyme salicylate hydroxylase, which is responsible for the conversion of salicylate to catechol [56]. The presence of this enzyme in microorganisms associated with plants is important for evasion of the plant defense system [57]. Salicylic acid (SA), an important hormone in plant defense, mediates plant-pathogen relationships by inducing the production of pathogenesis-related proteins (PRs) and contributing to systemic acquired resistance. The lack of salicylate hydroxylase in the EMN2 genome is surprising, since these bacteria is able to degrade SA (Fig. 6b).

We expected to find evidence of the use of caffeine in *P. putida* studied herein. Surprisingly, we did not find the genes encoding caffeine demethylases, responsible for the first steps of caffeine catabolism. In fact, the three bacteria were unable to

grow in minimal medium containing caffeine as the unique carbon source, and also as secondary source of carbon and nitrogen (Fig. 7). Previous analyses have shown that *Pseudomonas* degrade caffeine, especially in soils under coffee trees [58], and that are attracted to caffeine. The bacteria studied herein have positive chemotaxis to caffeine and are tolerant to caffeine (Fig. 8) (Fig. 8). Following the scenario that MN1F, MNR3A and EMN2 do not metabolize caffeine but tolerate and are attracted to caffeine, we hypothesize that the bacteria analyzed herein may be able to live in environments with high caffeine content and be attracted by the molecule as a 'colonization sensor', but avoiding its internalization by some kind of extrusion mechanism.

As the coffee seeds take a long time to germinate and do not have a uniform germination, we decided to use lettuce for a plant-growth promotion experiment. MNR3A increased more root and shoot growth than other isolates (Fig 5a), although EMN2 and MN1F also demonstrated an ability to colonize the rhizosphere and promote biomass increase (Fig. 5). This suggests that rhizosphere does not require strict specificity of bacteria-host and instead depends on more general *Pseudomonas* abilities to colonize plant surface (e.g. biofilm formation). Intriguingly, the ability to promote plant growth decreases when bacteria are inoculated in pairs and disappear when all three are inoculated together. We suggest that this phenomenon may be the result of a highly competitive environment, where more than one isolate will harm the growth of all the others which is also detrimental to the beneficial effects of the plant. In fact, recently metagenomic data has shown that increasing bacterial diversity in the rhizosphere negatively affects growth, perhaps due to competition [59].

Conclusion

Our study demonstrates the value of comparative genomics for surveying intra-specific genetic variation among three *Pseudomonas* strains isolated from different parts of *C. arabica*. We showed that genomic differences may reflect different survival strategies of bacteria in their host plant, especially MN1F due to the peculiarities of its leaf habitat. The EMN2 and MNR3A gene content suggest that the rhizosphere/root is a more competitive environment than the leaf surface, which is supported by the fact that leaf surface habitats are less populated because of their lack of resources [50]. Nevertheless, MN1F appears to be more adapted to the

numerous abiotic stresses on the exterior of the leaf (e.g. insolation, drought and heat stress). In addition, we found that all three bacteria are tolerant to and are attracted by caffeine, but surprisingly do not metabolize it. Future studies will focus on MN1F, MNR3A, and EMN2 colonization and preference for different habitats.

Abbreviations

Not applicable

Methods

Plant material and Isolation of *Pseudomonas* spp.

Rhizospheric soil, roots, and leaves of one-year old plants of *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62 were collected at the Santa Elisa farm of the Agronomic Institute of Campinas (IAC; Campinas, Brazil, 22°53' S 47°5' W, 664 m a.s.l.), where Mondego's laboratory is located. The samples were collected after the authorization of IAC coffee germoplasm curators, which undertook the formal identification of coffee specimens present at Santa Elisa farm. *C. arabica* samples are deposited in IAC herbarium. The bacterial isolation was done in accordance with the specifications of Shiomi *et al*, [64]. An isolate from each region of the plant was selected for the study and named according each region—MNR3A from rhizosphere soil, EMN2 from the roots, and MN1F from the leaf surface.

Library construction, sequencing, assembly and pre-annotation

DNA from MNR3A, EMN2 and MN1F was extracted with Trizol® reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. DNA were sequenced using the Illumina MiSeq platform at the Carolina Center for Genomic Sciences (CCGS) at the University of North Carolina (UNC) at Chapel Hill. Following quality check, 300-bp PE libraries were produced to determine the orientation and relative position of the contigs produced by sequencing. The libraries were constructed using the TruSeq sample preparation kit (Illumina). The assembly of the reads was carried out with Velvet assembler [66]. Gene prediction was completed using GeneMark and Glimmer [60,61,62,63].

Phylogenomics was performed through Type Strain Genome Server (<https://tygs.dsmz.de/>). Metabolic pathways were predicted using the KEGG database [64]. Mobile elements were identified using ISFinder (<https://www-is.biotoul.fr/>) according to Siguier *et al.* (2006) [16]. NCBI accession numbers were PRJNA573636 (EMN2), PRJNA573634 (MN1F) and PRJNA573640 (MNR3A).

Functional and comparative analysis of genomes

The functional and comparative annotation of bacterial genomes was performed using the RAST program according to the developers' specifications [65]. Metabolic maps were constructed using the KEGG tool [66]. The potential production of secondary metabolites was examined using antiSMASH 2.0 software according to Blin *et al.* (2013) [67]. The presence of secretion system genes was investigated using T346 Hunter, a web-based tool for the prediction of type III, IV, and VI secretion systems in bacterial genomes [68].

Analysis of horizontal gene transfer

HGT analysis was performed according to Levy *et al.*, 2018 [37]. The bacterial reads were translated into proteins using CLC Sequence Viewer 6 software. The sequence set was analyzed using the PHYLO.GLM software to eliminate sequences that can be explained by shared ancestry. Proteins with more than 40 amino acids were aligned against the reference database using HMMsearch. Results that shared more than 40% identity with plant proteins were accepted as similar and possibly of common origin.

Effect of water potential on exopolysaccharide production

For Exopolysaccharide (EPS) analysis, bacteria were grown in liquid King's B medium supplemented with 35 mM, 45 mM, and 55 mM polyethylene glycol (PEG 6000). EPS determination was performed according to the protocol described by

Papinutti (2010) [69]. All statistical analyses were performed using STATISTICA 5.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). All experiments were carried out in triplicate and differences in means were analyzed using the Tukey's test.

Caffeine chemotaxis and tolerance

To examine caffeine chemotaxis, our *Pseudomonas* and one negative control that exhibit no chemotaxis to caffeine, *E. coli* DH5 α , were grown in LB medium for 3 h. The culture medium was poured into sterile Petri plates and 3 mg of caffeine (Caffeine powder, ReagentPlus®, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were placed in the center of the plate. After 12 h, the plates were analyzed for the presence of a growth halo around caffeine showing positive chemotaxis. The negative control should not show differential growth and form no halo. For caffeine tolerance test, isolates were grown in basal liquid medium (2.3 g KH₂PO₄, 2.9 g Na₂HPO₄·2H₂O, 1.0 g NH₄Cl, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.5g NaHCO₃, 0.01 g CaCl₂·2H₂O) supplemented with different caffeine concentrations (0.8, 2, 3, 6, 10, 15 g/mL). After 8h of growth, a 10 μ l aliquot was taken from the medium and plated in basal medium supplemented with --% agar. Bacterial viability was determined as the number of colony-forming units (CFU/ml).

