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

Comunidade bacteriana associada às cigarrinhas
(Hemiptera:Cicadellidae), insetos vetores de *Xylella fastidiosa*

Cláudia Santos Gai

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

PIRACICABA

2006

Cláudia Santos Gai
Engenheira Agrônoma

**Comunidade bacteriana associada às cigarrinhas (Hemiptera:Cicadellidae),
insetos vetores de *Xylella fastidiosa***

Orientador:
Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

PIRACICABA
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Gai, Cláudia Santos

Comunidade bacteriana associada às cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae), insetos vetores de *Xylella fastidiosa* / Cláudia Santos Gai. - - Piracicaba, 2006.
101 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Biofilme 2. Biologia molecular 3. Cigarrinhas 4. Controle biológico
5. Clorose variegada dos citros 6. Insetos vetores 7. Microrganismos endofíticos
I. Título

CDD 589.9015

“Nos momentos de crise, só a inspiração é mais importante que o conhecimento.”

Albert Einstein

A meus pais, Claudio e Jocélia, e ao meu irmão Giovani.
Pelo amor, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim.

Dedico

Aos meus avós, uma neta doutora.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Claudio e Jocélia e ao meu irmão Giovani por me apoiarem em todos os momentos, me ensinarem a gostar de estudar e sempre me incentivarem. Por todo o amor e carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo e ao Dr. Welington Luiz de Araújo por esse quase 10 anos de orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, por acreditar no projeto e colaborar para que ele se realizasse.

A CAPES pela bolsa de estudos e pela bolsa sanduíche.

Aos amigos do laboratório, pelas boas idéias e por todas as vezes que eu pedi ajuda e vocês estiveram comigo. Aos colegas que já não trabalham mais aqui, mas que conviveram comigo e me ajudaram de alguma forma nesses anos todos, em especial à professora Dra. Chirlei Glienke da Universidade Federal do Paraná, por me trazer para o laboratório e pela paciência de me ensinar as coisas mais básicas. Aos colegas Dr. Paulo Lacava e Karen Kubo pelo apoio na correção da tese.

Aos colegas do Departamento de Entomologia, por me ajudarem com as cigarrinhas.

Ao INRA Toulouse, por me acolher durante o meu estágio sanduíche. À Dra. Julia Vorholt, pela orientação. À Marie-Christine pela microscopia. Aos colegas que tornaram a vida longe de casa mais alegre.

A todos os colegas do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos coordenadores e professores do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos e pelo incentivo. À Léia, secretária da pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas por toda ajuda e por compreender os momentos de correria. A todos os funcionários do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório e de fora dele, que tanto me ajudaram nesse e em outros tantos trabalhos, lavando vidraria, inoculando plantinhas, fazendo isolamento,

preparando meio de cultura, aprendendo a usar um programa de computador, preparando um PCR, fazendo DGGE, contando bactérias, extraindo DNA, fazendo microscopia, caçando insetos, escrevendo relatórios e resumos para congressos, passando noites e fins de semana trabalhando juntos. Muito obrigada aos meus amigos pelos momentos de descontração, pelos cafezinhos às quatro da tarde, pela companhia nos almoços do RUCA'S ou nos almoços preparados aqui no laboratório mesmo (usando o forno de esterilizar placas para assar peixe, fazer strogonoff, bacalhoda e assar carne), pelos churrascos, pelas tardes na BO, pelas festas de aniversário e de fim de ano, pelas tardes no sinfesalq e pelos dias viajando e curtindo. Obrigada pela companhia em tantos congressos, aliás, obrigada por terem ido olhar meus painéis também.

Obrigada pelos momentos bons nas aulas de inglês, francês, espanhol, dança do ventre, dança de salão, kung fu, karatê, natação, dança africana e tantas academias pelas quais eu passei, afinal sempre é muito bom ter companhia nessas horas. Obrigada pela companhia para os brigadeiros de madrugada e os sorvetes da Paris (mesmo depois da academia), os passeios no shopping ou no supermercado 24 horas, as pizzas, as jantas e tantas idas ao cinema. Obrigada pela companhia para esquiar e conhecer outros lugares. Obrigada pelos momentos em que eu pude contar com o apoio de vocês. Obrigada por ouvirem mil vezes as minhas reclamações, por me deixarem chorar e por continuar falando comigo mesmo depois dos surtos. Obrigada pela força e por não me deixarem desistir, por acreditarem, por terem muita paciência e por cuidarem de mim.

