

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

FERNANDA DE SOUSA BERNARDES

Diversidade bacteriana endofítica associada
à *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com sintomas de *Greening*

Piracicaba

2010

FERNANDA DE SOUSA BERNARDES

Diversidade bacteriana endofítica associada
à *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com sintomas de *Greening*

Piracicaba

2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Bernardes, Fernanda de Sousa

Diversidade bacteriana endofítica associada à *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com sintomas de “Greening” / Fernanda de Sousa Bernardes; orientador João Lúcio de Azevedo; co-orientador Welington Luiz de Araújo. - - Piracicaba, 2010.

60 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Clorose variegada dos citros 3. Ecologia microbiana 4 Filogenia 5. Greening (Doença de planta) I. Título

CDU 632.35:634.31

Dedico e ofereço,
a minha família (Val, Selminha e Mary).
pelo amor, o apoio incondicional, o exemplo, a benção... Tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que influíram, ajudaram e apoiaram, não só ao trabalho que está aqui apresentado, mas por tudo o que foi realizado, acertando ou errando, nesses quatro anos de doutorado. E, antecipadamente, me desculpo pelas omissões e esquecimentos.

A Deus, pela vida.

A minha família, pelo amor e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela oportunidade, paciência, estímulo, generosidade e ensinamentos.

Ao Dr. Welington Luiz de Araújo, por ter aceitado ser meu co-orientador, pela ajuda concedida, ensinamentos e pela liberdade para a execução do trabalho.

À Profa. Dra. Aline Pizzirani-Kleiner, pela receptividade e agradável convívio.

Ao Dr. João Roberto Spotti Lopes pelas valiosas sugestões durante a qualificação e pela fundamental colaboração em parte do projeto, referente ao estudo com *Xylella fastidiosa*.

Ao Dr. Marcel Bellato Spósito, pela assistência prestada gentilmente e, juntamente, ao Denis e à Fundecitrus, pela colaboração com o trabalho, fornecendo o material vegetal.

Ao Dr. Fernando Dini Andreote, pelas enriquecedoras sugestões durante a qualificação, ensinamentos esclarecedores e essencial participação na execução das análises filogenéticas.

A Dra. Alessandra Alves de Souza, pelas sugestões e ensinamentos durante a qualificação e, também, pela colaboração na aquisição das sementes de laranja doce.

A Dra. Marli de Fátima Fiore, pelas consideráveis sugestões durante a qualificação.

Ao Dr. Nelson Arno Wulff, pelo fornecimento do inóculo de *Xylella fastidiosa* e pelos esclarecimentos sobre o cultivo da mesma.

A Dra. Adriana P. Martinelli, pelos conselhos ofertados durante a qualificação, pela compreensão e paciência, demonstradas diante às minhas solicitações.

A seção de pós-graduação: a Sônia A. B. Campos, ao Fábio A. S. Oliveira, a Neuda F. Oliveira e, principalmente, a Cláudia Márcia F. Corrêa, pelo atendimento e esclarecimentos sempre cordiais.

A Marília R. Garcia Henyei, pelas correções, formatação de parte das referências bibliográficas e atendimento tão amável.

Ao José Antônio da Silva (Zezo), pela disposição em ajudar sempre quando solicitado e pelos momentos divertidos.

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes (Laboratório de Genética de Leveduras – ESALQ), pela disponibilização dos equipamentos do laboratório.

A Dra. Silvia M. G. Molina (Laboratório de Ecogenética de Resíduos Agroindustriais e Ecologia Humana – ESALQ), pela disponibilização dos equipamentos de laboratório.

Ao Dr. Ricardo A. Azevedo e a Dra. Salete Gaziola (Laboratório de Bioquímica de Plantas – ESALQ), pela disponibilização dos equipamentos do laboratório.

Ao Dr. Helton Carlos de Leão (Fischer Agropecuária) por ter custeado as análises nutricionais das amostras vegetais de citros e disponibilização das mudas de laranja caipira.

Ao Dr. Milton F. Moraes pelo auxílio prestado sempre que necessário.

Ao Dr. Marcílio de Almeida, a Cristina Vieira de Almeida, Cássia R. F. Figueiredo e a Katherine D. Batagin (Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas – ESALQ), pela colaboração e disponibilização do laboratório, em meu primeiro estudo sobre endófitos.

Aos funcionários da ESALQ: Neusa, Fernando, Berdan, Carlinhos, Ana, Macedônio, Cláudio e ao Marcelo Corrêa Alves pela ajuda com o programa SAS.

Aos colegas de Laboratório Genética de Microrganismos -“Prof. João Lúcio de Azevedo” – ESALQ: Joelma Marcon, Manuella Dourado, Michele Silva, Andréa Bogas, Marise Suzuki, Renata Assis, Viviane Colombari, Fernanda Sebastianes, Maria Beatriz Calderan, Danice Luvizzoto, Ana Paula Pallu, Sarina Tsui, Maria Letícia, Priscilla Rossetto, Aline Romão, Cristiane Fasanella, Francisco Andreote, Armando Dias e Carlos Vildoso, pela convivência agradável.

Aos colegas recém chegados: Dra. Cláudia Vitorello, Nathália, Suzane, Gislaine, Daniel e Filipe.

Ao Anderson Ferreira, por todas as dicas, ensinamentos e a disposição contagiante no auxílio com os isolamentos.

A Carol, por toda a ajuda, conselhos, correções, ensinamentos, diversão, energia... Sempre solícita.

A Silvia Blumer (Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica – ESALQ), pela atenção e disponibilidade em ajudar.

A Cristiane Muller (Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos – ESALQ) pela ajuda imprescindível no cultivo e inoculação de *Xylella fastidiosa* e, também, pelas dicas e ensinamentos.

Ao Luis Alberto Senicato (Laboratório de Análise Ambiental e Geoprocessamento – CENA), pela atenção e disponibilidade na geração da imagem de satélite, a partir dos dados georreferenciados.

Ao CNPQ pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

A um serzinho muito especial, que a sua maneira também colaborou... Nemo.

“... o reconhecimento é uma forma sincera de gratidão.”

(Alan Vaszatte)

\

“Com Deus existindo, tudo da esperança:
sempre um milagre é possível, o mundo se resolve.
Mas se não tem Deus, há de a gente perdidos no vai vem,
e a vida é burra... Tendo Deus é menos grave se descuidar
um pouquinho, pois no fim dá certo. Mas, se não tem Deus,
então, a gente não tem licença de coisa nenhuma!”

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

BERNARDES, F. S. **Diversidade bacteriana endofítica associada à *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com sintomas de *Greening***. 2010. 60 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a diversidade bacteriana endofítica cultivável associada a plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sintomáticas e assintomáticas para a doença “Greening”, com destaque para *Methylobacterium* spp. Simultaneamente, como objetivo secundário, foi realizado o estudo da comunidade bacteriana endofítica de *Methylobacterium* spp. presente em plantas de laranja doce com e sem sintomas da Clorose Variiegada dos Citros (CVC). Assim, em período chuvoso (novembro de 2008 e fevereiro de 2009) e seco (maio de 2009) foram amostradas dez plantas sadias e dez plantas doentes (“Greening” e/ou CVC), em dois municípios citrícolas da região central do estado de São Paulo. A confirmação da presença e/ou ausência dos fitopatógenos *Candidatus Liberibacter americanus*, *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus*, agentes causadores do “Greening” e, também, de *Xylella fastidiosa*, agente causador da CVC foram realizadas para todas as amostras pela técnica PCR a partir da utilização de iniciadores específicos para os respectivos fitopatógenos. Em relação à comunidade bacteriana estudada, foi realizado o isolamento e posterior quantificação do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) totais e de *Methylobacterium*, caracterizadas pela presença de coloração rósea. A análise do sequenciamento parcial da região do gene 16S DNAr e agrupamentos filogenéticos dos isolados amostrados foram as metodologias adotadas para a geração dos resultados. Os resultados revelaram que a quantidade de *Methylobacterium* spp. isoladas em plantas sintomáticas para as doenças “Greening” e CVC foi expressivamente superior em relação as plantas sadias, destacando-se as espécies *M. fujisawaense* e *M. radiotolerans*, que foram os filotipos mais encontrados nas referidas amostras. As amostras vegetais coletadas em período seco, também, apresentaram maior presença da comunidade metilotrófica. A observação dos resultados da comunidade endofítica cultivável total associada a plantas sintomáticas e assintomáticas para “Greening”, mostrou que não houve diferenças relevantes quanto as UFCs encontradas nas plantas doentes e sadias. Foram encontradas as classes: Actinobacteria, Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria e Firmicutes e os gêneros mais frequentes foram *Brevundimonas*, *Alcaligenes* e *Pantoea*. Em relação às características adaptativas de *Methylobacterium* spp. quanto a situações de estresses, foram verificadas *in vitro* a produção da enzima ácido aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACCd) e tolerância aos metais pesados cádmio e chumbo. Dos 62 isolados avaliados, 63% foram capazes de utilizar a molécula de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como fonte de nitrogênio para seu desenvolvimento. Os testes para tolerância aos metais pesados revelaram que apenas 3 isolados foram capazes de crescer em meio CHOI suplementado com sulfato de cádmio nas concentrações de 2,5 e 5,0 mM. Somente dois isolados se mostraram tolerantes ao chumbo, presente no meio CHOI suplementado com nitrato de chumbo nas concentrações 2,5 mM. Já em 5 mM, apenas um isolado foi capaz de se desenvolver. Os resultados, apresentados mostram a importância de *Methylobacterium* spp., sobre a comunidade endofítica cultivável de citros em dois diferentes patossistemas avaliados, uma vez que em ambos foi observada uma maior quantidade de isolados do gênero em plantas doentes, sugerindo uma associação com os respectivos fitopatógenos. A produção de ACCd por *Methylobacterium* está relacionada entre outros fatores, a interrupção da rota de síntese do etileno, composto relacionado ao estresse vegetal. Assim, a grande quantidade de *Methylobacterium* em plantas doentes e a produção de ACCd pelas mesmas, possivelmente, estão relacionadas ao favorecimento do patógeno mediante a redução da capacidade de resposta da planta.

Palavras-chave: *Methylobacterium* sp. Clorose variegada dos citros. *Candidatus Liberibacter* sp. *Xylella fastidiosa*. Ecologia microbiana.

ABSTRACT

BERNARDES, F. S. **Endophytic bacterial diversity associated to *Citrus sinensis* (L.) Osbeck with Huanglongbing** 2010. 60f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

The aiming of this study was the evaluation of the diversity of endophytic culturable bacterial community associated with Huanglongbing (HLB) symptomatic and no-symptomatic *Citrus sinensis* (L.) Osbeck plants, highlighting the *Methylobacterium* spp. Simultaneously, it was evaluated the endophytic *Methylobacterium* community in sweetie orange with and without Citrus Variegated Chlorosis (CVC) symptoms. Thus, it was sampled ten healthy and no-health plants with HLB and CVC symptoms in raining (November 2008 and February are 2009) and dried (may 2009) seasons in two provinces at São Paulo State. The presence or absence of the plant-pathogens *Candidatus Liberibacter americanus*, *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus*, HLB agents and *Xylella fastidiosa*, CVC agent, was confirmed using specific primer by PCR for all plant samples. The bacterial communities was accessed by isolation and posteriori quantification of colony forming unit (CFU) to total and *Methylobacterium* group that was identified according its pink coloration. To the identification and phylogenetic clusterization of the isolates was partially sequenced the 16S DNAr gene. The results showed a higher amount of isolated *Methylobacterium* spp. from symptomatic plants to HLB and CVC than healthy plant. *M. fujisawaense* and *M. radiotolerans* were present in these samples. The plants sampled in dried season showed a high amount of methylotrophic isolates. It was not observed a significant difference of the amount of total bacteria isolated from HLB symptomatic and no-symptomatic plants The identified classes was: Actinobacteria, Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria and Firmicutes. *Brevundimonas*, *Alcaligenes* and *Pantoea* were the most frequent genera. It was verified the acid aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCd) production and the lead and cadmium tolerance as the adaptative characteristic of *Methylobacterium* to stress conditions. 63% of the 62 evaluated isolates were able to use the aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) as nitrogen source. Just 3 isolates were able to grow in supplemented CHOI media at 2.5 e 5.0 mM of sulphate of cadmium. Two isolates showed lead tolerance in the same media supplemented with nitrate of lead at 2.5 mM and just one at 5.0mM. The results showed the importance of *Methylobacterium* spp. to citrus culturable endophytic community in two pathosystem. In both the amount of methylotrophic isolates was higher in symptomatic plants, suggesting its association with the plant-pathogens. The *Methylobacterium* ACCd production has a relationship with the breaking of ethylen route. This compound is associated with vegetal stress. For this reason the high amount of *Methylobacterium* from symptomatic plants and the ACCd production probably is correlated with the disease development under the reduction of plant response capacity.

Keywords: *Methylobacterium* spp. Citrus variegated chlorosis. *Candidatus Liberibacter* sp. *Xylella fastidiosa*. Microbial ecology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Microrganismos endofíticos e sua associação às plantas.....	13
2.2 <i>Methylobacterium</i> spp.	14
2.3 As principais doenças bacterianas da citricultura.....	16
2.3.1 “Greening”.....	17
2.3.2 Clorose variegada dos citros (CVC).....	18
2.4 Métodos de estudos da interação bactérias-plantas.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Obtenção do material vegetal.....	21
3.2 Isolamento e cultivo.....	21
3.3 Seleção e manutenção dos isolados.....	23
3.4 Extração do DNA bacteriano.....	24
3.5 Identificação dos isolados por sequenciamento do gene 16S DNAr.....	24
3.6 Detecção dos fitopatógenos: <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> , <i>Ca. L. asiaticus</i> , <i>Ca. L. africanus</i> e <i>Xylella fastidiosa</i>	25
3.7 Teste para a produção da enzima aminociclopropano-1-carboxílico deaminase (ACCD).....	26
3.8 Teste para a determinação da tolerância ao cádmio (Cd) e chumbo (Pb).....	26
3.9 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Isolamento e identificação das espécies endofíticas de <i>Methylobacterium</i> spp. presentes em plantas sintomáticas para “Greening” e CVC, e assintomáticas.....	28
4.2 Isolamento e identificação da comunidade bacteriana endofítica cultivável presente em plantas com “Greening”.....	39
4.3 Avaliação da produção da aminociclopropano -1-carboxílico deaminase (ACCD) e da tolerância aos metais pesados cádmio (CD) e chumbo (Pb)	45
5 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Uma visão tradicional da fitopatologia baseia-se nos postulados de Koch, onde uma causa gera uma consequência única aos seres vivos, a doença. Este fenômeno é consensual e resulta de uma interferência nos processos fisiológicos do hospedeiro. Enquanto não remediada, a doença possui caráter contínuo, prejudicando as funções vitais da planta, como absorção e transporte de água e nutrientes e alterações em seus processos metabólicos. Existem muitas doenças e uma análise mais detalhada, nem sempre revela uma única relação patógeno-hospedeiro. Há casos onde a simples presença do agente fitopatogênico foi o fator responsável para a ocorrência da doença, porém outros estudos mostram que o ambiente favoreceu o desempenho do agente infeccioso e a consequente doença.

O conhecimento da comunidade endofítica presente em uma planta hospedeira sob determinada condição é um importante passo para o entendimento de como algumas relações simbióticas se estabelecem, e como este equilíbrio se mantém. Algumas espécies endofíticas não apresentam especificidade a um único hospedeiro, sendo encontradas em diferentes espécies vegetais, promovendo as mesmas associações benéficas entre elas. Endófitos colonizam os tecidos vegetais de modo sistêmico, ocupando o apoplasto, vasos condutores e espaços intracelulares, os mesmos nichos onde se encontram os fitopatógenos. É possível que associações entre grupos distintos venham a interferir ou a contribuir no estabelecimento e severidade da doença. As maiorias dos estudos sobre a comunidade microbiana e suas alterações diante de fitopatógenos são restritos à rizosfera e aos microrganismos presentes nesse ambiente, com destaque a rizobactérias frente a fungos fitopatogênicos causadores de podridões. Poucos são os estudos que relatam sobre estrutura da diversidade bacteriana endofítica frente a outros patossistemas.

Methylobacterium spp. são bactérias amplamente encontradas na filosfera, rizosfera e em tecidos internos das plantas, o que as caracteriza também como endófitos e são encontradas abundantemente em citros. Este gênero apresenta colônias róseas, são metilotróficas facultativas, capazes de utilizar metanol como fonte de carbono. Espécies de *Methylobacterium* são capazes de fixar nitrogênio, produzir hormônios promotores de crescimento e diversos outros compostos com atuação favorável ao desenvolvimento vegetal, controlando patógenos ou reduzindo a atuação tóxica de metais pesados. Este gênero é frequentemente isolado de ramos de citros e interage com a comunidade presente, favorecendo ou inibindo a ação de determinadas populações. Microrganismos endofíticos oferecem um enorme potencial para a proteção e aumento do desempenho agrônômico das plantas. A diversidade existente de bactérias endofíticas garante que não há endófitos capazes de formar associação compatível com todas as plantas. Poucos estudos têm avaliado as mudanças na diversidade microbiana após a infecção por fitopatógenos e o desenvolvimento da doença. Considerando, os relatos existentes sobre esse processo, são comuns

as observações quanto à alteração da diversidade em plantas doentes. Isto possui efeito direto sobre a estabilidade dos grupos bacterianos associados. Plantas com sintomas da clorose variegada do citros apresentaram elevada frequência de *Methylobacterium* spp. Considerando, que o patógeno causador da doença “Greening” está presente de forma sistêmica na planta, alterando fisiologicamente o desenvolvimento do hospedeiro e, possível que a comunidade endofítica presente, também, esteja sendo influenciada pela presença da doença. Diante disto, o objetivo principal de presente trabalho foi avaliar a diversidade bacteriana endofítica cultivável presentes em plantas assintomáticas e sintomáticas para “Greening”, com destaque para o gênero *Methylobacterium*. Também, foi verificada a diversidade de *Methylobacterium* spp. frente a outro patossistema, citros-*Xylella fastidiosa*. Finalmente, foi realizada uma avaliação das características adaptativas dos isolados de *Methylobacterium*, relacionadas a condições de estresses, como a capacidade de produção da enzima ácido carboxílico aminociclopropano deaminase (ACCd) e a tolerância aos metais pesados cádmio (Cd) e chumbo (Pb).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos endofíticos e sua associação às plantas

A diversidade microbiana é função de sua evolução que diante da experimentação progressiva, as populações foram moldadas estruturalmente e funcionalmente tornando-as capazes de se beneficiar em qualquer nicho ambiental. Esta diversidade está representada na árvore filogenética da vida, dividida em três domínios (Archaea, Bacteria e Eucarya), estando os procariotos em dois destes domínios: Bacteria e Archaea. Esse estudo tem como enfoque um grupo específico, pertencente a divisão (Filo) das α -Proteobactérias, as *Methylobacterium*.