Phenolics degradation assays

A basic solid medium was used for primary cultivation per liter of K₂HPO₄ 0.2 g/L; NaCl 1 g/L; CaCl₂ 2H₂O, 0.15/L; MgCl₂ 6H₂O, 0.4 g/L; KCl, 0.5 g/L; cysteine-HCl, 0.5 g/L; yeast extract, 0.5 g/L; cinnamate or benzoate or salicylate or quinate as primary source of carbon and agar. A second round of cultivation, in broth medium, was done in same conditions as previously described with 5 mM of cinnamate or benzoate or salicylate or quinate, which would be degraded as acetate concentration increases. Phytocompounds were measured with HPLC (Agilent) Waters μ Bondapak C18 analytical column (3.9 $\times$ 300 mm, 10 μ m) and detected in a Triple Quadruple API-5000 mass analyzer. ESI(-)-MS was done in a capillary and cone voltages set to -4000V and 70V as described with modification by Defnoun *et al.* (2003) [70] and Schmidt *et al.* (2014) [71].

Iron limitation assay

Isolates were grown in minimal liquid medium supplemented with 10 mg FeCl₂ per liter of medium plus 500 mg EDTA. Every 5h, a 10 µl aliquot was taken from the medium and plated in medium identical to the previously used liquid medium. Growth was measured by counting colony forming units (CFU). Siderophore production was detected by measurement of the halo zone (measure in mm) on Blue Agar CAS medium.

Detection of colonization and plant growth promotion

To detect bacterial colonization in plant tissue, we used bacterization of lettuce seeds and further detection of colonization. Bacterial inoculants were prepared by harvesting cells from a 12 h culture in King's B liquid medium. The cells were suspended in sterile 0.85% NaCl solution to an optical density of 1.4 at 590 nm. Each lettuce seed was soaked for 5 minutes in the bacterial culture and then sown in pots filled with a commercial substrate (Biomix, São Paulo, Brazil). The experiment was kept in a sealed greenhouse Dark Box Grow Indoor®, maintaining 27°C 12 h of photoperiod. Ten treatments were evaluated, 20 seeds per treatment: MN1F, EMN2, MNR3A, MN1F + EMN2, MN1F+ MNR3A, EMN2 + MNR3A, all isolates inoculated together, negative control with buffer, negative control with *E. coli* DH5α and positive control with *Bacillus megaterium* BP4 [72]. After 5 days of inoculation, 10 plants were harvested for CFU analysis. At the end of 20 days the remaining 10 plants were also collected for dry weight measurements, CFU and PCR analyses. The harvested plants were separated into three parts: rhizosphere, root and leaf surface. Rhizosphere and leaf surface were washed with buffer (0.8% NaCl) for 1 minute. The root was macerated in the same buffer. In all three cases, the final product was placed in LB medium and incubated at 30°C for 24 hours for bacterial growth and inference of viable cells in CFU. All tests were done in triplicate using the Student's t test.

Acknowledgements

We thank Dr. Carlos Colombo for logistic support and Dr. Cristina Alvarez-Martinez for hints and suggestions about the manuscript. We also thank UNC (University of North Caroline) Genomics Center staff for genome sequencing.

Declarations**Authors' Contributions**

LPS performed all experiments, analyzed and interpreted the data, and contributed in writing the manuscript. MHAC and SSF performed bacterial isolation and help in bacterial identification. MJS help in DNA extraction and bacterial DNA sequencing. MFC performed genome assembly. JMCM wrote the manuscript and coordinated the research. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

DNA sequencing and all bench experiments were supported by São Paulo State Research Foundation (FAPESP; process 2014/11544-4). LPS was recipient of a fellowship from 'Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil' (CAPES). Funding bodies did not directly participate in the design of the study, experiments and interpretation of data; and in writing the manuscript, but approved annual reports containing our results.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors have declared that no competing interest exists

References

- [1] Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M and Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 2016; 183, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- [2] Araújo, WL, Marcon J, Maccheroni W, van Elsas JD, van Vuurde JW and Azevedo JL. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68, 4906-4914. DOI: [10.1128/AEM.68.10.4906-4914](https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4906-4914)
- [3] Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Araujo WL and Raaijmakers JM. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73, 7259-7267. DOI: [10.1128/AEM.01222-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01222-07)
- [4] Clarke PH. The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1982; 48, 105-130.
- [5] Patten CL and Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68, 3795-3801. DOI: [10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002)
- [6] Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 2003; 255: 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- [7] Rodriguez F and Pfender WF. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 *in vitro* and *in planta*. *Phytopathology.* 1997; 87, 614-621. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.6.614>
- [8] Naseby DC, Way JA, Bainton NJ and Lynch JM. Biocontrol of *Pythium* in the pea rhizosphere by antifungal metabolite producing and non-producing *Pseudomonas* strains. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 90, 421-429. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01260.x>

[9] Haas D and Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Rev. Microbiol.* 2005; 3: 307-319. doi:10.1038/nrmicro1129

[10] Paulsen IT, Press CM, Ravel J, Kobayashi DY, Myers GS, Mavrodi DV, DeBoy RT, Seshadri R, Ren Q, Madupu R, Dodson RJ, Durkin AS, Brinkac LM, Daugherty SC, Sullivan SA, Rosovitz MJ, Gwinn ML, Zhou L, Schneider DJ, Cartinhour SW, Nelson WC, Weidman J, WatkinsK TK, Khouri H, Pierson EA, Pierson LS, Thomashow LS, Loper JE. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnol.* 2005; 23: 873-878. doi:10.1038/nbt1110

[11] Langsrud S, Sundheim G and Borgmann-Strahsen R. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 95, 874-882. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02064.x>

[12] Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, Glaux C, Guilbaud C, Buffiere A, Yan S, Dominguez H and Thompson BM. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J.* 2008; 321. doi:10.1038/ismej.2007.113

[13] Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA, Brinkman FS. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* 2015; 44: D646-D653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>

[14] Vega FE, Pava-Ripoll M, Posada F, Buyer JS. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *J Basic Microbiol.* 2005; 45: 371-380. <https://doi.org/10.1002/jobm.200410551>

[15] Mondego JM, Vidal RO, Carazzolle MF, Tokuda EK, Parizzi LP, Costa GG, Pereira LF, Andrade AC, Colombo CA, Vieira LG and Pereira GA. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC Plant Biol.* 2011; 11, 30. doi:10.1186/1471-2229-11-30

[16] Siguier P, Pérochon J, Lestrade L, Mahillon J, & Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic acids research.* 2006; 34(suppl_1), D32-D36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>

[17] Martins D, Mesquita MQ, Neves MG, Faustino MA, Reis L, Figueira E and Almeida A. Photoinactivation of *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae in kiwifruit plants by cationic porphyrins. *Planta*. 2018; 248, 409-421. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2913-y>