Muito obrigada aos meus amigos do Brasil. Merci beaucoup a mes amies de France. Thank you very much my friends from United States, England and Australia, Bulgaria and Sweden. Muchas gracias a mis amigos d'España e Argentina. Zu meine Freunde in Deutschland, will ich danke schön sagen.

À minha família.

A mon coeur, pour la patience.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
RÉSUMÉ.....	13
AREVIATURAS E SÍMBOLOS	14
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Microrganismos endofíticos e seu papel no controle biológico de pragas e doenças.....	21
2.2 <i>Xylella fastidiosa</i> e a Clorose Variegada dos Citros (CVC).....	23
2.3 Transmissão de <i>Xylella fastidiosa</i> por cigarrinhas vetoras em citros.....	25
2.4 Associação de outros microrganismos com insetos vetores.....	28
2.5 Análise de comunidade bacteriana.....	30
2.6 Moléculas de <i>quorum sensing</i> e formação de biofilme.....	32
2.7 Utilização de mutantes em estudos genéticos.....	35
2.8 Utilização da GFP (Proteína Verde Fluorescente – Green Fluorescent Protein) para monitoramento de bactérias.....	36
2.9 O gênero <i>Methylobacterium</i> e sua importância como um endófito.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Insetos, bactérias e planta.....	39
3.2 Meios de cultura.....	40
3.2.1 TSB (Tryptone Soy Broth) 5%.....	40
3.2.2 CHOI 3.....	41
3.2.3 M3 (SPW modificado).....	41
3.3 Soluções	41

3.3.1 PBS.....	41
3.3.2 Tris EDTA (TE)	41
3.3.3 Tampão de extração.....	42
3.3.4 Tampão de carregamento de amostras em DGGE 6X.....	42
3.3.5 Solução A estoque para DGGE	42
3.3.6 Solução B estoque para DGGE	42
3.3.7 Solução S estoque para DGGE	42
3.4 Isolamento de bactérias associadas à cabeça das cigarrinhas.....	43
3.5 Extração de DNA.....	43
3.6 PCR.....	44
3.7 Caracterização de isolados por ARDRA.....	46
3.8 DGGE	47
3.9 Identificação e análise de seqüências.....	47
3.10 Bioensaio de transmissão.....	48
3.11 Avaliação da produção de moléculas de <i>quorum sensing</i> por <i>Methylobacterium extorquens</i>	49
3.12 Obtenção de mutantes de <i>Methylobacterium extorquens</i> e detecção de defectivos para a produção de biofilme e moléculas de <i>quorum sensing</i>	49
3.13 Caracterização dos mutantes quanto ao gene mutado – <i>southern blot</i> . ..	50
3.14 Avaliação da colonização de plantas de <i>Catharanthus roseus</i> por mutantes de <i>Methylobacterium extorquens</i>	51
3.15 Microscopia para localização de <i>Methylobacterium</i> sp. em <i>Catharanthus roseus</i>	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Isolamento de bactérias associadas à cabeça de cigarrinhas.....	52
4.2 ARDRA e seqüenciamento para identificação de isolados bacterianos. ..	56

4.3 PCR específico para detecção de isolados endofíticos de citros.....	60
4.4 DGGE.....	62
4.5 Análise de seqüências	67
4.6 Aquisição e transmissão de <i>Methylobacterium mesophilicum</i> por <i>Bucephalogonia xanthophis</i>	69
4.7 Caracterização da produção de biofilme e de moléculas <i>quorum sensing</i> por <i>Methylobacterium extorquens</i>	70
4.8 Obtenção e caracterização de mutantes de <i>Methylobacterium extorquens</i> negativos para formação de biofilme e para produção de moléculas <i>quorum sensing</i>	73
4.9 Colonização de plantas de <i>Catharanthus roseus</i> por mutantes de <i>Methylobacterium extorquens</i>	77
4.10 Caracterização dos mutantes quanto ao gene mutado- <i>southern blot</i> ...	78
4.11 Microscopia para a localização de <i>Methylobacterium</i> sp. em plantas....	79
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXO A.....	100
ANEXO B.....	101