Os microrganismos procariotos representam a maior reserva de diversidade genética, além de apresentarem uma origem anterior aos protistas, metazoários, plantas e ocuparem um espaço muito maior na biosfera. Estes microrganismos possuem a maior biomassa e são responsáveis pela ciclagem de nutrientes, minimizando o impacto antropogênico no ambiente. Além disso, os microrganismos possuem o maior potencial para produção de produtos bioativos, enzimas, polímeros, antibióticos e muitas ferramentas usadas na biotecnologia (VALERA, 2004).

Denominam-se microrganismos endofíticos, aqueles que habitam o interior das plantas, sem causar danos aparentes ao hospedeiro ou a formação de estruturas externas, assim excluem-se fungos micorrízicos e bactérias simbióticas nodulantes, microrganismos epifíticos e fitopatógenos (Hallmann et al, 1997; Azevedo & Araújo, 2007). Entretanto, essas distinções de ordem didática, nem sempre correspondem às complexas relações entre os microrganismos e seus hospedeiros. Dependendo das condições ambientais um microrganismo classificado como endófito pode comportar-se como um epifítico ou um patógeno subclínico (Azevedo, 1998; Andrews & Harris, 2000).

Misagui & Donndelinger (1990) relatam que bactérias endofíticas, possivelmente, influenciam na fisiologia da planta hospedeira por processos ainda não esclarecidos. Esta influência deve-se a íntima relação, entre os diferentes organismos, desenvolvida durante a co-evolução das espécies. Bactérias desempenham, no interior de seus hospedeiros, diversas propriedades de interesse, protegendo-os do ataque de insetos, patógenos, herbívoros; produção de compostos de crescimento vegetal, maior disponibilização de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio (Azevedo et al., 2000; Azevedo et al., 2003). Segundo Sturz & Nowak (2000), microrganismos endofíticos são mais estáveis por não estarem expostos às condições ambientais externas aos órgãos vegetais, havendo pouca ou nenhuma competição microbiana.

2.2 *Methylobacterium* spp.: características gerais, importância e bioprospecção.

As bactérias metilotróficas compreendem diversos grupos, entretanto, apenas o grupo das aeróbias será aqui evidenciado. A sua classificação funcional baseia-se na fonte de carbono utilizada (metano, metanol, aminas metiladas, metanos halogenados e compostos sulfúrico-metilados) e em sua rota de assimilação, sendo o formaldeído a molécula geradora de energia. Estudos mostram que a assimilação do formaldeído ocorre por uma das seguintes rotas metabólicas: serina ou ribulose monofosfato. Bactérias metilotróficas que utilizam a rota da serina pertencem à subclasse α -proteobactéria e, de modo geral, as que utilizam a rota da ribulose monofosfato são divididas entre β e γ -proteobactéria (GREEN, 2006; LIDSTROM, 2006). Atualmente, o gênero *Methylobacterium* pertence à ordem Rhizobiales, família *Methylobacteriaceae*. Até o término deste trabalho, este gênero compreende 34 espécies descritas na literatura (EUZÉBY, 2009). A caracterização filogenética das metilotróficas que utilizam o metanol pode ser realizada a partir da região conservada do gene *mxoF*, com cerca de 1,8 Kb de tamanho. Este gene é responsável pela codificação da enzima desidrogenase do metanol (MDH), transformando-o em formaldeído (ANTHONY et al., 1994).

O gênero *Methylobacterium* foi criado por Patt et al. (1974), ao descobrir uma bactéria capaz de degradar metano, mas com características fenotípicas distintas de outras bactérias metanotróficas, sendo denominada de *Methylobacterium organophilum*. A partir de estudos taxonômicos detalhados, Green e Bousfield (1982) reclassificaram diversas espécies bacterianas como pertencentes ao gênero *Methylobacterium*. Este se caracteriza por bactérias gram-negativas com pigmentação rósea, sendo denominadas "Pink-Pigmented Facultative Methylophilics" (PPFMs), devido à síntese de carotenóides (VAN DIEN et al., 2003). Apresentam a forma de bastonete e possuem flagelo, o que lhes confere mobilidade. Podem se desenvolver em temperaturas entre 5°C a 37°C, tendo o crescimento ótimo a 30°C. Mesmo sob temperatura adequada, algumas espécies apresentam crescimento lento, precisando de no mínimo 3 dias de incubação para que as colônias possam ser visualizadas (GREEN, 2006).

Methylobacterium sp. são habitantes de solos, plantas, pântanos, mananciais, encanamentos hidráulicos, água potável, ambientes marinhos, sistema de esgoto, partículas de poeira, ambientes hospitalares, alvenaria, alimentos processados, produtos farmacêuticos, processos de fermentação, etc (GREEN, 2006). Diversos trabalhos mostram o potencial de algumas espécies de *Methylobacterium* no desenvolvimento de produtos biotecnológicos, como polihidroxialcanoatos (PHA) (NATH et al., 2008) e aminoácidos (TSUJIMOTO et al., 2006), fitohormônios (OMER et al., 2004), proteínas (BELANGER et al., 2004), entre outros.

Algumas espécies de *Methylobacterium* são comumente encontradas na rizosfera (HOLLAND, 1997; ANDREOTE et al., 2009), colonizando os tecidos internos de plantas de

forma sistêmica (ARAÚJO et al., 2001; 2002) e/ou na superfície de folhas (KUTSCHERA et al., 2007). Estudos revelam o efeito benéfico das PPFMs no desenvolvimento vegetal de diversas culturas como soja (HOLLAND; POLLACO, 1994; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004), milho (MADHAIYAN, 2002), cana de açúcar e algodão (MADHAIYAN et al., 2006). Jourand et al. (2004) relataram que a espécie nodulante *Methylobacterium nodulans* é capaz de fixar nitrogênio em associação com leguminosas. Cervantes-Martinez et al. (2004) observaram uma maior atividade fotossintética na planta hospedeira pelo aumento no número de estômatos, concentração de clorofila e conteúdo de ácido málico, induzido pelo endófito *Methylobacterium*.

Estas bactérias crescem ativamente em tecidos meristemáticos, formando populações entre 10^4 e 10^6 UFCs (DORONINA et al., 2002). Nemecek-Marshall et al. (1995) verificaram uma maior concentração populacional de *Methylobacterium* na superfície abaxial de folhas jovens, possivelmente, devido à liberação de metanol pelos estômatos, o qual seria utilizado pelas PPFMs. Holland (1997) constatou que bactérias metilotróficas são capazes de sintetizar citocininas e, Lee et al. (2006) observaram que as citocininas sintetizadas por *Methylobacterium* atuavam como um sinal molecular, estimulando as células do tecido vegetal a se dividir. Desta forma, por meio da orientação química há a desmetilação da pectina presente na parede celular das células vegetais e, conseqüentemente, ocorre a liberação do metanol.

Espécies de *Methylobacterium* spp. foram encontradas como endófitos de citros, sendo mais frequentemente isoladas de plantas sintomáticas para a clorose variegada dos citros (CVC). Segundo Araújo et al. (2002b), a ocorrência da doença em campo pode estar sendo favorecida pela presença de *Methylobacterium*. Isto foi evidenciado em teste *in vitro*, no qual o sobrenadante proveniente do cultivo de *M. extorquens* (SR 1.6/6) beneficiou o desenvolvimento de *X. fastidiosa* (LACAVA, et al, 2004). Entretanto, o endófito *Curtobacterium flaccumfaciens* (ER 1/6), muito encontrado em plantas assintomáticas para CVC, inibiu o crescimento do patógeno *in vitro*. Em *Catharantus roseus* tratado com *C. flaccumfaciens* e inoculado com *X. fastidiosa* apresentou menor redução na emissão dos sintomas (LACAVA et al., 2007), novamente manifestando a capacidade de realizar o controle do patógeno.

Segundo Ferreira Filho et al. (2001), isolados de *Methylobacterium* spp. sintetizam pectinase e celulase, enzimas relacionadas a ativação de respostas de defesa no hospedeiro. Em trabalho semelhante, Madhaiyan et al. (2004) observaram que *Methylobacterium* sp. são capazes de reduzir indiretamente a ação de microrganismos patogênicos por meio da indução de resistência sistêmica. Essa constatação deve-se ao aumento nas concentrações de metabólitos relacionados aos mecanismos de defesa como proteínas-PR e compostos fenólicos. Segundo Pascholati e Leite (1994), os mecanismos de defesa vegetal podem ser estruturais ou bioquímicos. As enzimas como peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PPO), envolvidas no processo de formação da lignina, e da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) que participa da biossíntese de fitoalexinas, assim como o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) e

compostos fenólicos, também são responsáveis pelo controle de patógenos por RSI (CHEN et al., 2000). Segundo Sharma e Nowak (1998), a resistência sistêmica induzida é um processo consequente à promoção de crescimento, possivelmente, dependente da colonização e sensibilização do hospedeiro.

A interação entre microrganismos benéficos e plantas hospedeiras possui grande influência na disponibilidade de nutrientes ou na redução da toxicidade por metais (SMITH, 1994). Estudos indicam que a enzima ácido carboxílico aminociclopropano deaminase (ACCd) é um dos mecanismos pelo qual algumas espécies de *Methylobacterium* promovem o crescimento vegetal (MADHAIYAN et al, 2007a). A presença da ACCd tem sido estudada em várias associações entre bactéria-plantas (BELIMOV et al., 2001; GLICK, 2005). Glick et al. (1998) verificaram que rizobactérias promotoras de crescimento em plantas podem estimular seu crescimento a partir da redução dos níveis de etileno. O gene responsável pela codificação da enzima ACCd é o *acdS*. As bactérias que contêm esse gene são capazes de reduzir aos níveis de etileno produzidos pela planta, ao utilizarem a molécula aminociclopropano-carboxílico deaminase, produzida pela planta durante a rota de sinalização do etileno, como fonte de nitrogênio e outras nutrientes. Deste modo, as bactérias podem ativar o processo de crescimento das plantas, pelo hormônio ácido indol acético e/ou atenuar algum estresse pelo qual a planta esteja passando, pela interrupção da via do etileno (GLICK, 2005).

A elevada concentração de contaminantes no solo pode interferir no desenvolvimento da cultura, causando toxicidade e prejudicando o metabolismo das plantas. Esta redução na toxicidade pode ocorrer pela diminuição na absorção dos metais pesados pelas plantas, processo denominado de biorremediação (VIVAS et al., 2006) ou pela inibição da síntese do etileno, induzida pela presença dos metais pesados no tecido vegetal (MADHAIYAN; POONGUZHALI; AS, 2007b). Qualquer estresse fisiológico, de natureza biótica ou abiótica, leva a biossíntese do etileno pela planta. O etileno é facilmente liberado dos tecidos e se difunde como gás através dos espaços intercelulares para o exterior do tecido. O Chumbo e o cádmio são elementos químicos denominados de metais pesados tóxicos. Estes ocorrem como contaminantes do ambiente e suas concentrações no meio cresceram de acordo com o aumento da atividade industrial e utilização de resíduos da atividade antropogênica, como lodo de esgoto e escórias de siderúrgicas como fonte de nutrientes para as plantas.

2.3 Principais doenças bacterianas da citricultura

A economia brasileira possui no agronegócio citrícola sua principal renda de exportação, entretanto, este segmento agrícola que é um dos mais tradicionais no estado de São Paulo, está em plena crise. Além de fatores como mudanças de mercado, preços baixos, concentração e domínio das indústrias de exportação do suco de laranja concentrado e congelado (SLCC), um grande

problema fitossanitário vem se espalhando com rapidez nas áreas produtoras de citros, o “Greening”, que é causado, também, por bactéria fitopatogênica, assim como a clorose variegada dos citros. Embora, *X. fastidiosa* e *Ca. Liberibacter* sp. ataquem o mesmo hospedeiro, elas possuem estratégias distintas de patogenia e disseminação, mostram especificidade por diferentes tecidos e causam diferentes sintomas, a seguir são abordadas algumas características de cada doença.

2.3.1 “Greening”

A doença “Greening” é considerada a mais destrutiva doença do citros na atualidade, afetando severamente a produção. A falta de um controle eficiente e a rápida disseminação, pelo inseto vetor psílídeo *Diaphorina citri* ou por enxertia, proporcionam grandes perdas. A erradicação total da planta contaminada é a única forma de controle (COLLETA-FILHO, et al, 2004). Não existe variedade de copa ou porta enxerto que seja tolerante ou imune à doença, até porque esta é sistêmica na planta, representando um desafio ao desenvolvimento de variedades resistentes. Os sintomas iniciam-se com o amarelecimento de folhas e ramos, os frutos apresentam maturação irregular, redução do tamanho, deformação e queda. Com o tempo, há desfolhamento gradual com seca e morte dos ramos, inviabilizando a produção (DA GRAÇA, 1991).

Primeiramente, a doença foi relatada na China em 1919, denominada de “Huanglongbing” que significa “doença do ramo amarelo”. Posteriormente, foi descrita na África do Sul, também, no início do século XX, onde recebeu o nome de “Greening” pelo esverdeamento dos frutos. Em março de 2004, a doença foi detectada pela primeira vez no país, na região central do estado de São Paulo e em 2005, no estado da Flórida (BOVÉ, 2006; TEIXEIRA et al., 2005). O agente causador da doença foi visto pela primeira vez, em 1970, por microscopia eletrônica, sendo identificado como uma bactéria Gram-negativa. Até 1990, a microscopia eletrônica foi a técnica utilizada para confirmar a presença da bactéria e detecção de sintomas (TEIXEIRA et al., 2008a). O caráter não cultivável representa um grande obstáculo para o avanço do conhecimento sobre a doença. Atualmente, estão associadas como agentes causadores da doença “Greening” três espécies pertencentes à classe das Alfarproteobacteria, ordem Rhizobiales, família Rhizobiaceae (DODDAPANENI et al., 2008; DUAN et al, 2009). A caracterização das espécies foi baseada em técnicas de DNA, por comparações de sequências da região ribossomal do gene 16S, bem como da região intergênica 16S-23S. O nome *Liberibacter* foi usado para denominar o agente patogênico, o termo *Candidatus* indica que a bactéria ainda não é cultivada de acordo com o “International Code of Nomenclature of Bacteria”, sendo caracterizada, até o momento, essencialmente por técnicas moleculares (HALBERT, MANJUNATH, 2004). A descoberta das variantes fitopatogênicas, se iniciou ao verificar que as cepas originárias da África, se distinguiam

das cepas da Ásia, com base na sensibilidade à temperatura, hibridizações do DNA genômico e sorologia, sendo classificadas em espécies distintas, *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter africanus*. No Brasil, a espécie *Ca. L. asiaticus* foi encontrada em 4% das árvores que apresentavam sintoma de “Greening”, entretanto, nas demais plantas com a presença de sintomas, nada era encontrado. Os iniciadores Oi1(f) e OA1(r) não amplificavam a nova espécie, denominada de *Candidatus Liberibacter americanus* (TEIXEIRA et al., 2005). Novos iniciadores foram desenvolvidos especificamente para esta nova espécie, GB1 (f) e GB3(r). Atualmente, novos iniciadores são utilizados para detectar a presença de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus*. Estes iniciadores, RPLA2 e RPLJ5, se baseiam em um agrupamento de genes que codificam para as proteínas ribossomais K, A, J e L, sendo específicos para a detecção de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus* (TEIXEIRA et al., 2008a).

Todas as espécies causadoras do “Greening” são restritas aos vasos do floema e podem ser encontradas dentro da célula do hospedeiro, sendo a única bactéria fitopatogênica intracelular. Entretanto, estes fitopatógenos não são restritos à citros e são capazes de colonizar os vasos do floema de outras espécies hospedeiras. O fitopatógeno *Ca. L. asiaticus*, nem sempre produz sintomas de doença e pode colonizar a maioria das rutáceas, solanáceas, *Cuscuta campestris* (HALBERT, MANJUNATH, 2004) é capaz de colonizar algumas espécies modelos como vinca (*Catharantus roseus*) e tabaco (*Nicotiana xanthi*).

Após seis anos da primeira detecção de *Ca. L. asiaticus* em pomares de citros, a doença vem se espalhando, progressivamente, no estado de São Paulo. Em abril de 2008, a doença “Greening” estava distribuída em 162 municípios com 18,57% dos talhões avaliados positivos para a doença (BARBOSA et al, 2008). Um programa de monitoramento, detecção e controle foi desenvolvido pelo governo do Estado de São Paulo e executado pelo Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitros. Praticamente, todas as amostras coletadas com sintomas característicos da doença, são confirmadas como positivas para a presença do patógeno por meio da técnica convencional de PCR.