[18] D'Autréaux B, Tucker N, Spiro S and Dixon R. Characterization of the nitric oxide-reactive transcriptional activator NorR. *Methods Enzymol*. 2008; 437, 235–251. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)37013-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)37013-4)

[19] Helmick RA, Fletcher A.E, Gardner A.M, Gessner C.R. and Hvitved A.N. Imidazole antibiotics inhibit the nitric oxide dioxygenase function of microbial flavohemoglobin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1837-1843. DOI: 10.1128/AAC.49.5.1837-1843.2005

[20] Cipollone R, Ascenzi P and Visca P. 2007. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB life*. 2007; 59, 51-59. <https://doi.org/10.1080/15216540701206859>

[21] Janssen BD, Garza-Sánchez F, Hayes CS. YoeB toxin is activated during thermal stress. *Microbiology* 2015; 4: 682-697. <https://doi.org/10.1002/mbo3.272>

[22] Lopes AP, Lopes LM, Fraga TR, Chura-Chambi RM, Sanson AL, Cheng E, Nakajima E, Morganti L and Martins EA. VapC from the leptospiral VapBC toxin-antitoxin module displays ribonuclease activity on the initiator tRNA. *PLoS One*. 2014; 9:e101678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101678>

[23] Schnider-Keel U, Lejbølle KB, Baehler E, Haas D and Keel C. The Sigma Factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001; 67, 5683-5693. DOI: 10.1128/AEM.67.12.5683-5693.2001

[24] Ho BT, Dong TG and Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe* 2014; 15, 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.008>

[25] Linhartová I, Bumba L, Mašín J, Basler M, Osička R, Kamanová J, Procházková K, Adkins I, Hejnová-Holubová J, Sadílková L, Morová J and Sebo P. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev*. 2010; 34, 1076-1112.

[26] Shrivastava S. and Mande SS. Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes. *PloS One* 2008; 3(8): e2955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002955>

[27] Kline T, Trent MS, Stead CM, Lee MS, Sousa MC, Felise H.B, Nguyen HV and Miller SI. Synthesis of and evaluation of lipid A modification by 4-substituted 4-deoxy arabinose analogs as potential inhibitors of bacterial polymyxin resistance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008; 18, 1507-1510. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.12.061>

[28] Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, Cavard D. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007; 71, 158-229. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06

[29] Gotoh N, Tsujimoto H, Tsuda M, Okamoto K, Nomura A, Wada T, Nakahashi M and Nishino T. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in Δ mexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42, 1938-1943. DOI: 10.1128/AAC.42.8.1938

[30] Lin J, Michel LO and Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46, 2124-2131. DOI: 10.1128/AAC.46.7.2124-2131

[31] Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 251, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.030>

[32] Farah A and Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. Brazil. *J. Plant Physiol.* 2006; 18, 23-36. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>

[33] Santos SA, Freire CS, Domingues MR, Silvestre AJ and Neto CP. Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59, 9386-9393. <https://doi.org/10.1021/jf201801q>

[34] Stashenko EE, Martínez JR, Cárdenas-Vargas S, Saavedra-Barrera R, and Durán DC. GC–MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. *J Sep Sci.* 2013; 36: 2901-2914.

<https://doi.org/10.1002/jssc.201300458>

[35] Wang CH, Zhang C, Xing XH. Xanthine dehydrogenase: an old enzyme with new knowledge and prospects. *Bioengineered*. 2016; 7: 395-405. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1206168>

[36] Molinari S. New developments in understanding the role of salicylic acid in plant defence. *CAB Rev*. 2007; 67: 1-10. doi: 10.1079/PAVSNNR20072067

[37] Levy A, Salas Gonzalez I, Mittelviefhaus M, Clingenpeel S, Herrera Paredes S, Miao J, Wang K, Devescovi G, Stillman K, Monteiro F, Rangel Alvarez B, Lundberg DS, Lu TY, Lebeis S, Jin Z, McDonald M, Klein AP, Feltcher ME, Rio TG, Grant SR, Doty SL, Ley RE, Zhao B, Venturi V, Pelletier DA, Vorholt JA, Tringe SG, Woyke T, Dangl JL. Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nat Gen*. 2018; 50: 138-150. doi:10.1038/s41588-017-0012-9

[38] Silby MW, Cerdeño-Tárraga AM, Vernikos GS, Giddens SR, Jackson RW, Preston GM. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol*. 2009; 10(5) R51. doi:10.1186/gb-2009-10-5-r51

[39] Loper JE, Hassan KA, Mavrodi DV, Davis EW 2nd, Lim CK, Shaffer BT, Elbourne LD, Stockwell VO, Hartney SL, Breakwell K, Henkels MD, Tetu SG, Rangel LI, Kidarsa TA, Wilson NL, van de Mortel JE, Song C, Blumhagen R, Radune D, Hostetler JB, Brinkac LM, Durkin AS, Kluepfel DA, Wechter WP, Anderson AJ, Kim YC, Pierson LS 3rd, Pierson EA, Lindow SE, Kobayashi DY, Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS, Allen AE, Paulsen IT. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genetics*. 2012; 8: e1002784. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002784>

[40] Wery J, Hidayat B, Kieboom J, de Bont JA. An insertion sequence prepares *Pseudomonas putida* S12 for severe solvent stress. *J Biol Chem*. 2001; 276: 5700-5706. doi: 10.1074/jbc.M007687200

[41] Kloepper JW, Leong J, Teintze M and Schroth MN. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol*. 1980; 4, 317-320. <https://doi.org/10.1007/BF02602840>

[42] Vasil ML, Ochsner UA. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics biochemistry and virulence. *Mol Microbiol*. 1999; 34: 399-413. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01586.x>

[43] 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 JD, Reinhold-Hurek B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2012; 25, 28-36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>

[44] Liu PV and Shokrani F. Biological activities of pyochelins: iron-chelating agents of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 1978; 22, 878-890. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x>

[45] Bitter W, Marugg JD, De Weger LA, Tommassen J and Weisbeek PJ. The ferric-pseudobactin receptor PupA of *Pseudomonas putida* WCS358: homology to TonB-dependent *Escherichia coli* receptors and specificity of the protein. *Mol. Microbiol.* 1991; 5, 647-655. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00736.x>

[46] Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C and Holder IA. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 1996; 64, 518-523.

[47] Poole K and McKay GA. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front. Biosci.* 2003; 8, 661-686.