RESUMO

Comunidade bacteriana associada às cigarrinhas (Hemiptera:Cicadellidae), insetos vetores de *Xylella fastidiosa*

A Clorose Variiegada dos Citros (CVC), doença que causa graves prejuízos à citricultura no estado de São Paulo, é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* que é transmitida pelas cigarrinhas *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* (Young), *Acrogonia citrina* (Marucci & Cavichioli) e *Oncometopia facialis* (Signoret). Durante a alimentação em plantas afetadas, esses insetos adquirem a bactéria, que coloniza o pré-cibário e o cibário, e depois são capazes de transmitir a doença para plantas saudáveis. Colonizando o xilema das plantas de citros encontram-se também bactérias endofíticas, que são microrganismos capazes de colonizar internamente tecidos de plantas sem causar dano aparente, e que podem interagir com patógenos no interior do hospedeiro. Este trabalho teve como objetivo avaliar a comunidade bacteriana associada às cigarrinhas vetoras de CVC, e observar as possíveis interações que ocorrem entre insetos vetores de *X. fastidiosa* e bactérias endofíticas de citros. Primeiramente foi feito um isolamento das bactérias da cabeça de cigarrinhas coletadas em pomares de citros afetados com CVC. Foram isoladas um total de 17230 bactérias de três espécies de cigarrinhas (*O. facialis*, *D. costalimai* e *A. citrina*) em três datas diferentes (22/março, 05/maio e 14/junho de 2002), que foram primeiramente classificadas em 9 grupos morfológicos. Do total, 120 bactérias representantes foram avaliadas por ARDRA e classificadas em 16 haplótipos, dos quais alguns foram identificados, por sequenciamento da região 16S do rDNA, como *Methylobacterium* sp. e *Curtobacterium* sp., que são bactérias endofíticas de citros já descritas e que interagem com *X. fastidiosa* em citros. *Primers* específicos para estas bactérias foram utilizados para PCRs com o DNA total da cabeça de cigarrinhas e variou de 39,1% a 89,6% nas diferentes espécies. A comunidade bacteriana associada às cigarrinhas foi também avaliada por DGGE e apresentou variações quanto ao inseto hospedeiro e quanto à época das avaliações. Um isolado de *M. mesophilicum* expressando o gene da proteína verde fluorescente (GFP – Green Fluorescent Protein) foi utilizado para experimento de transmissão deste endófito por *B. xanthophis*. Os insetos se alimentaram em membrana contendo a solução da bactéria e depois foram colocados em plantas de *Catharanthus roseus*. Das plantas, 13% apresentaram a bactéria fluorescente colonizando tecidos endofiticamente, o que indica que a cigarrinha é capaz de transmitir o endófito. Testes para a avaliação da produção de moléculas de *quorum sensing* (AHLs - Acil Homoceterina Lactonas) foram feitos para *M. mesophilicum* e *M. extorquens*. Foram ainda desenvolvidos mutantes de *M. extorquens*, defectivos para a produção de biofilme e AHLs.

Palavras-chave: cigarrinha, *Xylella fastidiosa*, transmissão, *Methylobacterium* sp. DGGE, *quorum sensing*, biofilme

ABSTRACT

Bacterial community associated to sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) insect vectors of *Xylella fastidiosa*

The Citrus Variegated Chlorosis (CVC), a very important disease which attacks citrus trees in the state of São Paulo, is caused by the xylem-limited bacteria, *Xylella fastidiosa*, which is transmitted by four species of sharpshooters (Cicadellidae) *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* (Young), *Acrogonia citrina* (Marucci & Cavichioli) and *Oncometopia facialis* (Signoret) which are capable of acquiring *X. fastidiosa* from the xylem while feeding. In plants, endophytic bacteria, which inhabit the interior of aerial plant parts developing an asymptomatic infection and show potential benefits as biocontrol agents of pests and diseases, may colonize the same niche of pathogens, such as *X. fastidiosa*, what could allow endophytes to interact with the pathogen. Bacteria were isolated from head of insect vectors, collected on affected citrus plants. From 17230 bacteria isolated from the heads of three insect species (*O. facialis*, *D. costalimai* and *A. citrina*) in three different days (22/march, 05/may and 14/june of 2002), 120 bacteria were tested with ARDRA and classified into 16 different haplotypes. The most frequent strains had their 16S rDNA fragment sequenced and they were identified as *Methylobacterium* sp. and *Curtobacterium* sp., bacteria which have been described as citrus endophytes which interact with *X. fastidiosa*. Total DNA of insect heads was used in Nested PCRs for detection of these citrus endophytes in insects. The frequencies of detection ranged from 39,1% to 89,6%. The bacterial community associated to sharpshooters was also evaluated by DGGE and presented variations due to insect host and time of the evaluations.