2.3.2 Clorose Variegada dos Citros (CVC)

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma doença causada pela bactéria fastidiosa, gram-negativa, *Xylella fastidiosa*, pertencente a classe das Gamaproteobactéria, família Xanthomonadaceae. As bactérias pertencentes a este grupo se desenvolvem no xilema, que apesar de conter baixas concentrações de compostos orgânicos, é rico em aminoácidos, ácidos orgânicos e íons inorgânicos, essenciais para o desenvolvimento da bactéria (PURCELL; HOPKINS, 1996). Os sintomas característicos da doença são observados principalmente em folhas maduras, pela ocorrência da clorose internerval, como ocorre em plantas com deficiência de zinco. Com o desenvolvimento da doença, surgem ramos afetados, que podem disseminar para a planta inteira,

tornando-a raquítica, reduzindo o tamanho dos frutos e endurecimento da casca, queda das folhas e superbrotamento de ramos (MACHADO et al., 1987; 1992). Os sintomas da doença podem ser confundidos com estresse hídrico e nutricional. A *Xylella fastidiosa* coloniza os vasos do xilema e pela produção de seu exopolissacarídeo, goma xantana, os agregados bacterianos causam a obstrução do vaso. No Brasil, em 1987, foi feita a primeira descrição do surgimento da doença em campo (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990). Após o isolamento e identificação do agente causador da clorose em variedades de laranja doce, verificou-se que o mesmo é encontrado em diversas plantas hospedeiras (LI et al., 2003). A transmissão deste fitopatógeno ocorre através de cigarrinhas de diferentes espécies de acordo com a região geográfica e por enxertia (LOPES, 1996; HE et al., 2000) A *X. fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma seqüenciado (SIMPSON et al., 2000). Avanços importantes no estudo da doença foram alcançados a partir da detecção de genes envolvidos no processo de infecção e colonização e transformação bacteriana (MONTEIRO et al., 2001), frente a utilização de novas espécies hospedeiras como vinca (LACAVA et al.2004) e fumo (LOPES et al., 2000). Todas as cultivares de laranja doce são afetadas pela CVC, independente do porta-enxerto, sendo que períodos de primavera e verão há maior incidência nos pomares citrícolas (LARANJEIRA et al., 1998). O fitopatógeno *X. fastidiosa* causa doença em diversas espécies hospedeiras como ameixeiras, videiras, pessegueiros, pereiras, plantas de café.

2.4 Métodos de estudo da interação bactérias-plantas

A identificação de microrganismos cultiváveis requer culturas puras para estudo qualitativo da morfologia, condição de cultivo, nutrição, bioquímica, metabolismo e ecologia. Os componentes da estrutura celular das bactérias apresentam diferenças significativas na sua natureza química específicas para cada táxon e são empregados na identificação e classificação bacteriana. Embora, as condições de cultivo não alterem sua composição, a constituição do meio de cultivo pode modificar a estrutura química da bactéria (YAMAOKA-YANO; VALARINI, 1998). Somente o genoma não é afetado pelas condições de cultivo, assim, a utilização de técnicas moleculares no estudo da diversidade microbiana é preferida pela confiabilidade, reprodutibilidade e rapidez de execução, além de permitir a identificação de microrganismos não cultiváveis (KIRK et al., 2004).

As técnicas moleculares complementam o que foi caracterizado morfológicamente e fenotipicamente por métodos de cultivo a partir do isolamento. Contudo, a maioria destas técnicas não fornece uma indicação da diversidade funcional microbiana, muito importante em estudos sobre a ecologia dos microrganismos. A principal técnica molecular utilizada em estudos de identificação e classificação de bactérias baseia-se nas diferenças de composição do gene 16S ribossomal (16S rDNA). Este gene é amplamente utilizado em estudos de filogenia, por

apresentar uma taxa de mutação mínima, devido os produtos de sua expressão ser de ordem funcional, ou seja, essenciais para a sobrevivência do organismo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As amostras vegetais, compostas por ramos de laranja doce, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, foram gentilmente fornecidas pela Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura, São Paulo, SP), coletadas em áreas citrícolas da região central do estado de São Paulo (Figura 3.1). De modo a facilitar a compreensão sobre as coletas do material vegetal para a avaliação da comunidade total – “Greening” – e de *Methylobacterium* spp. – CVC –, os estudos foram divididos em:

Estudo 1 - Greening: As amostragens da comunidade bacteriana endofítica foram compostas pelos tratamentos: 1) *Greening* – plantas sintomáticas para a doença e 2) Controle – plantas assintomáticas ou sem os sintomas da doença. Foram realizadas três coletas, sendo que em cada época de coleta, dois locais distintos eram amostrados. Em cada local amostrado, eram coletadas 5 plantas apresentando sintomas da doença e 5 plantas sadias. As informações sobre os locais amostrados, variedades, idades das plantas, períodos de amostragem e identificação dos tratamentos estão contidas na tabela 3.1.

Estudo 2 - CVC: A amostragem da população de *Methylobacterium* spp. presente em plantas sintomáticas para CVC, ocorreu pela adoção dos tratamentos: 1) CVC – plantas exibindo os sintomas da doença e 2) Controle – plantas sadias ou sem os sintomas da doença. O método de amostragem foi o mesmo adotado para o “Estudo 1”, entretanto, foram realizadas apenas duas coletas. Maiores informações sobre as amostragens estão expostas na tabela 3.2.

3.2 Isolamento e Cultivo

O isolamento da comunidade bacteriana endofítica foi realizado utilizando-se a metodologia descrita por Araújo et al. (2002) com algumas modificações. Os ramos amostrados foram fragmentados em pedaços (≥ 1 g) e submetidos a tratamento asséptico. Este processo é composto por 1 minuto em etanol 70%, 3 minutos em hipoclorito de sódio a 2 %, 30 segundos em etanol 70% e duas lavagens em água destilada esterilizada. Uma alíquota de 0,1 mL da última água de lavagem foi semeada sobre meio TSA 10% (Ágar tríptico de soja - “Tryptic soy agar”) suplementado com benomil (50 μ g/mL) para confirmação do processo de desinfecção superficial. Após um período de 30 dias de incubação a 28°C foi avaliado o sucesso do procedimento de assepsia. Os fragmentos desinfestados superficialmente foram triturados em tampão PBS. A suspensão obtida, juntamente com os restos vegetais, foi transferida para tubos Falcon e mantida em agitação por 1 hora a 120 rpm. Para a determinação do número de colônias presentes por grama de tecido amostrado, alíquotas de 0,1 mL da suspensão foram semeadas diretamente sobre

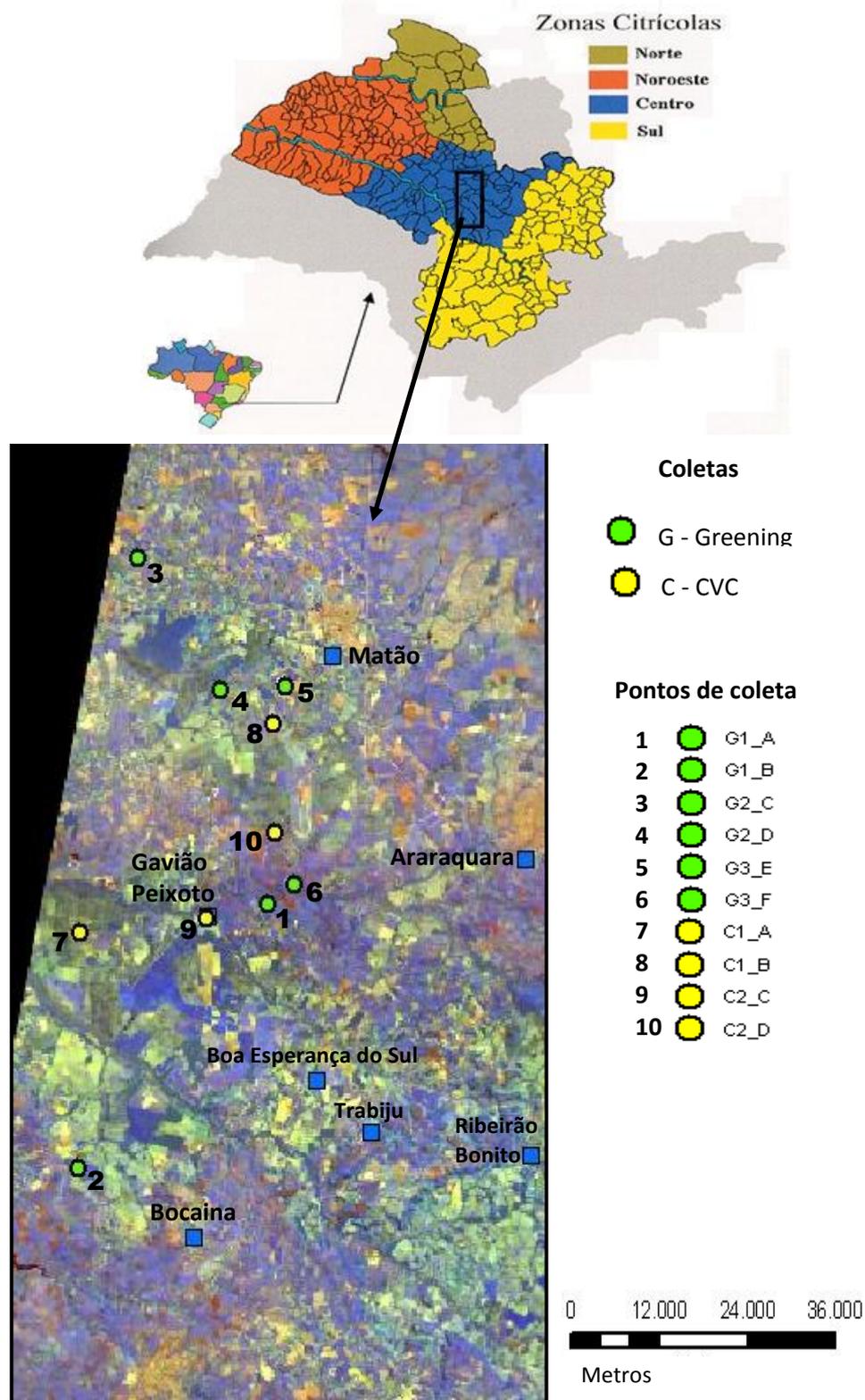


Figura 3.1 – Região central do estado de São Paulo, onde foram realizadas as amostragens de plantas assintomáticas (controle) e sintomáticas para “Greening” e CVC. (Fonte: INPE – Satélite Landsat7-ETM – Cena 220/75 – Zona 22 Sul; Sistema de Coordenadas Geográficas: GCS-South America-1969).

os meios TSA 10% e CHOI (TOYAMA et al., 1998), ambos contendo benomil. Foram feitas diluições a 10^{-1} e 10^{-2} em duplicata. A contagem do número total de colônias desenvolvidas foi realizada após aproximadamente 30 dias de incubação a 28°C.

3.3 Seleção e Manutenção dos Isolados

Foi realizada a seleção aleatória de diversas colônias, incluindo as morfologicamente similares a *Methylobacterium* pela presença da pigmentação rósea em ambos os meios de cultivo utilizados. Após o isolamento primário (Item 3.2), todos os isolados foram purificados por tríplice clonagem, ou seja, uma mesma colônia foi repicada por três vezes, garantindo assim a purificação da mesma. Os isolados foram mantidos em meio TSA 10% e CHOI, líquidos, contendo 20% de glicerol e armazenados em congelador (-80°C).

Tabela 3.1 - Informações sobre as amostragens realizadas para a avaliação da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada a plantas sintomáticas para *Greening* e plantas assintomáticas

Isolamentos	Identificação (Tratamentos)	Município	Variedades (Copa/p.enxerto)	Idade	Período
1º Isolamento	AS ¹ AC ²	Matão - SP	Valência/ Cravo	12 anos	Novembro/08 (chuvoso)
	BS BC	Gavião Peixoto - SP	Valência/ Cravo	16 anos	
2º Isolamento	CS CC	Gavião Peixoto - SP	Valência/ Cravo	14 anos	Fevereiro/09 (chuvoso)
	DS DC	Matão - SP	Valência/ SW ³	11 anos	
3º Isolamento	ES EC	Matão - SP	Valência/ Cravo	12 anos	Maio/09 (seco)
	FS FC	Gavião Peixoto - SP	Valência/ Cravo	12 anos	

¹“S”: Tratamento controle (sem a presença do fitopatógeno *Candidatus Liberibacter* sp.);

²“C”: Tratamento com sintomas da doença *Greening* (presença do fitopatógeno *Candidatus Liberibacter* sp.);

³“SW”: Porta enxerto citrumelo “Swingle”.

3.4 Extração do DNA bacteriano

Para a extração do DNA, 2 mL da suspensão de células na fase de crescimento exponencial (72 horas) em meio CHOI líquido, mantido a 28°C a uma rotação de 120 rpm, foi concentrada por centrifugação a 12000 x g, durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao concentrado de células foi adicionado 500 µL do tampão de extração (1 M de Tris-HCl e 10 M de EDTA – pH=8,0) e 30 µL de SDS 10%. A suspensão foi levada ao termobloco, permanecendo durante 10 min. a 75°C. Em seguida, procedeu-se a limpeza do sobrenadante pela utilização de fenol e clorofórmio e precipitação do DNA pelo emprego de isopropanol e acetato de sódio. A integridade e concentração do mesmo foram verificadas em gel de agarose 1%. O material genético foi mantido em água ultrapura e armazenado a 4°C.

Tabela 3.2 – Informações sobre as amostragens realizadas para a avaliação da população endofítica de *Methylobacterium* spp. associada a plantas sintomáticas para CVC e plantas assintomáticas

Isolamentos	Identificação	Município	Variedades (copa/p.enxerto)	Idade	Período
1° Isolamento	AS ¹ AC ²	Gavião Peixoto - SP	Valência/ Cleópatra	12 anos	Fevereiro/09 (chuvoso)
	BS BC	Matão - SP	Valência/ Cravo	12 anos	
2° Isolamento	CS CC	Gavião Peixoto - SP	Natal/ Cleópatra	8 anos	Maio/09 (seco)
	DS DC	Matão - SP	Valência/ Cravo	12 anos	

¹“S”: Tratamento controle (sem a presença do patógeno *X. fastidiosa*);

²“C”: Tratamento com sintomas da clorose variegada dos citros (presença do fitopatógeno *X. fastidiosa*).

3.5 Identificação dos isolados por sequenciamento do gene 16S DNAr

A variabilidade genética foi analisada a partir da amplificação dos genes 16S rDNA pelos iniciadores R1378 e P027F (Tabela 3.3), que geram um fragmento de aproximadamente 1400pb (HEUER et al., 1997). A reação foi realizada em volume de 50 µL, composta por 3,75 Mm de MgCL₂; 0,2 mM de dNTPs; 0,2 µM de cada iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Após o

processo de amplificação, o produto de PCR foi analisado em gel a 1%, juntamente com o marcador molecular DNA *Ladder* para a confirmação do tamanho do fragmento. Alternativamente, realizou-se a amplificação do 16S rDNA por PCR direto da colônia bacteriana, sem ocorrer o processo de extração de DNA, conforme Ferreira et al. (2008). A colônia selecionada foi transferida para microtubos contendo 200 µL de água deionizada ultra-pura esterilizada. Para a ocorrência da amplificação foi utilizado 1 µL da suspensão bacteriana.

3.6 Detecção dos fitopatógenos nas amostras vegetais

3.6.1 *Candidatus Liberibacter americanus* e *Ca. L. asiaticus/africanus*

Após a assepsia da amostra vegetal, esta foi fragmentada por várias vezes com auxílio de uma lâmina, até atingir consistência pastosa. O extrato vegetal foi homogeneizado com 3 mL de tampão de extração (CTAB) adicionado com 0,2% de β-mercaptoetanol. O procedimento para extração do DNA foi realizado conforme a metodologia descrita por (TEIXEIRA et al., 2008) com algumas modificações. Entretanto, para a detecção de ambas as linhagens causadoras da doença *Greening* foram utilizados os iniciadores GB1 e GB3 para a identificação de *Ca. L. americanus* (TEIXEIRA et al., 2005) e RPLA2 e RPLJ5 para *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus* (HOCQUELLET et al., 1999), que possuem um tamanho de fragmento de 1027pb, 701pb e 667pb, respectivamente (Tabela 3.3). A metodologia usada para a amplificação do 16S rDNA foi adotada segundo descrito nas respectivas referências literárias citadas acima. Amostras sintomáticas para *Greening* foram usadas como controle positivo.

3.6.2 *Xylella fastidiosa*

O pecíolo e nervura central foram pesados e após assepsia superficial, segundo a metodologia de Araújo et al. (2002b), estes foram seccionados e triturados em almofariz contendo 3 mL de tampão de extração (CTAB) e 5% de polivilpirrolidona. Adotou-se a metodologia de Minsavage et al. (1994) para a extração do DNA. Para confirmar a ausência de *X. fastidiosa* nas amostras vegetais assintomáticas para CVC, seguiu-se a metodologia desenvolvida por Pooler & Hartung (1995). Utilizaram-se os iniciadores CVC-1 e 272-2-int (Tabela 3.3) que amplificam um fragmento de 500 pb, específico para *X. fastidiosa* em citros. A reação da PCR foi realizada com volume de 50 µL, contendo 2 µL de DNA total, 0,4 µmol/L dos iniciadores, 200 µmol/L de dNTPs, 3,75 µmol/L de MgCl₂, 5U de Taq DNA polimerase. Amostras vegetais sintomáticas para CVC foram utilizadas como controle positivo.

Tabela 3.3 – Informações sobre os iniciadores utilizados.

Iniciadores	DNA alvo	Sequência 5' → 3'
R1378	16S DNAr	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
P027F		GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
GB1	<i>Ca. L. americanus</i>	AAGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT
GB3		CCAACTTAATGATGGCAAATATAG
RPLA2	<i>Ca. L. asiaticus</i>	TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT
RPLJ5	<i>Ca. L. africanus</i>	ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA
CVC-1	<i>Xylella fastidiosa</i>	AGATGAAAACAATCATGCAAA
272-int		GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT

3.7 Avaliação da produção da ácido carboxílico aminociclopropano deaminase (ACCd) pelos isolados de *Methylobacterium* sp.

O teste para verificar a produção da enzima ACC deaminase foi realizado de acordo com (MADHAIYAN, POONGUZHALI & SA, 2007) com algumas modificações. O meio utilizado foi o CHOI modificado, pela ausência do composto $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Inicialmente, os isolados cresceram em meio CHOI líquido padrão por um período de 20 dias até a obtenção de uma densidade ótica próxima a 1,0 nm ($\text{OD}_{600} = 0,8 \sim 1,1$). Em seguida esses isolados foram repicados em placas contendo o meio CHOI suplementado com o ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico (ACC) como única fonte de nitrogênio, na concentração de 3 Mm. Para efeito de comparação do desenvolvimento das colônias foi utilizado como controle o meio CHOI padrão, inoculado com os mesmos isolados. As placas foram incubadas por um período de 30 dias a 28°C e ao término, realizou-se a contagem das colônias presentes no meio CHOI contendo a molécula ACC.