[48] Tyrrell J, Callaghan M. Iron acquisition in the cystic fibrosis lung and potential for novel therapeutic strategies. *Microbiol.* 2016; 162: 191-205. [doi: 10.1099/mic.0.000220](https://doi.org/10.1099/mic.0.000220)

[49] Lindow SE and Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69, 1875-1883. [DOI: 10.1128/AEM.69.4.1875-1883](https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875-1883)

[50] Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Rev Microbiol.* 2012; 10: 828-840. [doi:10.1038/nrmicro2910](https://doi.org/10.1038/nrmicro2910)

[51] Cooper CR, Daugherty AJ, Tachdjian S, Blum PH, Kelly RM. Role of vapBC toxin-antitoxin loci in the thermal stress response of *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. Soc. Trans.* 2009; 371, 123-126. <https://doi.org/10.1042/BST0370123>

[52] Nieto C, Cherny I, Khoo SK, de Lacoba MG, Chan WT, Yeo CC, Gazit E and Espinosa M. The yefM-yoeB toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: functional and structural correlation. *J. Bacteriol.* 2007; 189, 1266-1278. [DOI: 10.1128/JB.01130-06](https://doi.org/10.1128/JB.01130-06)

[53] Joet T, Laffargue A, Salmona J, Doubeau S, Descroix F, Bertrand B, Lashermes P and Dussert S. Regulation of galactomannan biosynthesis in coffee seeds. *J. Exp. Bot.* 2014; 65, 323–337. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert380>

[54] Close DC and McArthur C. Rethinking the role of many plant phenolics—protection from photodamage not herbivores? *Oikos*. 2002; 99, 166-172. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.990117.x>

[55] Yadav RK, Karamanoli K, Vokou D. Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microb Ecol.* 2005; 50: 185-196. [doi:10.1007/s00248-004-0171-y](https://doi.org/10.1007/s00248-004-0171-y)

[56] Bhushan B, Halasz A, Spain JC and Hawari J. Initial reaction(s) in biotransformation of CL-20 is catalyzed by salicylate 1-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain ATCC 29352. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70, 4040-4047. DOI: [10.1128/AEM.70.7.4040-4047.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4040-4047.2004)

[57] Ambrose KV, Tian Z, Wang Y, Smith J, Zylstra G, Huang B and Belanger FC. Functional characterization of salicylate hydroxylase from the fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Sci. Rep.* 2015; 5, 10939. [doi:10.1038/srep10939](https://doi.org/10.1038/srep10939)

[58] Woolfolk CA. Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *J Bacteriol.* 1975; 123: 1088-1106.

[59] Mehrabi Z, McMillan VE, Clark IM, Canning G, Hammond-Kosack KE, Preston G and Mauchline TH. *Pseudomonas* spp. diversity is negatively associated with suppression of the wheat take-all pathogen. *Sci. Rep.* 2016; 6, 29905. [doi:10.1038/srep29905](https://doi.org/10.1038/srep29905)

[60] Shiomi HF, Silva HSA, Melo ISD, Nunes FV & Bettiol W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola.* 2006; 63(1), 32-39. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162006000100006>

[61] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Gen Res.* 2008; 18: 821-829. [doi:10.1101/gr.074492.107](https://doi.org/10.1101/gr.074492.107)

[62] Borodovsky M and McIninch J. GENEMARK: Parallel gene recognition for both DNA Strands. *Comput Chem.* 1993; 17, 123–133. [https://doi.org/10.1016/0097-8485\(93\)85004-V](https://doi.org/10.1016/0097-8485(93)85004-V)

[63] Lukashin A and Borodovsky M. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 1107-1115. <https://doi.org/10.1093/nar/26.4.1107>

[64] Delcher AL, Bratke KA, Powers EC and Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* 2007; 23, 673–679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm009>

[65] Ogata H. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27, 29-34. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

[66] Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA and Meyer F. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 2008; 9: 75. [doi:10.1186/1471-2164-9-75](https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75)

[67] Kanehisa M, and Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28, 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

[68] Blin K, Medema MH, Kazempour D, Fischbach MA, Breitling R, Takano E and Weber T. antiSMASH 2.0 - a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucl Acids Res.* 2013; gkt449. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt449>

[69] Martínez-García, PM, Ramos C and Rodríguez-Palenzuela P. T346Hunter: a novel web-based tool for the prediction of type III type IV and type VI secretion systems in bacterial genomes. *PloS One.* 2015; 10, e0119317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119317>

[70] Papinutti L. Effects of nutrients pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Biores. Technol.* 2010; 101, 1941-1946. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.076>

[71] Defnoun S, Ambrosio M, Garcia JL, Traoré A and Labat M. Degradation of cinnamate via β -oxidation to benzoate by a defined syntrophic consortium of anaerobic bacteria. *Current Microbiol.* 2003; 46, 47-52. [doi:10.1007/s00284-002-3759-9](https://doi.org/10.1007/s00284-002-3759-9)

[72] Schmidt EM, Santos CDS, Stock D, Finger D, Baader WJ, Caetano IK and Torres YR. Effect of extraction solvent on antiradical activity of the obtained propolis extracts. *J. Apic. Res.* 2014; 53, 91-100. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.09>

[73] de Sousa LP and da Silva MJ. Differential growth of *Jatropha curcas* L. by different strains of endophytic *Bacillus* sp. Intl. Res. J. Agric. Sci. Soil Sci. 2012; 2, 306-311.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Gene content analysis and functional annotation of *Pseudomonas putida*-like bacteria isolated. a) Venn diagram comparing gene content of the three isolates analyzed. Core-genome in center includes genes shared by the three isolates (3215 genes). The remainder includes strain-specific genes shared by two *Pseudomonas* isolates or isolate-specific genes; b) RAST analysis indicating the numbers of genes grouped into functional categories.

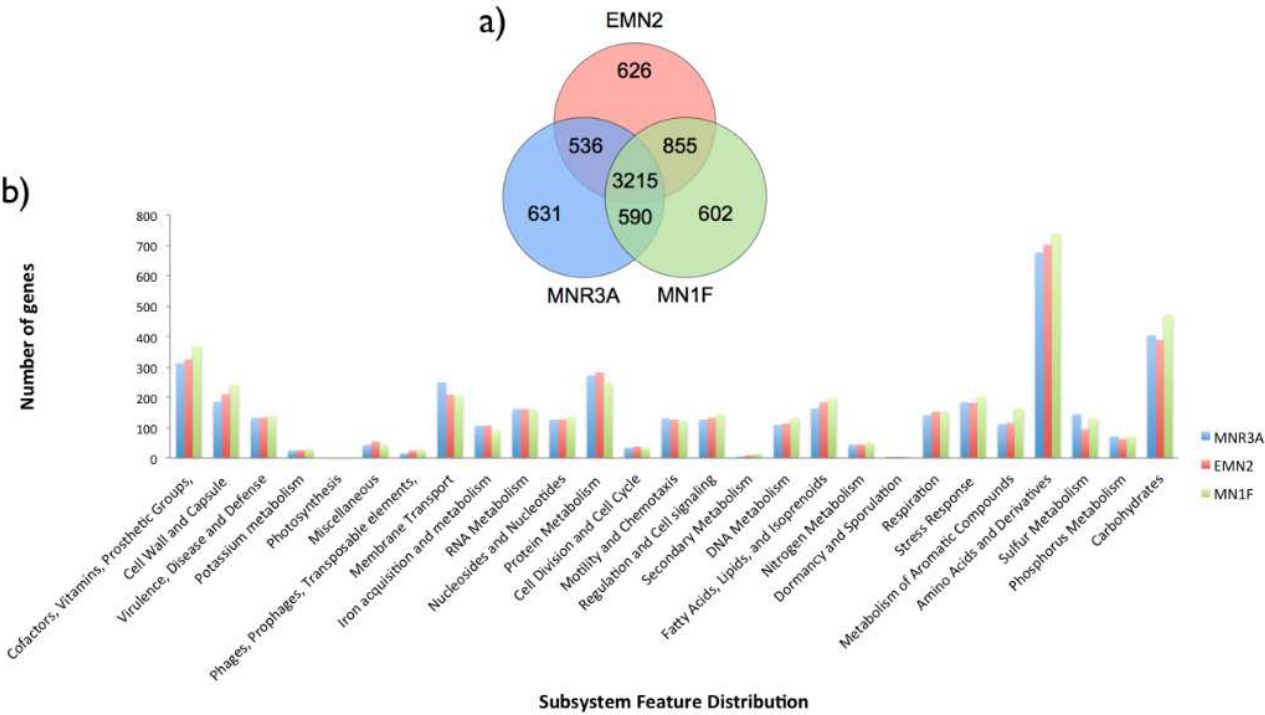
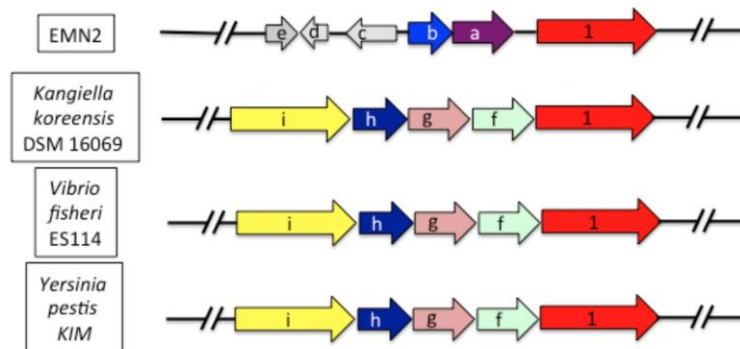