One *M. mesophilicum* isolate, expressing the GFP (Green Fluorescent Protein), was used to test the transmission of endophytes by *B. xanthophis*. Insects fed on membranes containing a bacterial solution and after were trapped on *Catharanthus roseus*. From the evaluated plants, 13% presented the fluorescent protein colonizing endophytically, indicating that the insect is able to transmit the endophytic bacteria. Biofilm and *quorum sensing* molecules (AHLs – Acyl Homocerine Lactones) production by *Methylobacterium* sp. were tested, and *M. extorquens* mutants for both features were produced.

Key words: sharpshooters, *Xylella fastidiosa*, transmission, *Methylobacterium* sp., DGGE, *quorum sensing*, biofilm

RÉSUMÉ

Communauté bactérienne associée aux insectes (Hemiptera:Cicadellidae) transmetteurs de *Xylella fastidiosa*

La Chlorose Variégée des agrumes du genre Citrus (C.V.C.) est une maladie qui provoque d'importantes pertes dans la production du citron ce qui a de fortes répercussions sur l'économie brésilienne. Cette maladie est causée par la bactérie *Xylella fastidiosa*, restreinte au xylème. La bactérie est transmise par 4 espèces de cicadelles, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* (Young), *Acrogonia citrina* (Marucci & Cavichioli) et *Oncometopia facialis* (Signoret). De nombreux travaux ont été menés au Brésil ces dernières années pour élucider les mécanismes de la pathogénie en vue de développer des moyens de contrôles efficaces.

Des bactéries ont été isolées à partir de citronnier, les plus fréquemment retrouvées sont des espèces endophytes appartenant au genre *Methylobacterium* sp. et *Curtobacterium* sp. Chez les plantes, les bactéries endophytes peuvent également coloniser le xylème ce qui permet une interaction entre ces bactéries et *X. fastidiosa*. L'ADN de la communauté bactérienne associée aux insectes a été évalué par DGGE. L'analyse montre des variations dans la composition de la communauté bactérienne selon les insectes considérés et selon le temps de prélèvement sur une même espèce d'insecte donnée. Pour caractériser la transmission de *M. mesophylicum* par l'insecte *B. xanthophis* à la plante modèle *Catharanthus roseus* une souche de *M. mesophylicum* exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) fut produite. Après avoir ingérer une solution de la bactérie fluorescente dans un système de membranes, les insectes ont été capables de transmettre la bactérie endophytique à 13 % des plantes.

La production de biofilm et des molécules *quorum sensing* ont été testées pour *M. mesophylicum* et *M. extorquens*. Plusieurs mutants de *M. extorquens*, obtenus par transposition, ont été testés sur leur capacité de production de biofilm et de molécules de *quorum sensing*.

Mots-clefs: cicadelles, *Xylella fastidiosa*, transmission, *Methylobacterium* sp., DGGE, *quorum sensing*, biofilm

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
MS -	Espectrometria de massa
LC -	Cromatografia Líquida
mgL ⁻¹ -	Miligramas por litro
TEMED -	Tetrametiletilenodiamina
p/v -	concentração peso/volume
μL -	Microlitro
ng -	Nanograma
UFC -	Unidade Formadora de Colônia
AHLs -	Acil Homocarina Lactonas
ARDRA -	Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado - Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis,
DGGE -	Gradiente desnaturante em gel de eletroforese - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis,
GFP -	Green Fluorescent Protein, Proteína Verde Fluorescente
PCR -	Polymerase Chain Reaction, reação em cadeia da polimerase