3.8 Determinação da tolerância aos metais pesados cádmio (Cd) e chumbo (Pb) pelos isolados de *Methylobacterium* sp.

A determinação da tolerância dos isolados aos metais pesados tóxicos Cd e Pb foi realizada em meio CHOI contendo as concentrações de 2,5; 5,0 e 10 mM de CdSO_4 e de PbNO_3 . As concentrações dos metais foram baseadas no estudo de Madhaiyan *et al.* (2007). Os isolados foram repicados sobre o meio semi-seletivo suplementado com as diferentes concentrações de cádmio e chumbo permaneceram incubadas a 28°C e o crescimento bacteriano foi avaliado ao final de 30 dias e comparado ao controle (meio CHOI).

3.9 Análise estatística

Devido à impossibilidade em se determinar todas as variáveis presentes durante os períodos de amostragem dentro de uma extensa região citrícola (Figura 3.1), a escolha de um delineamento experimental ou mesmo um esquema de desdobramentos fatoriais para posterior análise de variância tornou-se inviável pelo não ajustamento dos desvios e a não obtenção de diferenças entre os tratamentos. Assim, os dados dos isolamentos, representados pelas unidades formadoras de colônias (UFCs) em relação ao peso (gramas) do tecido vegetal foram transformados por $\log_{10}(x+1)$ para a normalização dos dados. O erro padrão da média das UFCs foi aplicado ao valor a 10%.

A análise das sequências parciais do gene 16S rDNA foram comparadas com o banco de dados (GenBank) do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (National Center for Biotechnology Information - NCBI). Posteriormente, as sequências foram alinhadas e analisadas filogeneticamente pelo programa MEGA 3.1. As sequências dos isolados foram analisadas e agrupadas filogeneticamente com as sequências mais similares presentes no banco de dados pelo programa RDPQuery (http://simo.marisci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm). O índice de rarefação adotado para análise filogenética foi criado pelo programa computacional DOTUR que gerou diferentes níveis de similaridade entre as sequências de nucleotídeos da região 16S DNAr dos isolados agrupados em diferentes filotipos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das espécies endofíticas de *Methylobacterium* spp. associadas a plantas assintomáticas e sintomáticas para *Greening* e CVC.

Neste estudo, o meio TSA 10%, usado no isolamento de bactérias tanto aeróbias estritas quanto as facultativas, foi utilizado para análise da comunidade bacteriana total endofítica presente em plantas sintomáticas para “Greening” e assintomáticas. O meio CHOI, semi seletivo para metilotróficas, foi empregado para obtenção de *Methylobacterium*, tanto no estudo aplicado a “Greening”, quanto a CVC, plantas doentes e saudáveis. Entretanto, o número de colônias róseas obtidas em meio TSA 10% foi bem superior ao encontrado em meio CHOI (Figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4), que possui em sua composição somente sais minerais e metanol como única fonte de carbono. Deste modo, a ocorrência de colônias róseas, caráter ligado à *Methylobacterium*, foi verificada em ambos os meios de cultura. Esta circunstância se deve ao meio TSA ser um composto rico em triptona e peptona, fonte rápida e de fácil assimilação do carbono presente em carboidratos, lipídios e o nitrogênio em proteínas, permitindo que as bactérias se desenvolvam rapidamente.

Os valores atribuídos ao número total de colônias e ao número total de colônias róseas correspondem à contagem das colônias totais e as colônias com a referida morfologia, respectivamente. Os dados de frequência se referem ao número de colônias róseas em relação às colônias totais. Pela análise do número total de unidades formadoras de colônias (UFCs), obtidas em meio TSA 10% (Figura 4.1) foi possível observar que não houve diferença expressiva para os tratamentos plantas sintomáticas associadas à “Greening” e assintomáticas e, também, para outros fatores que pudessem vir a influenciar a comunidade bacteriana cultivável como local de amostragem (Matão, SP e Gavião Peixoto, SP) e época de amostragem (período chuvoso e seco). O número total de colônias róseas e a frequência destas foram expressamente maiores em plantas sintomáticas para “Greening”, sendo que o último isolamento, realizado durante o período seco, também apresentou valores maiores em relação aos demais isolamentos ocorridos em período chuvoso (Figuras 4.1 e 4.2). Deste modo, pode ser considerada que além da variável doença, o período seco, ambos agentes de estresse para as plantas, tenham possivelmente, favorecido a comunidade metilotrófica. Segundo Araújo et al. (2001), a presença de um determinado endófito pode favorecer a presença do patógeno ou de outro microrganismo endófito, alterando a estrutura da comunidade.

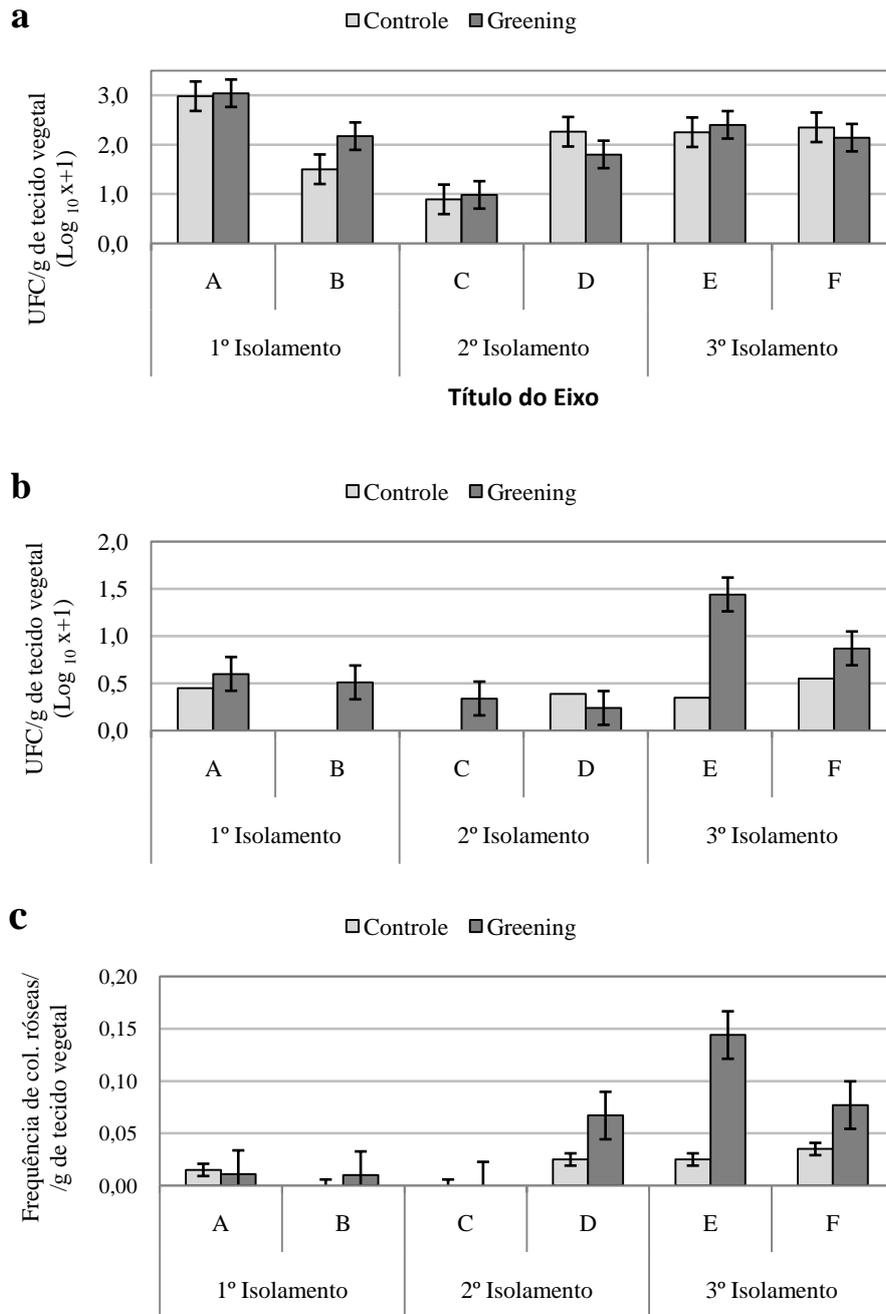


Figura 4.1 – Total de unidades formadoras de colônias (UFCs) bacterianas presentes em fragmentos de ramos de citros com sintomas de “Greening” e assintomáticos (controle) sobre meio de cultura TSA 10% (a); total de unidades formadoras de colônias róseas desenvolvidas sobre meio TSA 10% (b); frequência de colônias róseas (c). Valor do erro padrão da média a 10%. (Locais: A, D e E: Matão, SP; B, C e F: Gavião Peixoto, SP.)

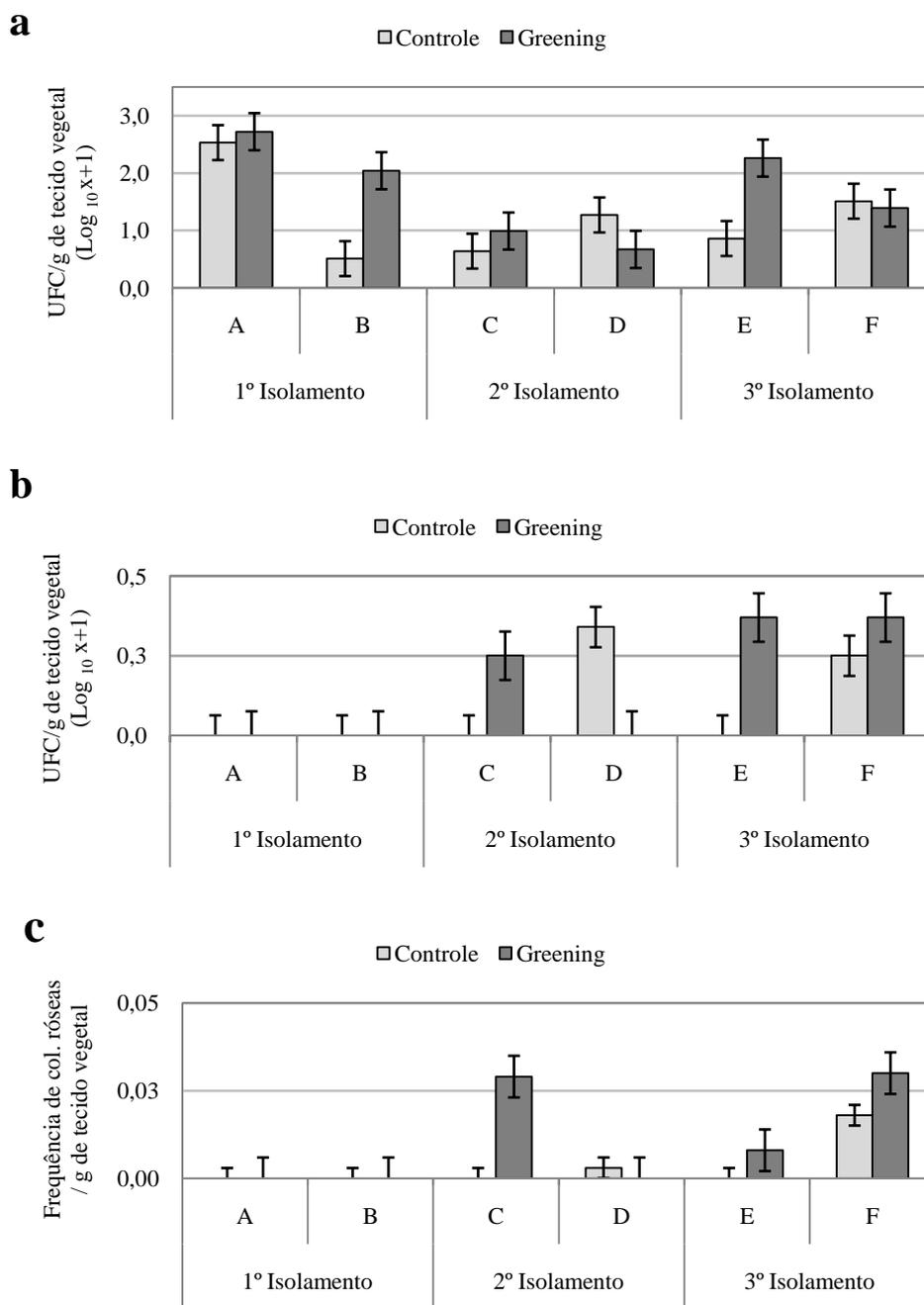


Figura 4.2 – Total de unidades formadoras de colônias (UFCs) bacterianas presentes em fragmentos de ramos de citros com sintomas de “Greening” e assintomáticos (controle) sobre meio de cultura CHOI (a); total de unidades formadoras de colônias róseas desenvolvidas sobre meio CHOI (b); frequência de colônias róseas (c). Valor do erro padrão da média a 10%. (Locais A, D e E: Matão, SP.; B, C e F: Gavião Peixoto, SP.)

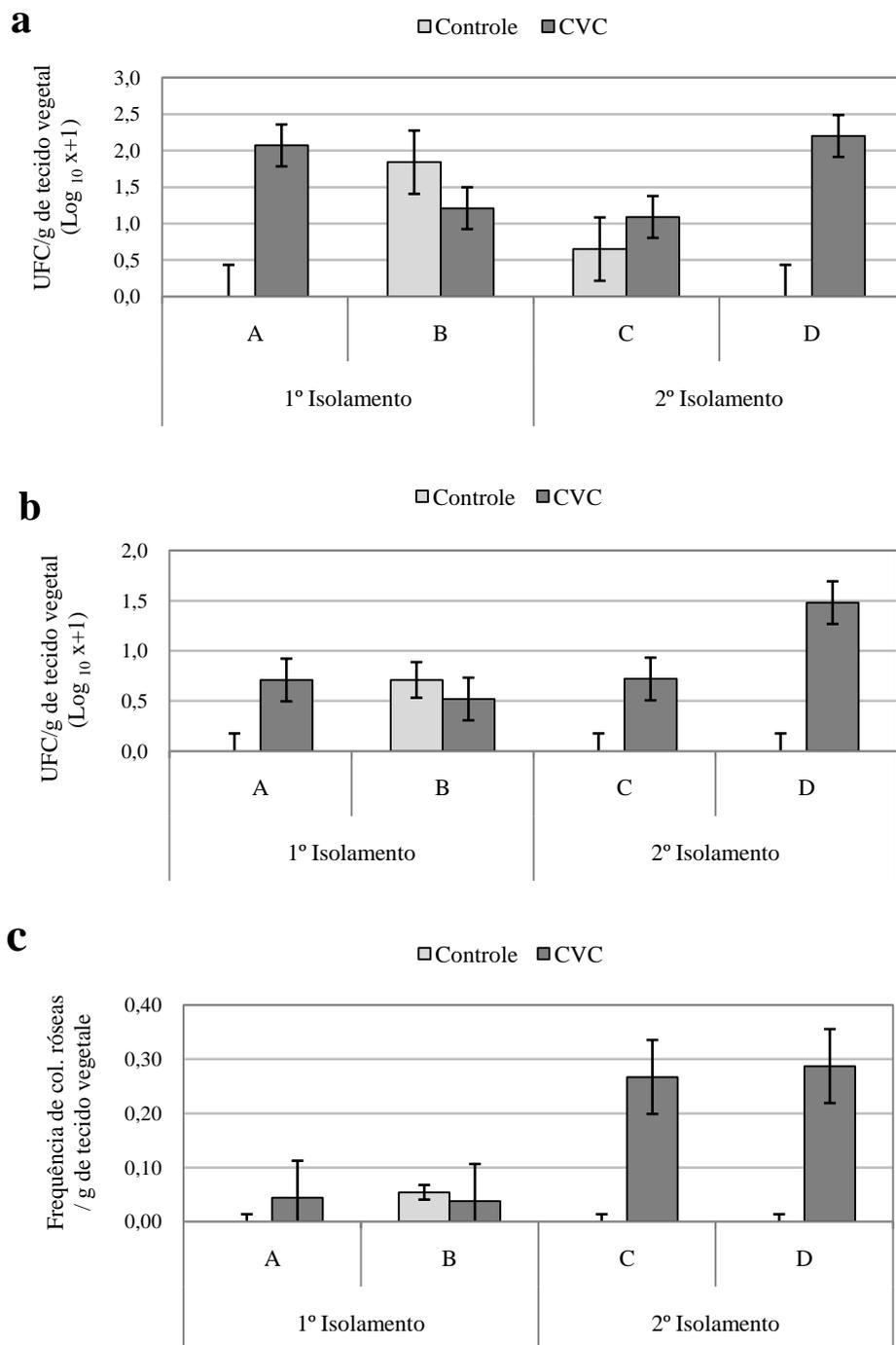


Figura 4.3 – Total de unidades formadoras de colônias (UFCs) bacterianas presentes em fragmentos de ramos de citros com sintomas de CVC e assintomáticos (controle) sobre meio de cultura TSA 10% (a); total de unidades formadoras de colônias róseas desenvolvidas sobre meio TSA 10% (b); frequência de colônias róseas (c). Valor do erro padrão da média a 10%. (Locais A e C: Gavião Peixoto; B e D: Matão, SP.)