Figure 2: Gene cluster comparison for aerobactin (a) and achromobactin (b) biosynthesis. For aerobactin operon genes are the following: (1) iutA (a) FecR (b) rpoD (c) Lol family (d) possible acetyltransferase gene (e) hypothetical protein (f) lucD (g) lucC (h) lucB and (i) lucA. For achromobactin operon genes are the following: (1) Psyr 2585; (2) AcsF; 3) AcsD; (4) AcsE; (5) possible permease (a) HPA2 (b) UbiH (c) MerR (d) possible flavohemoprotein (e) FecB (f) FecC (g) FecD (h) FrpC (i) bioH and (j) PFLU_2788.

a)



b)

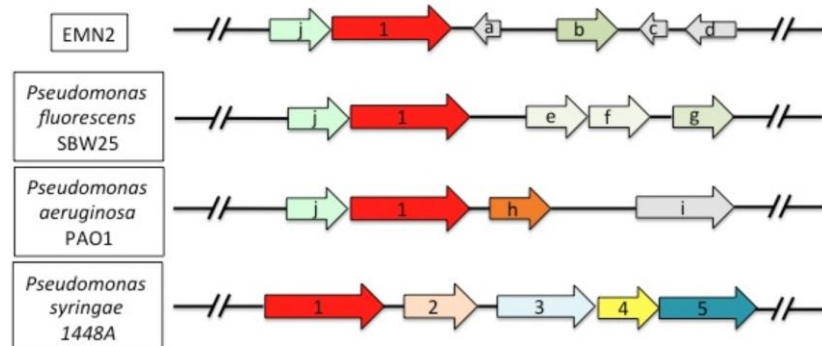


Figure 3: Evaluation of bacterial growth under iron limitation. Isolates were grown in minimal liquid medium supplemented with 10 mg FeCl₂ per liter of medium plus EDTA (500 mg). Every 5h, a 10 µl aliquot was taken from the medium and plated with solid medium identical to the previously used liquid medium. Growth was measured by counting plaque colonies (colony-forming unit; CFU).