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Número médio de Unidades Formadoras de Colônia por cabeça de cigarrinha (log UFC/cabeça). G1) actinomicetos, G2) colônias rosa escuras, G3) colônias rosa claras, G4) colônias amarelas, G5) colônias brancas, G6) colônias alaranjadas, G7) colônias brancas de crescimento difuso, G8) colônias amarelas de crescimento difuso, G9) colônias transparentes. Resultado total dos três experimentos de isolamento.....	53
Figura 2- Número médio de Unidades Formadoras de Colônia por cabeça de <i>O. facialis</i> (log UFC/cabeça). G1) actinomicetos, G2) colônias rosa escuras, G3) colônias rosa claras, G4) colônias amarelas, G5) colônias brancas, G6) colônias alaranjadas, G7) colônias brancas de crescimento difuso, G8) colônias amarelas de crescimento difuso, G9) colônias transparentes. Resultado dos três experimentos de isolamento.....	53
Figura 3- Número médio de Unidades Formadoras de Colônia por cabeça de <i>A. citrina</i> (log UFC/cabeça). G1) actinomicetos, G2) colônias rosa escuras, G3) colônias rosa claras, G4) colônias amarelas, G5) colônias brancas, G6) colônias alaranjadas, G7) colônias brancas de crescimento difuso, G8) colônias amarelas de crescimento difuso, G9) colônias transparentes. Resultado dos três experimentos de isolamento.....	54
Figura 4- Número médio de Unidades Formadoras de Colônia por cabeça de <i>D. costalimai</i> (log UFC/cabeça). G1) actinomicetos, G2) colônias rosa escuras, G3) colônias rosa claras, G4) colônias amarelas, G5) colônias brancas, G6) colônias alaranjadas, G7) colônias brancas de crescimento difuso, G8) colônias amarelas de crescimento difuso, G9) colônias transparentes. Resultado dos três experimentos de isolamento.....	54
Figura 5- Número de isolados de cada um dos 16 haplótipos encontrados com o análise de ARDRA com a enzima <i>ALU I</i> de 120 isolados bacterianos de cabeça de cigarrinhas. Haplótipos estão separados por espécie de cigarrinha, e aqueles que tiveram um de seus representantes identificado, estão indicados.....	58
Figura 6- Porcentagem de insetos com resultados positivos para a detecção dos isolados endofíticos de citros, <i>M. mesophilicum</i> e <i>C. flaccumfasciens</i>	61
Figura 7a- Alinhamento das bandas de DGGE dos isolados do dia 22 de março.	63
Figura 7b- Alinhamento das bandas de DGGE dos isolados do dia 05 de maio....	63
Figura 7c- Alinhamento das bandas de DGGE dos isolados do dia 14 de junho...	64
Figura 7d- Alinhamento das bandas de DGGE de todos os isolamentos.....	64