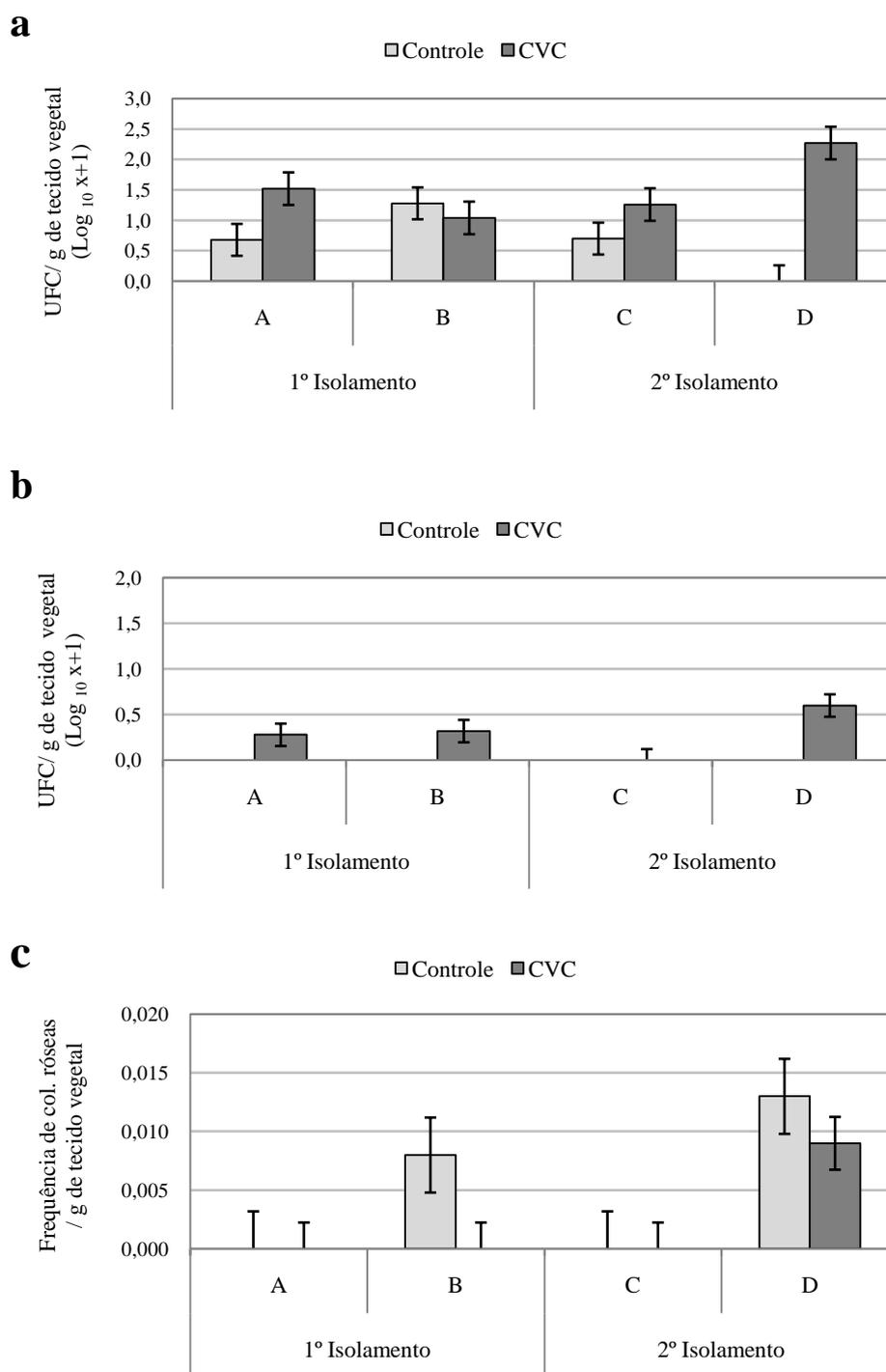


Figura 4.4 – Total de unidades formadoras de colônias (UFCs) bacterianas presentes em fragmentos de ramos de citros com sintomas de CVC e assintomáticos (controle) sobre meio de cultura CHOI (a); total de unidades formadoras de colônias róseas desenvolvidas sobre meio CHOI (b); frequência de colônias róseas (c). Valor do erro padrão da média a 10%. (Locais A e C: Gavião Peixoto, SP.; B e D: Matão, SP.)

Embora, o objetivo fosse avaliar apenas a ocorrência de *Methylobacterium* em plantas sadias e com sintomas de CVC, os resultados observados quanto à obtenção de colônias róseas no estudo “Greening”, fizeram com que o meio a TSA 10% também fosse empregado neste estudo, assim como o meio CHOI. Após a contagem, novamente, o número de colônias róseas foi maior em meio TSA 10% (Figura 4.3).

Confirmando os resultados obtidos no estudo anterior, o número de colônias róseas e a sua frequência foram consideravelmente maiores em plantas com sintomas para CVC. O último isolamento do estudo CVC realizado em período seco, também, evidenciou a maior presença de colônias róseas (Figuras 4.3 e 4.4). Estes resultados comprovam os obtidos no estudo “Greening” quanto à prevalência do grupo metilotrófico em condições de estresse vegetal. Estudos anteriores verificaram que o gênero *Methylobacterium* é um endófito dominante em citros e devido à frequência de isolamento em plantas sintomáticas para CVC é possível que haja alguma interação deste endófito com *X. fastidiosa* (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; SANTOS et al., 2005).

A verificação da presença dos patógenos: *Candidatus Liberibacter americanus*, *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. africanus* e *X. fastidiosa*, agentes causais das doenças “Greening” e CVC, respectivamente, foi realizada pela técnica PCR, utilizando as amostras do DNA total e os “primers” específicos para fitopatógenos (Tabela 3.3). Do total de 60 amostras sintomáticas para “Greening”, em 71% destas houve a confirmação da presença do patógeno, sendo que 45 amostras corresponderam a *Ca. L. americanus* e as 26 restantes a *Ca. L. asiaticus* ou *Ca. L. africanus*, já que não foi possível verificar pela presença da banda em gel a 1% qual era a linhagem patogênica. Os resultados confirmaram que em 94% das amostras com sintomas de CVC havia a presença de *X. fastidiosa*. As plantas sintomáticas para “Greening” e CVC que não foram positivas para a presença do agente fitopatogênico foram consideradas para o estudo, já que estas apresentavam, assim como as demais, os mesmos sintomas para as referentes doenças. É possível que a presença do patógeno não tenha sido detectada devido a algum erro no processo de preparação da amostra para a realização da PCR. As plantas assintomáticas para ambos os estudos, “Greening” e CVC, também passaram pelo teste de detecção do patógeno, entretanto, nenhuma das amostras se mostrou positiva para a presença do mesmo.

Das 238 colônias róseas totais de ambos os experimentos “Greening” e CVC, foram amostradas aleatoriamente um total de 106 bactérias, isoladas de fragmentos de ramos de citros com ausência e presença de sintomas relacionados às respectivas doenças. As sequências nucleotídicas obtidas pelos isolados de coloração rósea foram comparadas às presentes no banco de dados do “GenBank” (NCBI) pela utilização do programa BLASTn e alinhadas por meio do programa MEGA 3.1 (Tabelas 4.1 e 4.2). O estudo “Greening” revelou, pela análise e identificação das amostras viáveis, uma comunidade endofítica cultivável de 124 isolados. O gênero *Methylobacterium*, pertencente à classe das α -proteobactérias, correspondeu a 45% do

total de isolados, sendo que 41 destes foram isolados de plantas sintomáticas para a doença “Greening”. O número referente à população endofítica total de *Methylobacterium*, presente no estudo CVC, foi de 50 isolados. Destes 40 isolados foram provenientes de plantas sintomáticas para CVC. Posteriormente, as mesmas sequências utilizadas no programa BLASTn para a identificação dos isolados, foram afiliadas filogeneticamente pela comparação com o banco de dados do “Ribossomal Database Project”, a partir do programa “RDPQuery”, e distribuídas em grupos cuja a similaridade entre as sequências do mesmo é superior a 99%.

Assim, as 106 sequências nucleotídicas de *Methylobacterium* avaliadas pelo programa RDPQuery, foram distribuídas nos 13 filotipos ou grupos gerados (Figura 4.5). As sequências de *Methylobacterium* referentes a cada grupo filogenético foram então distribuídas à sua origem: local de amostragem (Matão, SP ou Gavião Peixoto, SP) e plantas assintomática e sintomática para “Greening” ou CVC. Pela observação dos resultados de agrupamento percebe-se que os grupos I e III predominaram em todos os isolamentos realizados. Os isolados inerentes a estes grupos foram identificados como *M. fujisawaense* e *M. radiotolerans*, respectivamente, pois apresentaram melhor correspondência quanto à similaridade entre as sequências dos isolados e as presentes nos bancos de dados “GenBank” (NCBI). Isto, possivelmente, indica que essas espécies possuem um importante papel na ecologia de citros.

A diversidade de *Methylobacterium*, atribuída pela presença de diferentes grupos filogenéticos, foi menor nos dois primeiros isolamentos do estudo “Greening”, ocorridos em período chuvoso. O último isolamento, realizado durante a estiagem, apresentou um total de oito grupos filogenéticos, ou seja, maior diversidade de espécies metilotróficas em relação aos demais isolamentos (Figura 4.6). O estudo da diversidade de metilotróficas em plantas com CVC e seus controles, não apresentou diferença expressiva entre os períodos amostrados (chuvoso e seco) (Figura 4.7). A avaliação da diversidade de *Methylobacterium* presente em plantas doentes e sadias para “Greening” e CVC indicou que esta é superior em plantas sintomáticas para ambas as doenças (Figuras 4.8 e 4.9).

As espécies *M. rhodesianum* que apresentou similaridade filogenética próxima aos grupos de isolados IV e IX, assim como *M. phyllosphaerae* com similaridade para o grupo X foram isoladas apenas de plantas sintomáticas para as doenças “Greening” e CVC. Os grupos filogenéticos como V e XIII com similaridades correspondentes as espécies *M. persicinum* e *M.*

Tabela 4.1 – Identificação relativa aos 56 isolados endofíticos de *Methylobacterium* spp. encontrados em ramos de citros com sintomas de “Greening” e assintomáticos.

(continua)

Isolados	Local (Município)	Plantas sintomáticas			
		Grupo ¹	Espécie ²	% ³	Nº de acesso ⁴
H1R/A	A (Matão, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	95%	GQ181028.1
H3R/A				95%	
H4R/A				91%	
H2R/A				96%	
H5R/A				97%	
H1R/B	B (Gavião Peixoto, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	90%	GQ181028.1
H2R/B				90%	
H1R/C	C (Matão, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	90%	AB558132.1
H3R/C				93%	
H4R/C				97%	
H2R/C				90%	
H1R/D	D (Gavião Peixoto, SP)	X	<i>M. phyllosphaerae</i>	95%	EF126746.2
H1R/E	E (Matão, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	89%	AB558132.1
H3R/E				89%	
H5R/E				97%	
H6R/E				94%	
H8R/E				96%	
H15R/E				92%	
H16R/E				98%	
H17R/E				88%	
H18R/E				81%	
H4R/E				97%	
H9R/E				90%	
H2R/E				83%	
H7R/E				91%	
H11R/E				89%	
H21R/E				93%	
H10R/E				94%	
H12R/E				88%	
H13R/E				87%	
H14R/E				90%	
H19R/E				89%	
H20R/E	91%				
H2R/F	F (Gavião Peixoto, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	96%	AB558142.1
H8R/F				96%	
H3R/F				85%	
H6R/F				88%	
H1R/F				98%	
H5R/F				92%	
H4R/F				88%	
H7R/F				96%	
H7R/F				96%	

¹ Grupo o qual o referente isolado foi inserido pela análise de agrupamentos filogenéticos com similaridade acima de 99%; ² Espécie atribuída ao isolado a partir do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr e análise via BLASTn (GenBank); ³ Índice de similaridade encontrada a partir do alinhamento realizado via BLASTn; ⁴ Número de acesso referente à espécie indicada pelo GenBank (NCBI).

Tabela 4.1 – Identificação relativa aos 56 isolados endofíticos de *Methylobacterium* spp. encontrados em ramos de citros com sintomas de “Greening” e assintomáticos.

(conclusão)

Isolados	Local (Município)	Plantas assintomáticas			
		Grupo ¹	Espécie ²	% ³	Nº de acesso ⁴
S1R/A	A (Matão, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	90%	GU294332.1
S1R/D				91%	
S5R/D				94%	
S6R/D				95%	
S7R/D	D (Matão, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	92%	AB558142.1
S8R/D				92%	
S3R/D				96%	
S4R/D				82%	
S2R/D		XX	<i>M. isbiliense</i>	91%	GQ354269.1
S2R/E	E (Matão, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	87%	AB558142.1
S3R/E				85%	
S1R/E				95%	
S4R/F				95%	
S5R/F	F (Gavião Peixoto, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	92%	DQ447777.1
S7R/F				93%	
S6R/F				96%	
				VII	

¹ Grupo o qual o referente isolado foi inserido pela análise de agrupamentos filogenéticos com similaridade acima de 99%; ² Espécie atribuída ao isolado a partir do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr e análise via BLASTn (GenBank); ³ Índice de similaridade encontrada a partir do alinhamento realizado via BLASTn; ⁴ Número de acesso referente à espécie indicada pelo GenBank (NCBI).

isbiliense, respectivamente, foram isolados apenas de plantas sintomáticas para “Greening”. Outros grupos filogenéticos VIII e XII foram encontrados somente em plantas com sintomas de CVC, entretanto a baixa similaridade encontrada com as espécies conhecidas presentes no banco de dados, não permitiu nenhuma associação (Tabelas 4.1 e 4.2; Figuras 4.8 e 4.9).

Pela observação dos grupos filogenéticos distribuídos nos gráficos 4.6 e 4.7, verifica-se que os grupos IV, V, VII e XIII foram encontrados apenas nos isolamentos referentes ao estudo da diversidade em “Greening”, e não foram encontrados nos isolamentos relacionados ao estudo da diversidade metilotrófica em CVC. Entretanto, ao analisarmos a correspondência destes isolados às espécies do banco de dados, notamos que alguns grupos são similarmente próximos a uma mesma espécie, contudo a baixa semelhança entre as sequências nos leva a considerar a possibilidade de espécies divergentes.

Após a identificação das sequências nucleotídicas dos isolados de citros e alinhamento com as sequências existentes no banco de dados “GenBank” (NCBI), a inferência filogenética foi gerada pelas correlações de similaridades entre as sequências, analisadas pelo programa MEGA 3.1. O método de agrupamento utilizado foi o Neighbor-joining e as sequências conhecidas de *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium radiobacter* foram utilizadas como grupo externo, para o

Tabela 4.2 – Identificação relativa aos 50 isolados endofíticos de *Methylobacterium* spp. encontrados em ramos de citros com sintomas da clorose variegada do citros (CVC) e assintomáticos.

(continua)

Isolados	Local (Município)	Plantas sintomáticas							
		Grupos ¹	Espécie ²	% ³	Nº de acesso ⁴				
Y7R/A	A (Gavião Peixoto, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	85%	AB558142.1				
Y9R/A				89%					
Y10R/A				84%					
Y8R/A				85%		GQ181028.1			
Y5R/A				III		<i>M. radiotolerans</i>	85%	D32227.1	
Y3R/A				VI		<i>M. rhodesianum</i>	88%	HM245434.1	
Y4R/A							85%		
Y1R/A				VIII		<i>M. zatmaii</i>	84%	GU294335.1	
Y2R/A							87%		
Y6R/A				IX		<i>M. rhodesianum</i>	85%	HM245434.1	
Y3R/B	B (Gavião Peixoto, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	95%	AB558142.1				
Y2R/B				III	<i>M. radiotolerans</i>	89%	HM192796.1		
Y4R/B						91%	CQ181028.1		
Y1R/B				IX	<i>M. rhodesianum</i>	93%	HM245434.1		
Y1R/C						91%			
Y2R/C	C (Gavião Peixoto)	I	<i>M. fujisawaense</i>	96%	AB558142.1				
Y6R/C				97%					
Y7R/C				87%					
Y9R/C				89%					
Y8R/C				88%		AB175634.1			
Y5R/C				II		<i>M. fujisawaense</i>	91%	CQ181028.1	
Y3R/C				III		<i>M. radiotolerans</i>	93%	HM163547.1	
Y4R/C							91%		
Y1R/D				D (Matão, SP)		I	<i>M. fujisawaense</i>	88%	AB558142.1
Y4R/D								85%	
Y6R/D	86%								
Y10R/D	86%								
Y12R/D	91%								
Y15R/D	91%								
Y16R/D	96%								
Y3R/D	92%	NR025374.1							
Y9R/D	90%	GB181028.1							
Y14R/D	84%	DQ447777.1							
Y11R/D			90%	HM192796.1					
Y18R/D	III	<i>M. radiotolerans</i>	90%	HM163547.1					
Y19R/D			90%	D32227.1					
Y7R/D	IV	<i>M. rhodesianum</i>	88%	HM245434.1					

¹ Grupo o qual o referente isolado foi inserido pela análise de agrupamentos em filograma com similaridade acima de 99%; ² Espécie atribuída ao isolado a partir do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr e análise via BLASTn (GenBank); ³ Índice de similaridade encontrada a partir do alinhamento realizado via BLASTn; ⁴ Número de acesso referente à espécie indicada pelo GenBank (NCBI).

Tabela 4.2 – Identificação relativa aos 50 isolados endofíticos de *Methylobacterium* spp. encontrados em ramos de citros com sintomas da clorose variegada do citros (CVC) e assintomáticos.

(conclusão)

Plantas sintomáticas					
Isolados	Local (Município)	Grupo1	Espécie2	%3	Nº de acesso
Y17R/D	D (Matão, SP)	X	<i>M. phyllosphaerae</i>	90%	EF126746.2
Y13R/D		XI	<i>M. fujisawaense</i>	90%	AB558142.1
Y5R/D		XII	<i>M. phyllosphaerae</i>	83%	EF126746.1
Plantas assintomáticas					
Isolados	Local (Município)	Grupo1	Espécie2	%3	Nº de acesso
N3R/B	B (Gavião Peixoto, SP)	I	<i>M. fujisawaense</i>	95%	AB558142.1
N4R/B				97%	
N6R/B				97%	
N7R/B				95%	
N8R/B				90%	
N9R/B				93%	
N1R/B	C (Gavião Peixoto, SP)	III	<i>M. radiotolerans</i>	92%	GU294333.1
N5R/B					CQ354269.1
N2R/B				XI	<i>M. fujisawaense</i>
N1R/C		III	<i>M. radiotolerans</i>	91%	HM163547.1

¹ Grupo o qual o referente isolado foi inserido pela análise de agrupamentos em filograma com similaridade acima de 99%; ² Espécie atribuída ao isolado a partir do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr e análise via BLASTn (GenBank); ³ Índice de similaridade encontrada a partir do alinhamento realizado via BLASTn; ⁴ Número de acesso referente à espécie indicada pelo GenBank (NCBI).

enraizamento da árvore (Figura 4.10). A árvore filogenética foi dividida em três grupos, onde a maioria dos isolados associados a citros, representados pelos grupos filogenéticos I, III e VII, se encontram próximos às espécies *M. fujisawaense*, *M. komagatae* e *M. radiotolerans* e *M. tardum*, localizadas no grupo 1. A análise filogenética apresentada na árvore nos revela, pelos baixos valores de reamostragens ou “bootstrap” e a quase ausência de grupos monofiléticos, que houve baixa correlação entre os grupos de isolados e as sequências conhecidas. Possivelmente, as espécies do gênero *Methylobacterium* não estão totalmente representadas e exista consideráveis variações inter e intra espécies de *Methylobacterium* que podem se manifestar em novas espécies e/ou em linhagens.