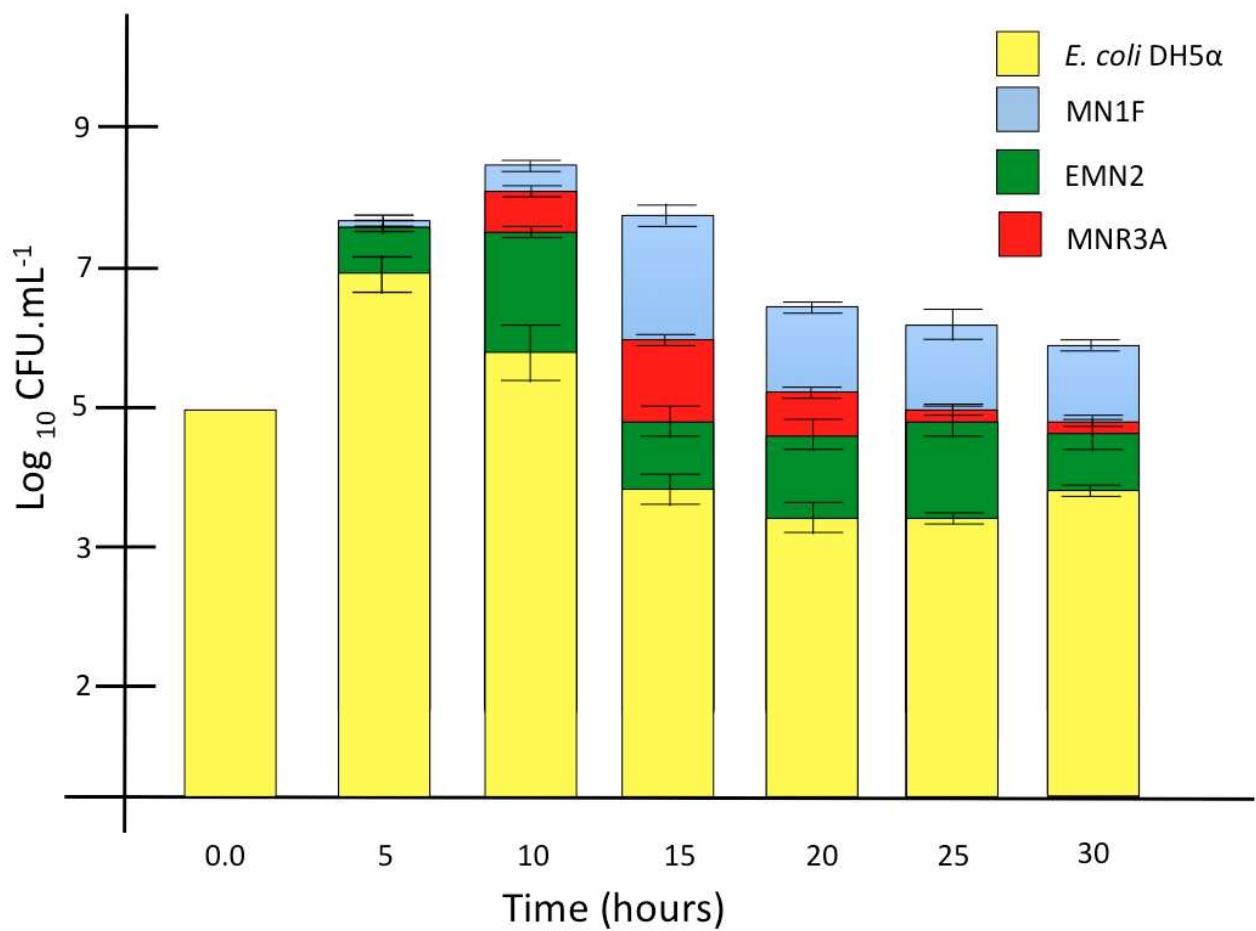


Figure 4: Production of water-soluble exopolysaccharides (EPS) by *Pseudomonas* bacteria in response to increasing PEG concentration. Briefly bacteria were grown in King's B medium supplemented with polyethylene glycol (PEG) at different concentrations (6.25 gL^{-1} , 12.5 gL^{-1} , 18.75 gL^{-1} , 25 gL^{-1}) and production of EPS was analyzed by spectrophotometry. There was no significant difference in EPS yields between isolates up to $\text{PEG} = 12.5 \text{ gL}^{-1}$. The thin bars represent the standard deviation of the mean. All experiments were done in triplicate and differences in means were analyzed using the Tukey's test.

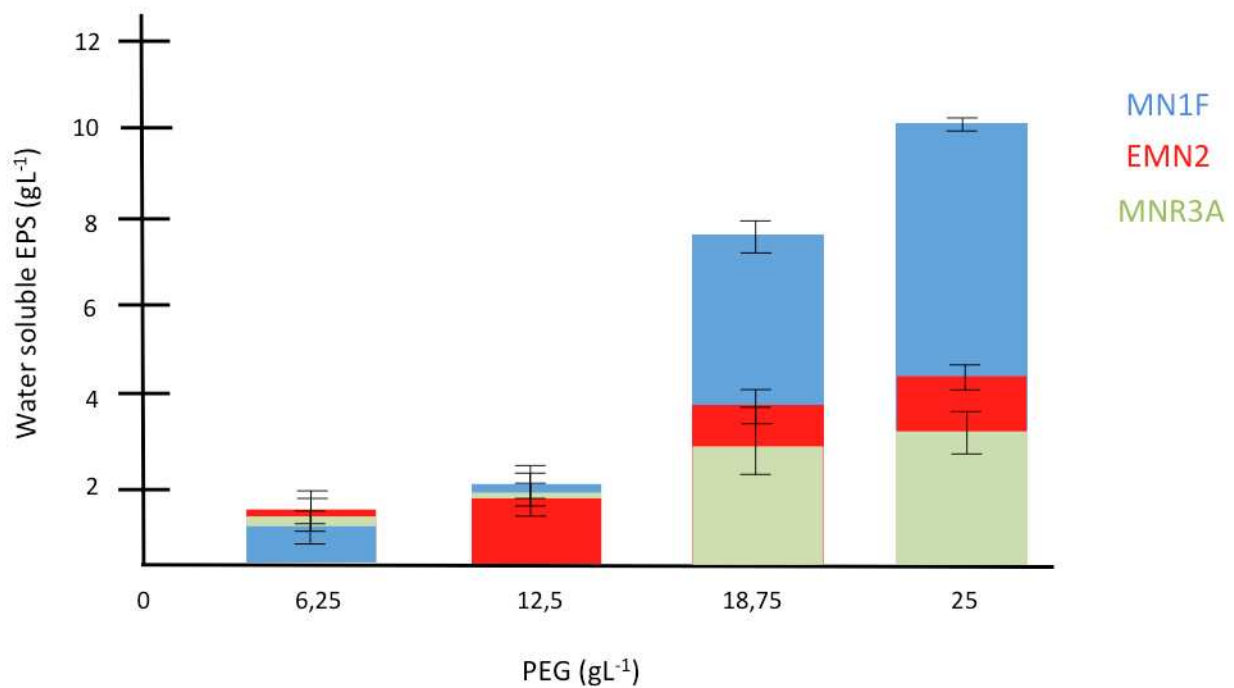


Figure 5. Effect of *Pseudomonas* bacteria isolated from coffee on lettuce growth. Bacterial isolates were suspended in sterile 0.85% NaCl solution and added to pots containing lettuce seedlings. Ten treatments were evaluated: MN1F, EMN2, MNR3A, MN1F + EMN2, MN1F+ MNR3A, EMN2 + MNR3A, MN1F + EMN2 + MNR3A, negative control with buffer, negative control with *E. coli* DH5 α , and positive control with *Bacillus megaterium* BP4 (73). Dry weight measurements of lettuce seedlings were taken 20 days post-inoculation. The experiment was done in triplicate and analyzed using the Student's t test. Dry root (black bars) and shoot (gray bars) weight. The asterisks indicate significant differences from control plants ($P < 0.05$).

A)

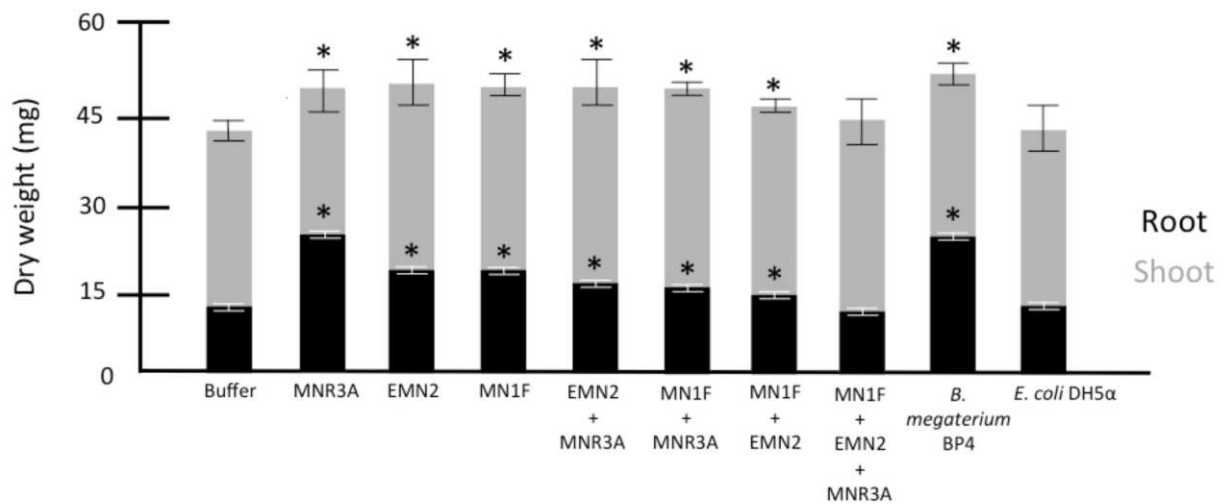


Figure 6: Evaluation of phenolics catabolism and acetate conversion in *Pseudomonas* isolates. A) Metabolic map of pathway interconnections between quinate benzoate trans-cinnamate and salicylate catabolic systems. Precursors are indicated in red enzymes with blue squares and intermediate compounds with small blue circles. B) Degradation of phenolic compounds measured in minimal medium supplemented with benzoate cinnamate salicylate and quinate as sole carbon source. The incorporation of the phenolic compounds via acetate into the citrate cycle was measured. The experiment was done in triplicate and analyzed using the Student's t test.

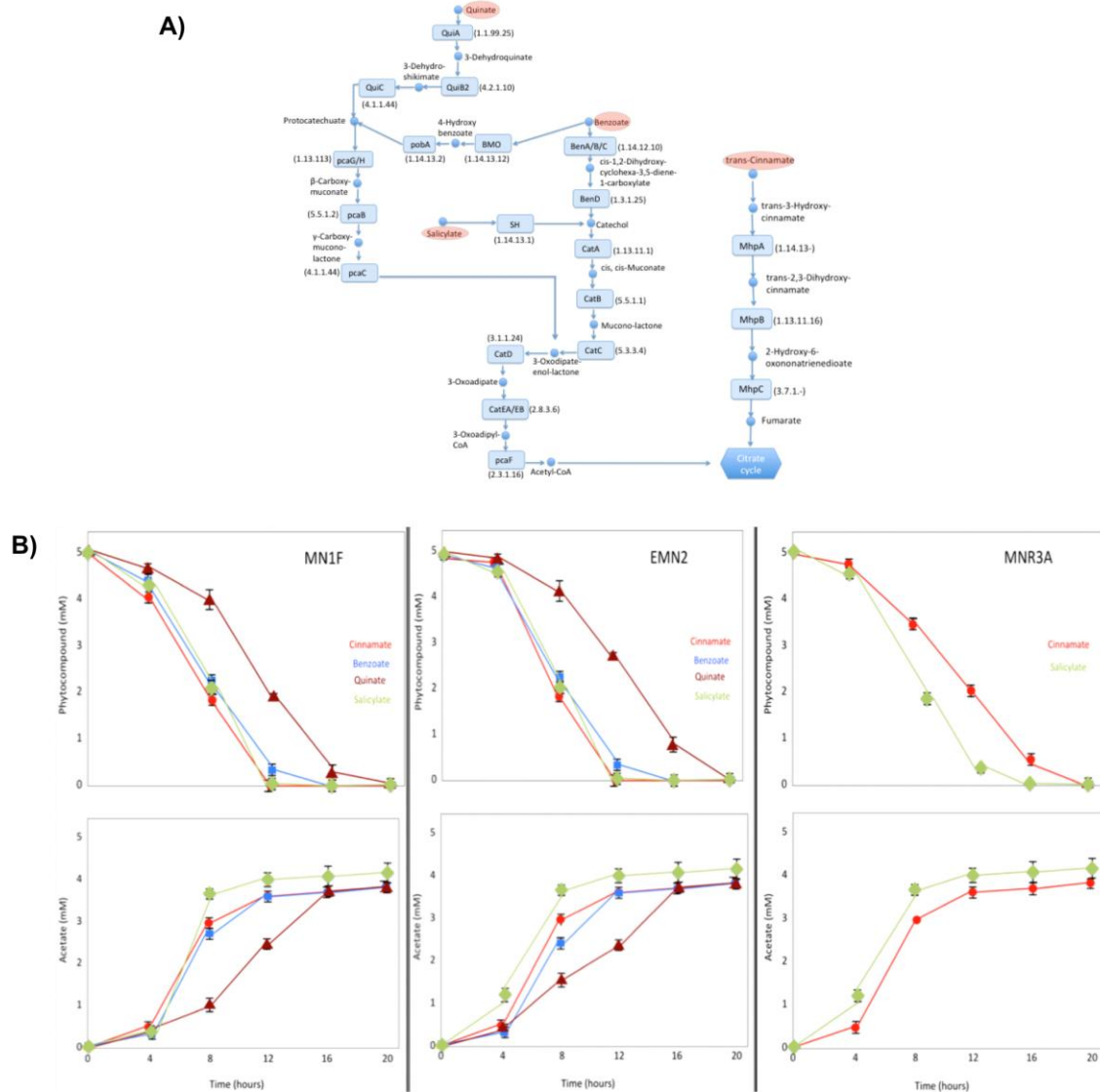


Figure 7. Evaluation of caffeine as a secondary source of carbon (A) and nitrogen (B) during *P. putida* growth. Four different concentrations of glucose (8; 4; 2; 0 g L⁻¹) and NH₄Cl (2; 1; 0.5 g L⁻¹) were added to a minimal medium containing caffeine (2g L⁻¹). The temperature for culture condition was 30°C. OD₆₀₀ was measured after 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70h of growth.