Apenas um isolado pertencente ao grupo V, formou um agrupamento monofilético com a espécie *M. percisimum* em uma reamostragem de 87%. Este isolado foi encontrado em plantas sintomáticas para “Greening”. Um estudo avaliou a diversidade de *Methylobacterium* isoladas de diferentes espécies vegetais, buscando entender a filogenia dos isolados em associação ao hospedeiro. Segundo Dourado et al. (2010), os resultados mostraram que a diversidade de *Methylobacterium* sp. presente em determinado hospedeiro, está ligada em parte ao genótipo da planta e em parte a eventos estocásticos. Dentre os fatores aleatórios que podem alterar a comunidade de um ambiente, podemos considerar a presença de um população endofítica

(ANDREOTE et al., 2004) e patógenos (ARAÚJO et al., 2002). Contudo, devemos destacar que esta estrutura não é estável, e sim, sensível as alterações do ambiente, buscando sempre o equilíbrio diante das mudanças de ordem biótica ou abiótica (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990).

4.2 Identificação da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada a plantas assintomáticas e sintomáticas para “Greening”

A diversidade bacteriana endofítica cultivável total, excluindo o gênero *Methylobacterium*, foi isolada em meio TSA10%. A partir do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr, análise das sequências viáveis e comparação destas com as sequências conhecidas e disponíveis no banco de dados “GenBank” foi possível caracterizar 68 isolados originários de plantas assintomáticas e sintomáticas para “Greening” (Tabela 4.3). As referidas sequências, também foram afiliadas pelo programa RDPQuery com as sequências presentes no banco de dados do “Ribosomal Database Project”. Adotando uma similaridade de 99%, indicada pela curva de rarefação, as sequências foram distribuídas em 22 grupos (Figura 4.11). Estes grupos representam 15 gêneros, dois deles não identificados. Alguns gêneros apresentaram maior correspondência de similaridade para determinadas espécies, entretanto, essas espécies foram representadas por mais de um grupo, indicando que podem se tratar de espécies distintas pelo baixo valor de similaridade (Tabela 4.3).

Avaliando os resultados obtidos pelas análises filogenéticas e classificando-as em classes filogenéticas foi observada a ocorrência de cinco classes: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria e Firmicutes (Tabela 4.3). Em todos os isolamentos, considerando os locais de amostragem (Matão, SP e Gavião Peixoto, SP) e os tratamentos plantas sadias e doentes, a classe mais freqüente foi a Alphaproteobactéria, seguida pela Gamaproteobactéria. Araújo et al., (2001; 2002) verificaram, por isolamento, a presença dos gêneros *Bacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Curtobacterium* e *Nocardia*. Posteriormente, se verificou que alguns gêneros podem interagir com *X. fastidiosa*. A elevada freqüência de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* como endófito de plantas assintomáticas infectadas com *X.fastidiosa* sugerem que este endófito pode interagir na redução de sintomas causados pelo fitopatógeno.

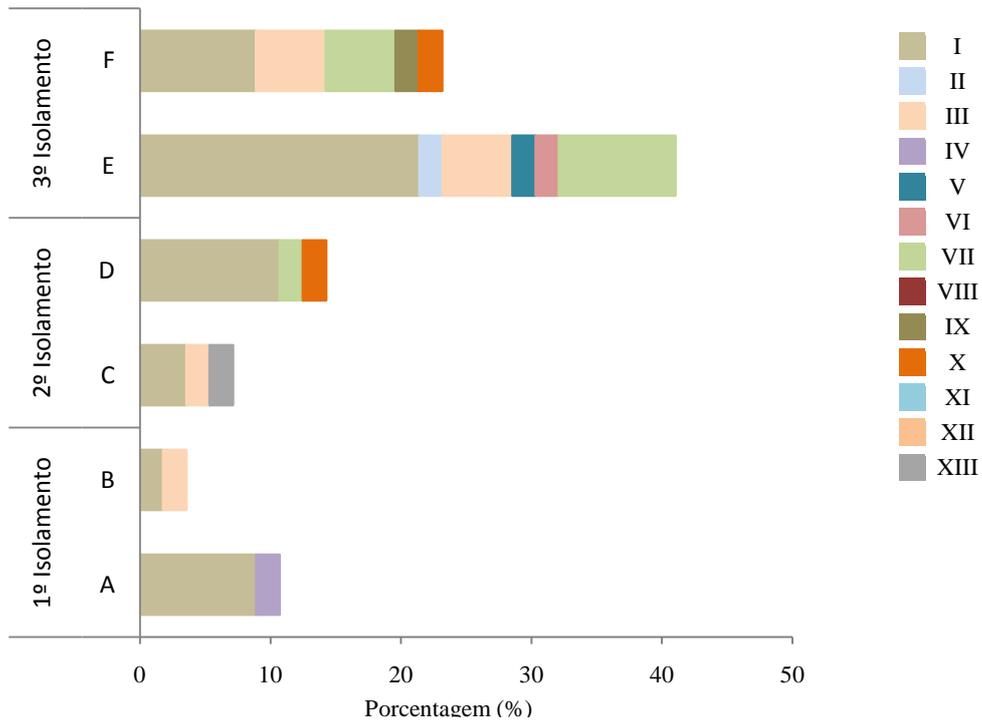


Figura 4.5 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Methylobacterium* spp. por locais de amostragem (Locais A, D e E – Matão, SP; B, C e F – Gavião Peixoto, SP.) a partir dos isolamentos do estudo “Greening”.

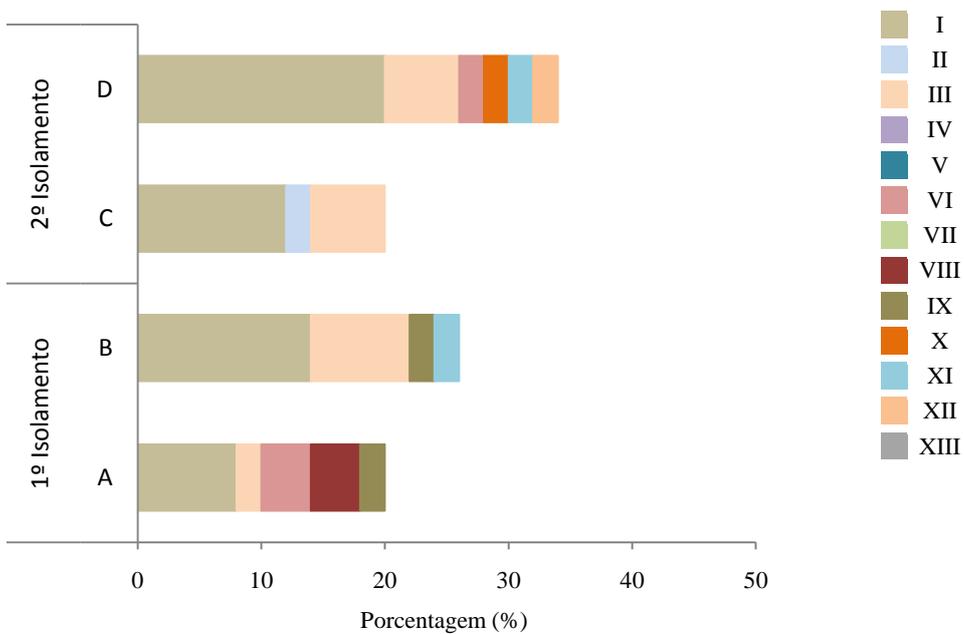


Figura 4.6 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Methylobacterium* spp. por locais de amostragem (Locais: A e C – Gavião Peixoto, SP.; B e D – Matão, SP) a partir dos isolamentos do estudo CVC.

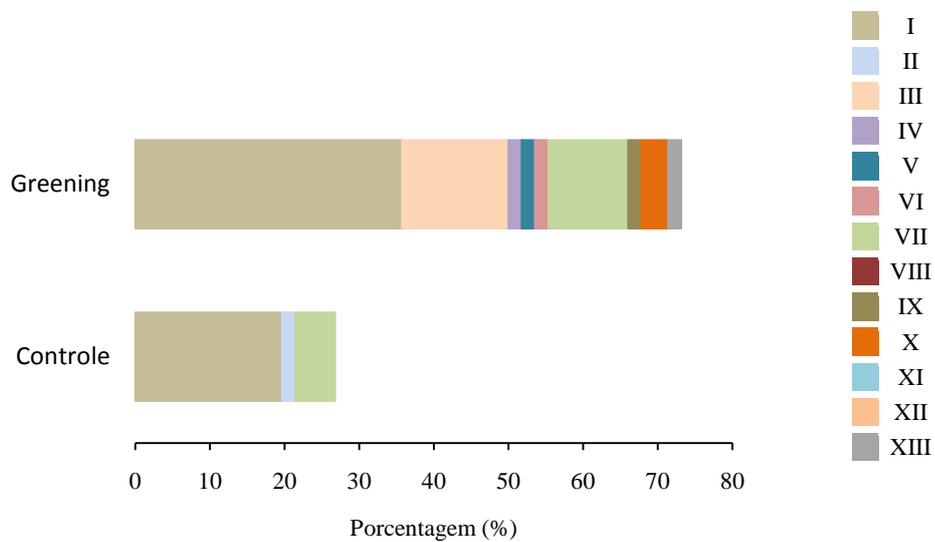


Figura 4.7 – Distribuição dos grupos filogenéticos, representados pelas espécies de *Methylobacterium* spp. encontradas em plantas sintomáticas para “Greening” e assintomáticas (controle).

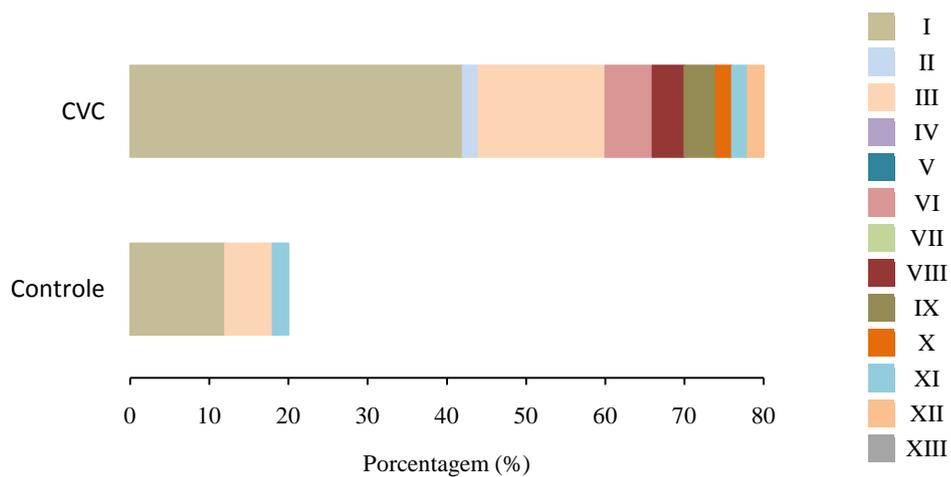


Figura 4.8 – Distribuição dos grupos filogenéticos, representados pelas espécies de *Methylobacterium* spp. encontradas em plantas sintomáticas para CVC e assintomáticas (controle).

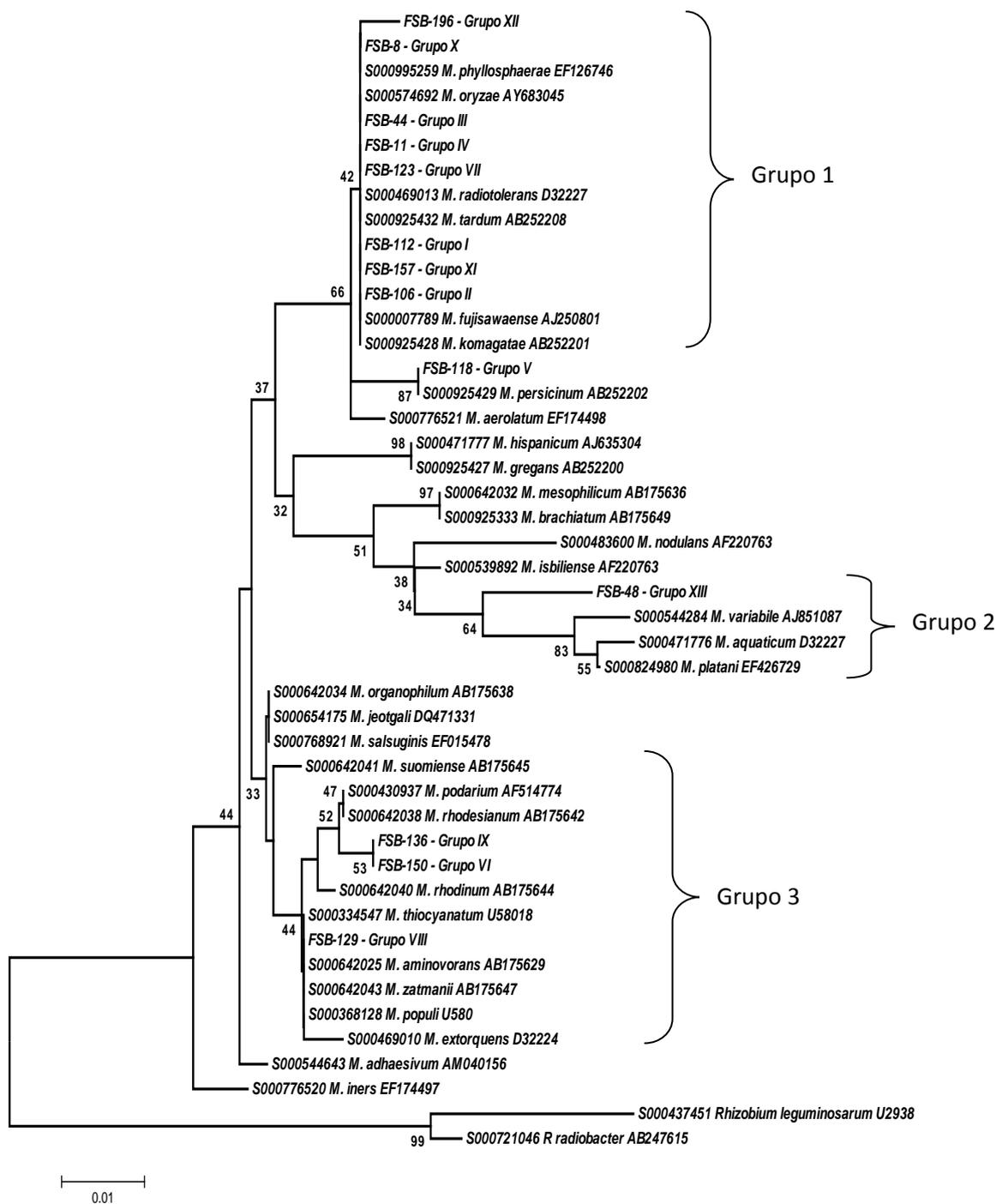


Figura 4.9 – Árvore filogenética dos isolados identificados como espécies de *Methylobacterium* spp. associadas aos tecidos internos de citros na ausência e presença de sintomas de “Greening” e CVC. A diversidade corresponde ao sequenciamento parcial do gene 16S DNAr, aproximadamente 700 pb. A similaridade entre as sequências dos isolados e as existentes no *GenBank* foram correlacionadas a partir de suas similaridades e agrupadas pelo método *Neighbor-joining*. Foram utilizadas duas espécies do gênero *Rhizobium* como grupo externo para o enraizamento da árvore filogenética. Os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1000 subamostragens. A barra significa a divergência das sequências.

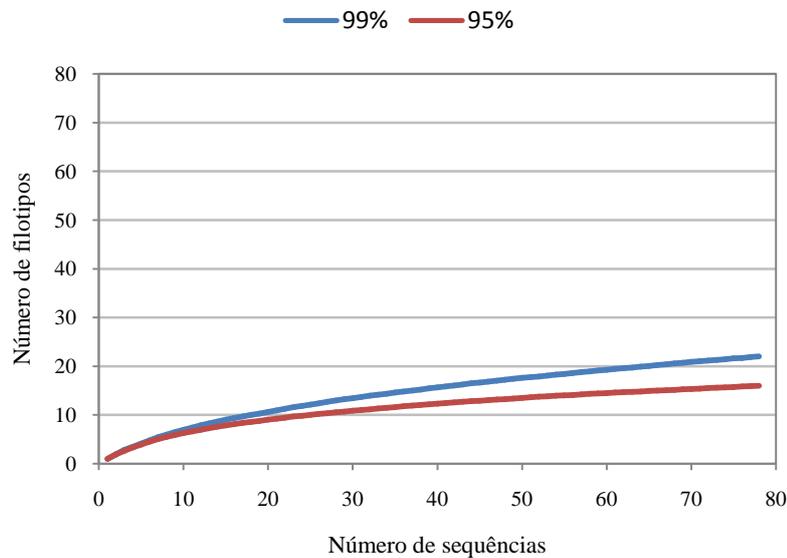


Figura 4.10 - Análise de rarefação mostrando o número esperado de filotipos encontrados pela análise de agrupamento a diferentes níveis de similaridade entre as sequências de nucleotídeos da região 16S DNAr dos diversos isolados encontrados em plantas sintomáticas para *Greening* e assintomáticas.

No presente trabalho, não foi verificada qualquer gênero que tenha sido frequentemente isolado de plantas assintomáticas. De modo geral, houve um equilíbrio entre a frequência de gêneros encontrados em plantas assintomáticas e sintomáticas para “Greening”, à exceção de gênero *Methylobacterium* que foi mais isolado de plantas sintomáticas para a doença. Davis et al. (2008) encontraram por microscopia eletrônica de transmissão e análise molecular por PCR, a presença de uma Actinobacterium, identificada como *Propionibacterium acnes*, isolada por co-cultivo de extrato vegetal e amostras do vetor *Diaphorina citri*. Em ambas as amostras foram detectadas por técnica molecular, gene 16S DNAr, a presença de *Ca. L. asiaticus*.

O efeito do patógeno *Ca. Liberibacter* sp. sobre a comunidade microbiana associada a raízes de citros foi analisado, por meio da construção de bibliotecas. Os resultados mostraram que a maioria dos filotipos já são conhecidos por atuarem como promotores de crescimento e/ou controle de patógenos, sendo eles *Caulobacter*, *Burkholderia*, *Lysobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotromonas*, *Bacillus* e *Paenibacillus*, em sem a presença do patógeno. Segundo, os autores a presença de *Ca. Liberibacter asiaticus* reestruturou a comunidade bacteriana nativa e levou a perda da maioria dos filotipos, promovendo o crescimento de bactérias como *Methylobacterium* e *Sphingobacterium*. As mudanças não foram apenas qualitativas, como também quantitativas, conforme foi observado pelo emprego do PCR em tempo real a partir do uso de primers específicos para os gêneros encontrados (TRIVEDI; DUAN; WANG, 2010).

Devido à obtenção de baixos valores de similaridade de alguns isolados, os mesmos foram classificados em gênero (95%) e outros em espécies (99%). Os seguintes gêneros foram encontrados: *Acinetobacter* spp., *Achromobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Brevundimonas* spp., *Curtobacterium* spp., *Dyella* spp., *Enterobacter* spp., *Nocardia* spp., *Pantoea* spp., *Sphingomonas* spp. e *Stenotrophomonas* spp. Os gêneros mais encontrados neste estudo foram *Brevundimonas* spp. (22%), *Alcaligenes* (16%) e *Pantoea* (13%), sendo que *Brevundimonas* spp. foi isolada principalmente de plantas sintomáticas para “Greening”. Pelo nível de similaridade adotado para espécies (99%), apenas dois isolados foram caracterizados como *Brevundimonas vesiculares* e *Pantoea agglomerans*. Alguns isolados não apresentaram alta similaridade com qualquer sequência presente no banco de dados, possivelmente, pode se tratar de uma espécie ainda não registrada ou que o banco de dados encontra-se incompleto. Araújo et al. (2002) avaliaram pela técnica DGGE, a comunidade bacteriana endofítica de plantas afetadas pela CVC, plantas saudias, plantas assintomáticas para CVC (escape), e tangerina “Ponkan” e verificaram maior diversidade na população pertencente à classe das Betaproteobactéria em plantas afetadas pela doença em relação às demais. Lacava et al. (2006) observaram, pela análise da técnica DGGE, a presença *Curtobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., além do patógeno *X. fastidiosa*, em plantas de citros afetadas pela doença CVC. O gênero *Acinetobacter* foi detectado em plantas saudias. Deve-se ressaltar que a utilização de uma única metodologia no estudo de comunidades microbianas não conduz a um resultado condizente a real diversidade existente em uma amostra ambiental. Isto se deve a existência de inúmeras espécies incapazes de crescer nas condições de cultivo proporcionadas. A obtenção de isolados pelo método direto de cultivo é uma metodologia eficaz e segura na representação da comunidade endofítica cultivável e fornece subsídios para uma posterior confirmação e complementação dos resultados pela utilização de outras metodologias como DGGE, construção de bibliotecas, como já anteriormente constatado por Araújo et al. (2001), Andreote et al. (2008), Lacava et al. (2006).

Verificando a distribuição dos isolados agrupados filogeneticamente de acordo com seu local de origem (local amostrado) nota-se que as amostras originárias do município de Matão (SP) apresentaram maior diversidade bacteriana com relação às amostras provenientes do município de Gavião Peixoto (SP) em todos os isolamentos realizados nos diferentes períodos (chuvoso e seco). Nenhuma das variáveis conhecidas como variedade copa/enxerto e idade da planta, pôde ser associada a esse comportamento, por não apresentarem diferenças entre si e em relação ao fenômeno observado. Talvez, a resposta para essa maior diversidade encontrada nas plantas pertencentes à localidade Matão (SP) se deva há algum caráter não avaliado como manejo da cultura, nutrição da planta, solo, etc.

De acordo com a figura 4.12, o primeiro e o último isolamento ocorrido em períodos distintos, chuvoso e seco, apresentaram maior diversidade de grupos filogenéticos em relação ao

segundo isolamento, que apresentou baixa diversidade, embora o número de unidades formadoras de colônias obtidas após o isolamento, não tenha sido diferente tanto em relação aos demais (Figura 4.1). Conforme mencionado anteriormente, o grupo filogenético X, representado pelo gênero *Brevundimonas*, foi o mais freqüente encontrado durante os isolamentos (Figura 4.12).

A distribuição dos grupos filogenéticos aos referentes tratamentos “Greening” e controle permitiram observar que não houve diferenças quanto à diversidade. Alguns grupos bacterianos se sobressaíram em relação a determinado tratamento. Plantas sintomáticas para “Greening” apresentaram um maior número de isolados relacionados ao gênero *Brevundimonas*, pertencente à classe das Alfaproteobactéria. Entretanto considerando a comunidade total e incluindo o gênero *Methylobacterium*, analisado separadamente (Item 4.1) a comunidade predominante pertence à classe das Alfaproteobactérias. Embora, ambos os tratamentos possuíssem Actinobactérias, representadas pelos gêneros *Arthrobacter* e *Nocardia*, a presença destes grupos foi maior em plantas assintomáticas para a doença.

4.3 Avaliação da produção da aminociclopropano-1-carboxílico deaminase (ACCD) e da tolerância aos metais pesados cádmio (Cd) e chumbo (Pb)

A avaliação da capacidade dos 62 isolados de *Methylobacterium* crescerem sobre meio CHOI modificado, contendo como fonte de nitrogênio apenas a molécula 1-carboxilato-1-aminociclopropano revelou que 63% (39) dos isolados foram capazes de quebrar a molécula de ACC para utilização do nitrogênio (NH₃) em um período de até 30 dias. O número de isolados que cresceram neste mesmo período na placa controle, contendo o meio CHOI padrão foi de 85%.

O teste de avaliação dos isolados para a tolerância ao metal pesado cádmio (Cd), fórmula CdSO₄, em três diferentes concentrações, mostrou ao longo do período de 30 dias que apenas três isolados (H1R/F; H10R/E e Y4R/C) foram capazes de se desenvolverem nos meios contendo CdSO₄ nas concentrações 2,5 e 5,0 mM. As microcolônias dos isolados H1R/F, Y4R/C e H10R/E foram visualizadas ao 9º, 13º e 18º dias, respectivamente, após a inoculação em meio CHOI suplementado com CdSO₄ a 2,5 mM de concentração. No meio contendo a concentração de 5,0 mM, os isolados H1R/F; H10R/E e Y4R/C também se mostraram tolerantes a esta concentração. Entretanto, o tempo de resposta foi mais longo, para o desenvolvimento das colônias sobre o meio foi ao 11º (H1R/F); 16º (Y4R/C) e 21º (H10R/E) (Figura 4.14).

O teste de tolerância ao metal pesado chumbo (Pb) para o prazo de crescimento de 30 dias, revelou que apenas dois isolados se mostraram tolerantes a esse metal. Na concentração de 2,5 mM de PbNO₃, os isolados H1R/F e Y4R/C foram observados ao 10º e 19º dia após a inoculação, respectivamente. Somente o isolado H1R/F foi capaz de se desenvolver, após o 26º da inoculação em meio CHOI suplementado com PbNO₃ na concentração de 5,0 mM (Figura 4.15). Nenhum

dos isolados avaliados se mostraram tolerantes à concentração de 10 mM de CdSO_4 e PbNO_3 em meio CHOI.

Tabela 4.3 – Identificação referente aos 68 isolados endofíticos encontrados em ramos de citros com sintomas de *Greening* e assintomáticos.

(continua)

Isolado	Local (Município)	Plantas sintomáticas				Nº de acesso ⁴		
		Classe	Grupo ¹	Espécie ²	% ³			
H3/A	A (Matão, SP)	Alfaproteobactéria	X	<i>Brevundimonas nasdae</i>	89%	EF204209.1		
H4/A				<i>Brevundimonas vesiculares</i>	92%	FJ999941.1		
H6/A		Betaproteobactéria	XVI	<i>Alcaligenes faecalis</i>	89%	AY169433.1		
H9/A					86%	HM597239.1		
H8/A					XVII	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	89%	AB547225.1
H10/A							97%	
H5/A		Firmicutes	XIV	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	91%	FN796861.1		
H1/A		Gamaproteobactéria	IX	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	98%	FJ976573.1		
H2/A					98%	HQ180185.1		
H7/A					XI	<i>Pantoea agglomerans</i>	97%	FJ593002.1
H6/B	B (Gavião Peixoto, SP)	Actinobactéria	II	<i>Arthrobacter niigatensis</i>	86%	GU332594.1		
H2/B		Alfaproteobactéria	X	<i>Brevundimonas nasdae</i>	89%	EF204209.1		
H3/B				<i>Brevundimonas vesiculares</i>	89%	AY169433.1		
H5/B		Betaproteobactéria	XVI	<i>Alcaligenes faecalis</i>	98%	DQ110882.1		
H1/B		Gamaproteobactéria	XI	<i>Pantoea agglomerans</i>	97%	AY691544.1		
H4/B					XV	92%	FJ603031.1	
H1/C		C (Gavião Peixoto, SP)	Alfaproteobactéria	X	<i>Brevundimonas vesiculares</i>	90%	AY169433.1	
H2/C	Betaproteobactéria		XVI	<i>Alcaligenes faecalis</i>	96%	AY667065.1		
H1/D	D (Matão, SP)	Alfaproteobactéria	X	<i>Brevundimonas vesiculares</i>	97%	FJ999941.1		
H2/D					97%	AY169433.1		
H3/D		Gamaproteobactéria	VIII	<i>Enterobacter hormaechei</i>	96%	HM446004.1		
H2/E	E (Matão, SP)	Alfaproteobactéria	X	<i>Brevundimonas vesiculares</i>	94%	AY169433.1		
H11/E					98%	FJ999941.1		

¹ Grupo o qual o referente isolado foi inserido pela análise de agrupamentos em filograma com similaridade acima de 99%; ² Espécie atribuída ao isolado a partir do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr e análise via BLASTn (GenBank); ³ Índice de similaridade encontrada a partir do alinhamento realizado via BLASTn; ⁴ Número de acesso referente à espécie indicada pelo GenBank (NCBI).

Tabela 4.3 – Identificação referente aos 68 isolados endofíticos encontrados em ramos de citros com sintomas de *Greening* e assintomáticos.

(continua)

Plantas sintomáticas							
Isolado	Local (Município)	Classe	Grupo ¹	Espécie ²	% ³	Nº de acesso ⁴	
H13/E	E (Matão, SP)	Alfaproteobactéria	X	<i>Brevundimonas vesiculares</i>	90%	AY169433.1	
H6/E			XVII	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	97%	FJ169468.1	
H7/E		Betaproteobactéria	XIX	<i>Alcaligenes faecalis</i>	95%	HM597239.1	
H9/E			XVI		98%	AY667065.1	
H5/E			Firmicutes		XXI	<i>Bacillus subtilis</i>	93%
H3/E		Gamaproteobactéria		VIII	<i>Enterobacter hormaechei</i>	96%	HM446004.1
H4/E				XII	<i>Acinetobacter</i> sp.	92%	EU267626.1
H12/E				VII	<i>Dyella yeojuensis</i>	89%	FJ527678.1
H14/E				XI	<i>Pantoea agglomerans</i>	90%	AY691544.1
H2/F				F (Gavião Peixoto, SP)	Actinobacteria	III	<i>Nocardia corynebacterioides</i>
H3/F	89%	AY438619.1					
Plantas assintomáticas							
Isolado	Local (Município)	Classe	Grupo ¹	Espécie ²	% ³	Nº de acesso ⁴	
S11/A	A (Matão, SP)	Actinobacteria	III	<i>Nocardia corynebacterioides</i>	90%	FJ828880.2	
S4/A			XIX	<i>Alcaligenes</i> sp.	85%	HM597239.1	
S12/A		Betaproteobactéria		XVI	<i>Alcaligenes faecalis</i>	97%	DQ110882.1
S5/A				XVII	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	98%	AB547225.1
S1/A				I	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	95%	HM625746.1
S10/A		Gamaproteobactéria		IX	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	97%	FJ976594.1
S7/A				V	<i>Enterobacter hormaechei</i>	93%	FJ608246.1
S9/A				97%	HM355601.1		
S6/A				Firmicutes	IV	<i>Bacillus circulans</i>	87%

¹ Grupo o qual o referido isolado foi inserido pela análise de agrupamentos em filograma com similaridade acima de 99%; ² Espécie atribuída ao isolado a partir do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr e análise via BLASTn (GenBank); ³ Índice de similaridade encontrada a partir do alinhamento realizado via BLASTn; ⁴ Número de acesso referente à espécie indicada pelo GenBank (NCBI).

Tabela 4.3 – Identificação referente aos 68 isolados endofíticos encontrados em ramos de citros com sintomas de *Greening* e assintomáticos.

(conclusão)

Plantas assintomáticas								
Isolado	Local (Município)	Classe	Grupo ¹	Espécie ²	% ³	Nº de acesso ⁴		
S3/A	A (Matão, SP)	Firmicutes	XVIII	<i>Bacillus subtilis</i>	88%	HM560955.1		
S1/B	B (Gavião Peixoto, SP)	Alfaproteobactéria	X	<i>Brevundimonas vesiculares</i>	98%	FJ999941.1		
S2/B		Gamaproteobactéria	IX	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	97%	EU418714.1		
S1/C	C (Gavião Peixoto, SP)	Betaproteobactéria	XVI	<i>Alcaligenes faecalis</i>	89%	HM597239.1		
S1/D	D (Matão, SP)	Alfaproteobactéria	X	<i>Brevundimonas vesiculares</i>	99%	FJ999941.1		
S7/D				<i>Brevundimonas nasdae</i>	91%	EF204209.1		
S2/D		Betaproteobactéria	XVI	<i>Alcaligenes faecalis</i>	92%	HM597239.1		
S4/D		Gamaproteobactéria	XI	<i>Pantoea agglomerans</i>	96%	EU721614.1		
S6/D					80%	GU003844.1		
S12/E		E (Matão, SP)	Actinobactéria	III	<i>Nocardia corynebacterioides</i>	88%	FJ828880.2	
S8/E	93%							
S2/E	Alfaproteobactéria		X	<i>Brevundimonas nasdae</i>	97%	EF204209.1		
S9/E					XXII	<i>Sphingomonas desiccabilis</i>	97%	AJ871435.1
S11/E	Betaproteobactéria		XVI	<i>Alcaligenes faecalis</i>	98%	HM597239.1		
S1/E	Gamaproteobactéria		XI	<i>Pantoea agglomerans</i>	99%	FJ603031.1		
S5/E					98%	EU721614.1		
S10/E					IX	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	98%	FJ976573.1
S13/E					VI	<i>Dyella yeojuensis</i>	88%	FJ527678.1
S3/E	Firmicutes		XXI	<i>Bacillus subtilis</i>	97%	DQ112340.1		
S2/F	F (Gavião Peixoto, SP)	Actinobactéria	II	<i>Arthrobacter niigatensis</i>	91%	GU3325941		
S8/F					95%			
S10/F		III	<i>Nocardia corynebacterioides</i>	96%	AF430066.1			
S5/F		Betaproteobactéria	XVI	<i>Alcaligenes faecalis</i>	94%	HM597239.1		
S3/F		Gamaproteobactéria	XI	<i>Pantoea agglomerans</i>	97%	EU721614.1		

¹ Grupo o qual o referente isolado foi classificado pela análise de agrupamentos em filograma com 99% similaridade; ² Espécie atribuída ao isolado a partir do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr e análise via BLASTn (GenBank); ³ Índice de similaridade encontrada a partir do alinhamento realizado via BLASTn; ⁴ Número de acesso referente à espécie indicada pelo GenBank(NCBI).

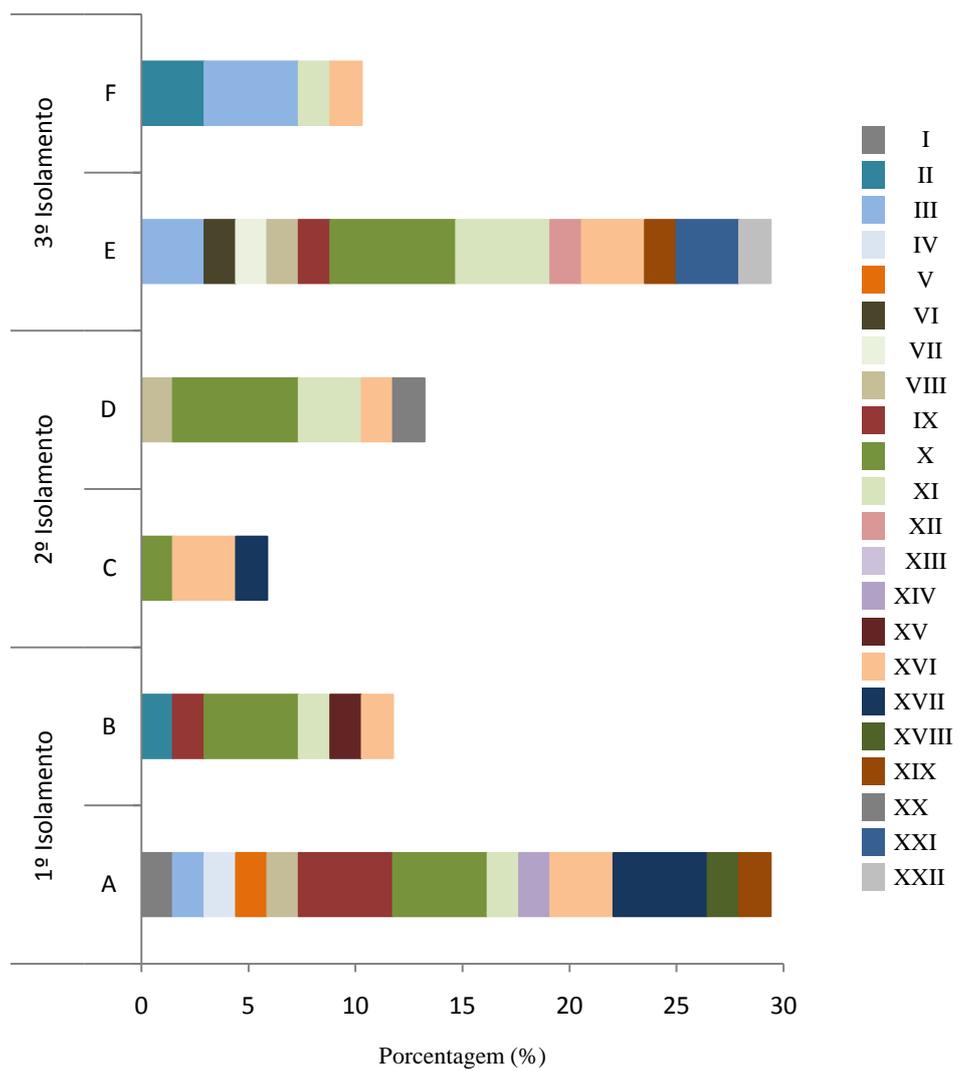


Figura 4.11 – Distribuição dos grupos filogenéticos, representados por gêneros e espécies bacterianas encontradas nos três períodos de isolamento (Locais A, D e E: Matão, SP.; B,C e F: Gavião Peixoto, SP.).