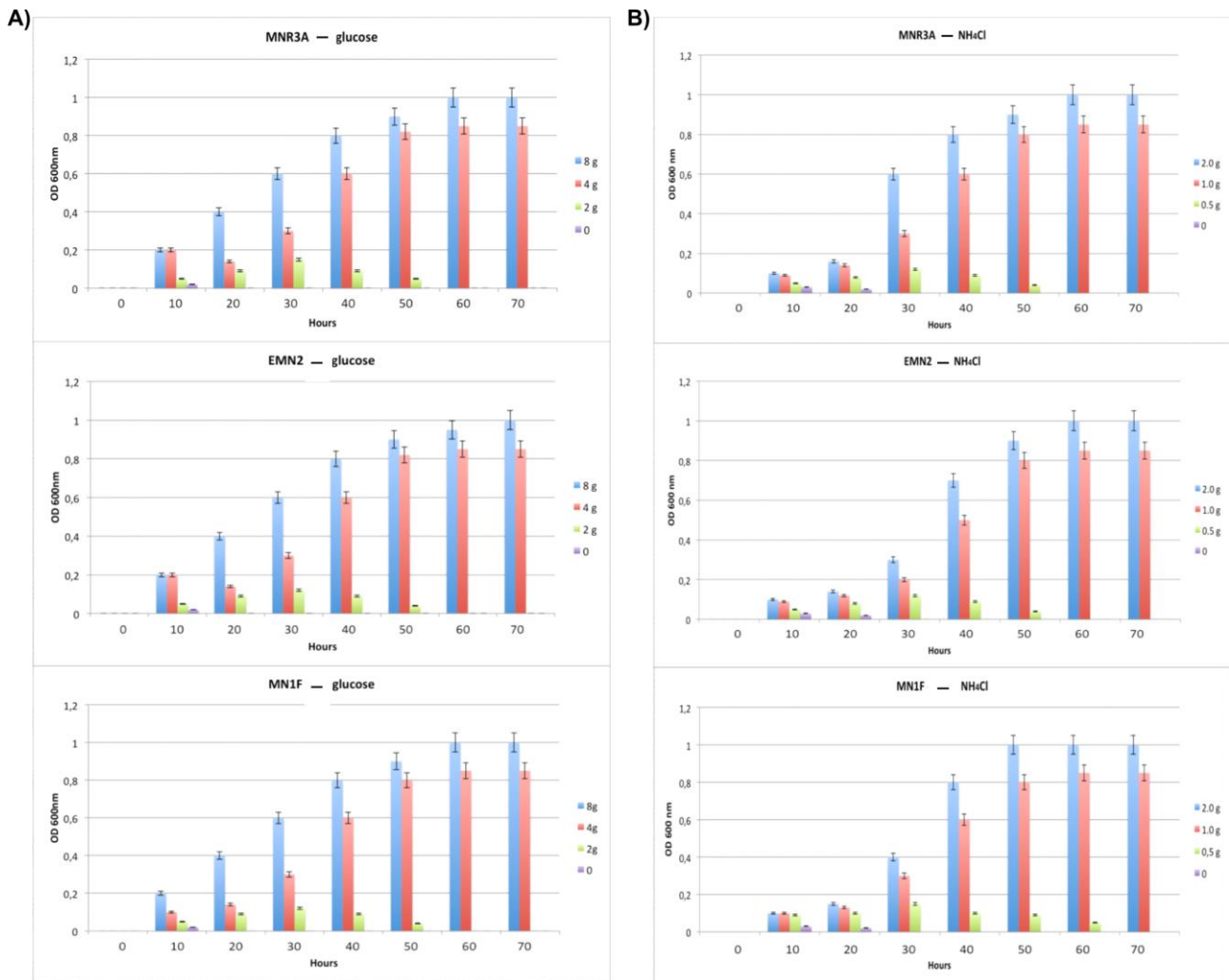
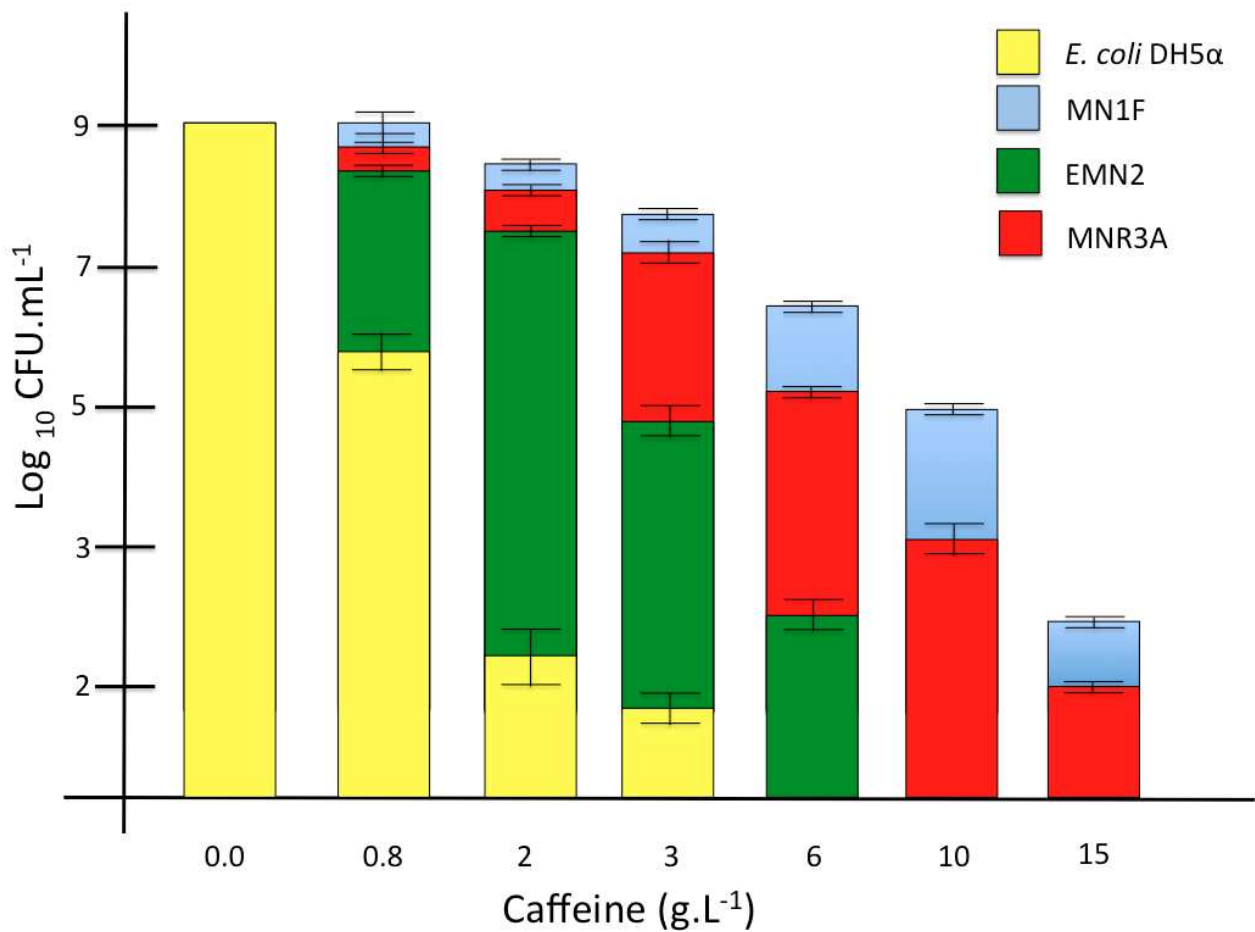


Figure 8. Evaluation of caffeine resistance of *Pseudomonas* isolated from *C. arabica*. Isolates were grown in minimal liquid medium supplemented with different caffeine concentrations (0, 0.8, 2, 3, 6, 10 and 15 g mL⁻¹). After 8h of growth (200 rpm at 30°C), a 10 µl aliquot was taken from the medium and plated with solid medium identical to the previously used liquid medium. *E. coli* DH5 α was used as a negative control. Growth was measured by colony forming units (c.f.u.).



ADDITIONAL FILES

Additional File 1: Type Strain Genome Server (TYGS - <https://tygs.dsmz.de/>) phylogenomic analysis of MNR3A.

Additional File 2: Type Strain Genome Server (TYGS - <https://tygs.dsmz.de/>) phylogenomic analysis of EMN2.

Additional File 3: Type Strain Genome Server (TYGS - <https://tygs.dsmz.de/>) phylogenomic analysis of MN1F.

Additional Table 1: Assessment of siderophore, IAA and ACC deaminase production and caffeine chemotaxis.

10. Anexos

Declaração de autoria

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada "Pseudomonas spp. associadas ao cafeeiro: genômica comparativa, especificidade de nicho e potencial biotecnológico", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 12 de agosto de 2020

Assinatura:

Nome do(a) autor(a): LEANDRO PIO DE JESUS
RG n.º 46.048.894-6

Assinatura:

Nome do(a) orientador(a): JORGE MAURICIO COSTA MONTEGO
RG n.º 10.733.055-8

Declaração de Bioética e Biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada *"Pseudomonas spp. associadas ao cafeeiro: genômica comparativa, especificidade de nicho e potencial biotecnológico"*, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura:

Nome do(a) aluno(a): LEANDRO FID DE SOUSA

Assinatura:

Nome do(a) orientador(a): JORGE MAURICIO COSTA MONDEGO

Data: Campinas, 10 de agosto de 2020