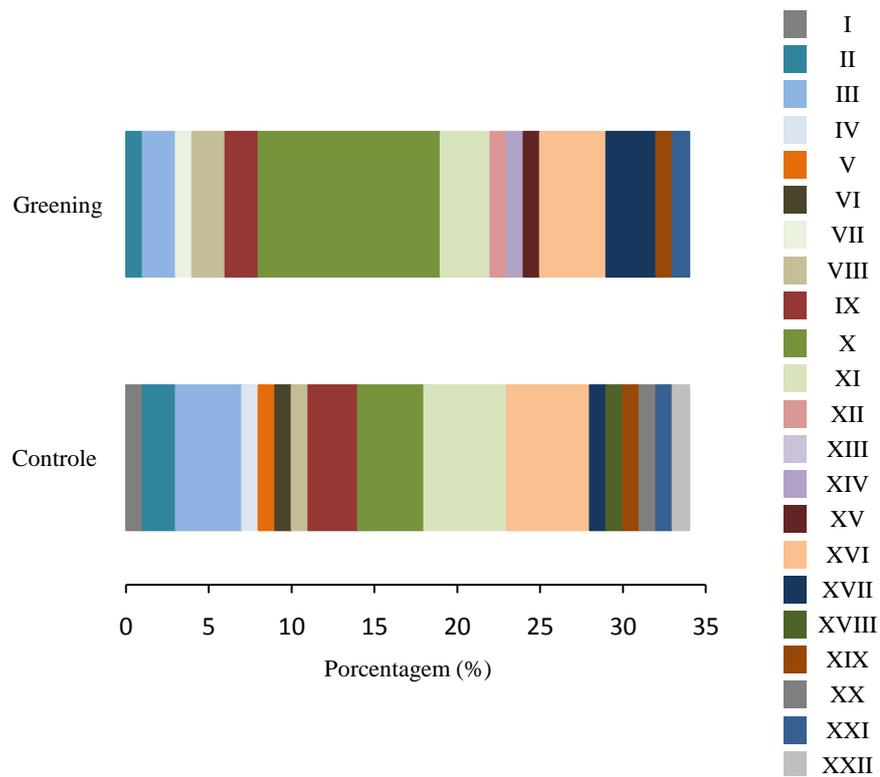


Figura 4.12 - Distribuição dos grupos filogenéticos, representados por gêneros e espécies bacterianas encontradas em fragmentos de ramos com sintoma de Greening e assintomáticos (controle).

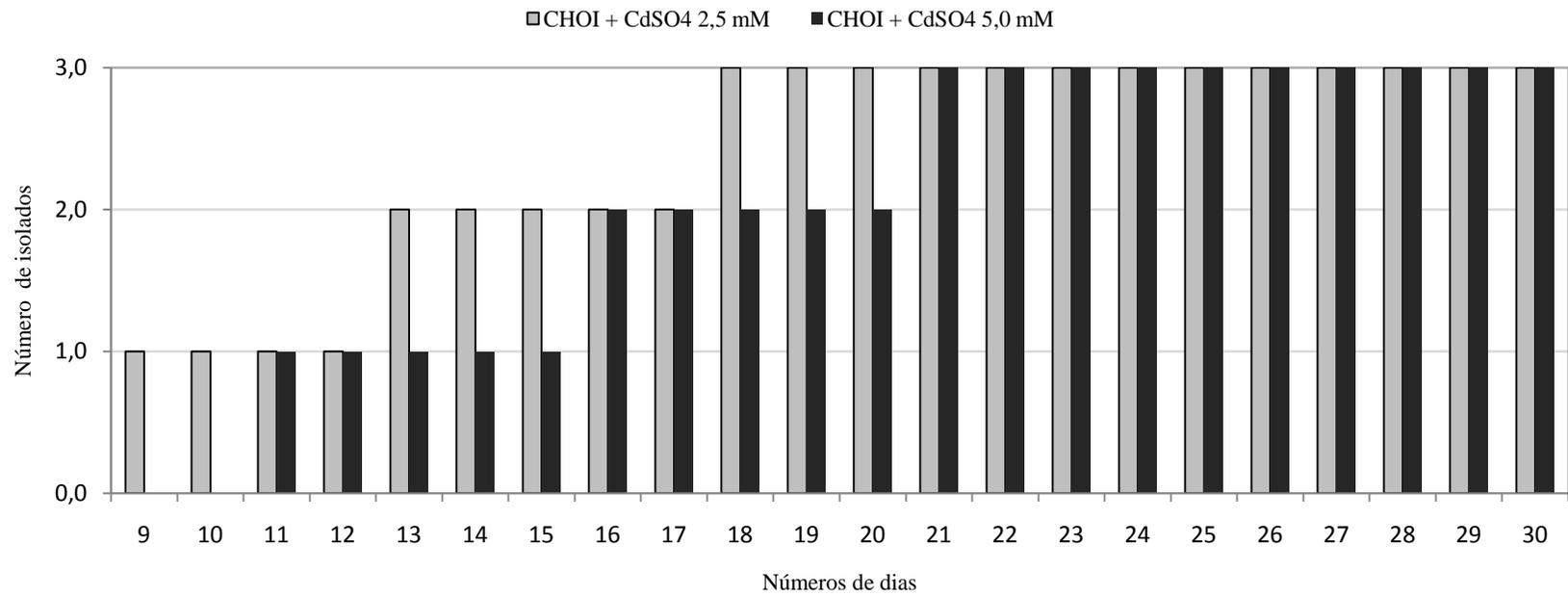


Figura 4.13 – Número de isolados endofíticos de *Methylobacterium* sp. capazes de crescer em meio CHOI suplementado com CdSO4 nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 miliMolar (mM) em um período de 30 dias.

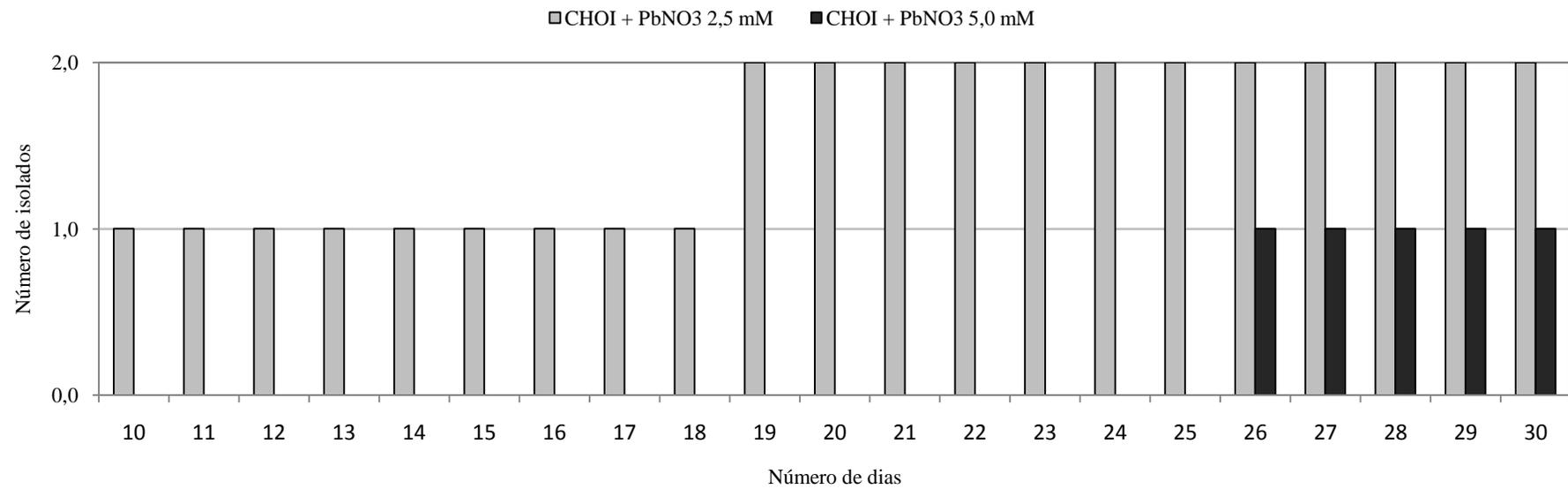


Figura 4.14 – Porcentagem de isolados endofíticos de *Methylobacterium* sp. capazes de crescer em meio CHOI suplementado com PbNO₃ nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 miliMolar (mM) em um período de 30 dias.

5 CONCLUSÕES

- O estudo da diversidade em plantas assintomáticas e sintomáticas para “Greening” revelou que as plantas com sintomas da doença apresentam uma elevada frequência de isolados endofíticos do gênero *Methylobacterium*, em relação às plantas ausentes de sintomas.
- A frequência e a diversidade endofítica de *Methylobacterium* spp., também foi maior em plantas sintomáticas para a clorose variegada do citros, em relação às plantas sem a presença de sintomas.
- Em relação às plantas assintomáticas e sintomáticas para “Greening”, o estudo da comunidade total de bactérias endofíticas cultiváveis revelou que esta é composta principalmente pela classe Alphaproteobacteria e não houve qualquer grupo favorecido, à exceção de *Methylobacterium*.
- A produção da enzima ácido carboxílico aminociclopropano deaminase, determinada *in vitro*, mostrou que mais de 60% dos isolados avaliados são positivos para a mesma.
- O teste de tolerância aos metais cádmio e chumbo revelou que apenas um isolado foi capaz de crescer nos meio contendo a concentração de 2,5 e 5,0 mM para ambos os metais.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTE, F. D. et al. Culture-independent assessment of rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, p. 82-93, 2009.
- ANTHONY, C.; GHOSH, M.; BLAKE, C. C. F. The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrroloquinoline quinone. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 304, p. 665-674, 1994.
- ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic bacterial population and interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 4906-4914, 2002a.
- ARAÚJO, W. L. et al. **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: ESALQ/USP, 2002b. 86 p.
- ARAÚJO, W. L. et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W. L. Importância dos microrganismos endofíticos na Agricultura. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 333-371, 2003.
- BELIMOV A. A. et al. Characterization of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 642-652, 2001.
- CERVANTES-MARTINEZ, J.; LOPEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ-GARAY, B. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, Amsterdam, v. 166, p. 889-892, 2004.
- CHEN, C. et al. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 56, p. 13-23, 2000.
- COLETTA-FILHO, H. D., et al. First report of the causal agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, St Paul, v.88, n.12,p.1382, 2004.
- DA GRAÇA, J. V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-136, 1991.
- DAVIS, M. J., et al. Co-cultivation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” with Actinobacteria from citrus with Huanglongbing. **Plant Disease**, Saint Paul, v.92, pg.1547-1550, 2008.

DORONINA, N. V.; IVANOVA, E. G.; TROTSSENKO, I. New evidence for the ability of methylobacteria and methanotrophs to synthesize auxins. **Microbiology**, Reading, v. 71, p. 116-118, 2002.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature** - Genus *Methylobacterium*. Paris: Société Civile des Auteurs Multimedia de France, 1997-2010. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/methylobacterium.html>>. Acesso em: 10 jul. 2009.

FERREIRA FILHO, A. S.; ARAÚJO, W. L.; KULINSKY-SOBRAL, J. Bactéria endofítica *Methylobacterium* spp. e a interação com a planta hospedeira. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 9., 2001, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: USP, 2001. 1 CD-ROM.

FERREIRA, A. et al. Diversity of endophytic bacteria from species seeds and colonization of seedlings by. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 287, p. 8-14, 2008.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the enzyme ACC deaminase, **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, p. 1-7, 2005.

GLICK, B. R.; KARATUROVÍČ, D. M.; NEWELL, P. C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 533-536, 1995.

GLICK, B. R.; LI, D. M.; PENROSE, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 190, p. 63-68, 1998.

GREEN, P. N. *Methylobacterium*. In: DWORKIN, M. et al. (Ed.). **The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. New York: Springer, 2006. v. 5, p. 257-265.

GREEN, P. N.; BOUSFIELD, I. J. A taxonomic study of some gram-negative facultatively methylophilic bacteria. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 128, p. 623-638, 1982.

HE, C. X., et al. Distribution de *X. fastidiosa* in citrus root stocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural roots grafts. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 84, n. 6, p. 622- 626, 2000.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients, **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HOCQUELLET, A. et al. Detection and identification of the two “*Candidatus Liberobacter* sp.” associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. **Molecular and Cellular Probes**, Amsterdam, v. 13, p. 373-379, 1999.

HOLLAND, M. A. Occam's razor applied to hormonology: Are cytokinins produced by plants? **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, p. 865-868, 1997.

HOLLAND, M. A.; POLACCO, J. C. PPFMs and other contaminants: is there more to plant physiology than just plant? **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 197-209, 1994.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. PCR detection of the two 'Candidatus' Liberibacter species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, Amsterdam, v. 10, p. 43-50, 1997.

JOURAND, P. et al. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2269-2273, 2004.

KIRK, J. L. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Bedford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUTSCHERA U.; KOOPMANN V. Growth in liverworts of the Marchantiales is promoted by epiphytic methylobacteria. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 92, p. 347-349, 2005.

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

LACAVA, P. T. et al. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 535-541, 2006.

LACAVA, P. T. et al. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 45, p. 388-393, 2007.

LEE, H. S. et al. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylotrophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 402-408, 2006.

LI, W. B. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 953-958, 2003.

LIDSTROM, M. E. Aerobic methylotrophic prokaryotes. In: BALOWS, A. et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006. p. 618-634.

LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 2, p. 329-344, 1996.

LOPES, S. A., et al. *Nicotiniana tabacum* as na experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n. 8, p. 827-830, 2000.

MACHADO, M. A. et al. Avaliação da transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (CVC). **Laranja**, Cordeirópolis, v.13, n.2, p.515-531,1992.

MACHADO, M. A. et al. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre porta-enxertos de laranjas pêra com clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 22, n.1, p. 30-33, 1987.

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

MADHAIYAN M.; POONGUZHALI, S.; SA, T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Chemosphere**, Oxford, v. 69, p. 220–228, 2007.

MADHAIYAN, M. et al. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 168-176, 2006.

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

MADHAIYAN, M.; SUNDARAM, S. P.; KANNAIYAN, S. Influence of pink pigmented facultative methylotrophic bacteria on the seedling vigour of maize (*Zea mays* L.). **World Journal of Microbiology**, Oxford, v. 4, p. 117–121, 2002.

MINSAVAGE, G. V. et al. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, Lancaster, v. 84, p. 456-461, 1994.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 808-811, 1990.

MONTEIRO, P. B., et al. Stable transformation of *Xylella fastidiosa*, citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.5, p. 2263-2269, 2001.

NEMECEK-MARSHALL, M. et al. Methanol emission from leaves: enzymatic detection of gas-phase methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1359-1368, 1995.

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

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-37, 1994.

PATT, T. E. et al. Isolation and characterization of bacteria that grow on methane and organic compounds as sole sources of carbon and energy. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 120, p. 955–964, 1974.

POOLER, M. R.; HARTUNG, J. S. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, New York, v. 31, p. 377-381, 1995.

PURCELL, A.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 131-151, 1996.

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, D. Clorose Variegada dos Citros: Revisão. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, n.1, p. 1-14,1990.

SHARMA, V, K.; NOWAK, J. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 528-536, 1998.

SMITH, S. R. Effect of soil pH on availability to crops of metals in sewage-sludge treated soils. **Environmental Pollution**, London, v. **86**, p. **5-13**, 1994.

TEIXEIRA, D. C. et al. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, Amsterdam, v. 19, p. 173-179, 2005.

TEIXEIRA, D.C. et al. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, Amsterdam, v.22, n.3, p. 139-150, 2008.

TEIXEIRA, D. C. et al. The *tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* gene cluster of the liberibacters: sequence comparisons, phylogeny and speciation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1414-1421, 2008.

TRIVEDI, P.; DUAN, Y.; WANG, N. Huanglongbing, a systemic disease, restructures the bacterial community associated with citrus roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, n. 11, pg 3427-3436, 2010.

TOYAMA, H.; ANTHONY, C.; LINDSTROM, M. E. Construction of insertion and deletion *mx* mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 166, p. 1-7, 1998.

TSUJIMOTO, N. et al. L-Lysine biosynthetic pathway of *Methylophilus methylotrophus* and construction of an L-lysine producer. **Journal of Biotechnology**, Baltimore, v. 124, p. 327–337, 2006.

VAN DIEN, S. J. et al. Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 7563-7566, 2003.

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

VIVAS, A. et al. Two bacterial strains isolated from a Zn polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, p. 1523–1533, 2006.

YAMAOKA-YANO, D. M.; VALARINI, P. J. Métodos de identificação de bactérias. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1998. p. 369-419.