Figura 8-	Gel de DGGE de cabeças de cigarrinhas transmissoras de <i>X. fastidiosa</i> M) Marcadores C) <i>C. flaccumfasciens</i> , X) <i>X. fastidiosa</i> , Mm) <i>M. mesophilicum</i> e Me) <i>M. extorquens</i> . A) <i>A. citrina</i> D) <i>D. costalimai</i> O) <i>O. facialis</i> . Algumas das bandas identificadas estão indicadas. Coleta do dia 22 de março.....	67
Figura 9-	Resultado da comparação entre seqüências de bactérias associadas às cigarrinhas e citros.....	68
Figura 10-	Placas do isolamento de bactérias de cigarrinhas bactérias fluorescentes isoladas de insetos logo após sua aquisição em membrana (A), e também após a alimentação em planta (B).....	70
Figura 11-	Quantidade de AHLs (ng/litro de cultura) produzida por <i>Methylobacterium</i> sp. com diferentes cadeias carbônicas. Picos apresentam concentração da molécula em ng/litro de sebnadante de uma cultura da bactéria em meio CHOI 3 líquido.....	71
Figura 12-	Quantidade relativa de moléculas de AHLs de cadeias longas apresentando uma ou duas insaturações na cadeia carbônica. Valores de Y representam a área dos picos nos gráficos das análises de LC/MS-MS.....	72
Figura 13-	Produção de biofilme por <i>M. extorquens</i> , <i>M. mesophilicum</i> e <i>M. extorquens</i> AM1. Absorbância à 570 nm de uma solução de biofilme bacteriano corado com cristal violeta.....	73
Figura 14-	Aspecto morfológico de alguns mutantes de <i>M. extorquens</i> . 1. <i>M. extorquens</i> AR 1.6/ 2 selvagem, 2. P3A8, 3. P50G10, 4. P19D12, 5. P8A4.....	75
Figura 15-	Quantificação da produção de biofilme por <i>M. extorquens</i> , isolado selvagem e dos mutantes defectivos para a produção de biofilme. Valores indicam a absorbância (570nm) de soluções de cristal violeta. Média de 3 repetições.....	76
Figura 16-	Quantificação de bactérias colonizando plantas de <i>C. roseus</i> expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de tecido vegetal fresco.....	77
Figura 17-	<i>Southern blot</i> com 9 mutantes negativos para biofilme (1 a 9) e o mutante duplo para produção de biofilme e de AHLs, utilizando-se a enzima <i>SmaI</i> . 1) P3A8, 2) P8A4, 3) P8A6, 4) P8B5, 5) P8B8, 6) P8B9, 7) P12F9, 8) P12H2, 9) P18B7 10) P19D12.....	78
Figura 18-	Microscopia de fluorescência de <i>M. mesophilicum</i> habitando vasos xilemáticos de <i>C. roseus</i> . A e B) barra de escala com 10 µm C e D) barra de escala com 5 µm.....	79
Figura 19-	Microscopia de luz de <i>M. extorquens</i> habitando vasos xilemáticos de <i>C. roseus</i> . Barra de escala com 5 µm.....	80

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- <i>Primers</i> utilizados neste estudo para as PCRs de amplificação de 16S rDNA universal e também de bactérias específicas. Além dos primers utilizados para as análises de DGGE.....	45
Tabela 2- Resumo das reações de PCR deste estudo. Combinação de <i>primers</i> e temperatura de anelamento (TA) para cada reação.....	45
Tabela 3- Médias climatológicas para o estado de São Paulo de 1916 a 1990.	56
Tabela 4- Haplótipos encontrados entre os isolados bacterianos de cigarrinhas vetoras de <i>X. fastidiosa</i>	57
Tabela 5- Bandas de DGGE cortadas e seqüenciadas. Resultados das identificações por Blast.....	66
Tabela 6- Lista de mutantes defectivos para a produção de biofilme e moléculas de <i>quorum sensing</i>	74

1 INTRODUÇÃO

Devido à sua importância social e econômica, a citricultura é um dos setores da agricultura paulista que desperta maior atenção, pois gera milhares de empregos diretos e indiretos, além de produtos para exportação, como frutos *in natura* e produtos industrializados, como suco concentrado e essências (<http://www.abecitrus.com.br/>). Entretanto, com o aumento da incidência de doenças como o Cancro Cítrico, Pinta Preta, "Morte Súbita" e a Clorose Variegada dos Citros (CVC) (www.fundecitrus.com.br/), estratégias alternativas de controle dessas doenças devem ser avaliadas, com a finalidade de se reduzir tanto os impactos destes patógenos nos pomares como os efeitos do controle químico no ambiente.

A CVC ou "amarelinho" foi observada no Brasil pela primeira vez em 1987. Esta doença é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (ROSSETTI et al., 1990, HARTUNG et al., 1994), a qual coloniza o xilema das plantas infectadas, disseminando-se rapidamente no pomar, pela transmissão das cigarrinhas vetoras (Cicadellidae) *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* (Young), *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli e *Oncometopia facialis* (Signoret) (LOPES, 1999) e por meio de sementes (LI et al., 2003), reduzindo assim significativamente a produção de frutos em plantas atacadas (ROSSETTI et al., 1990; MACHADO et al., 1994).

Endofíticos são microrganismos que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfetados superficialmente, e que não causam danos às plantas hospedeiras (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). As bactérias endofíticas colonizam, nas plantas, um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos e, portanto são importantes candidatas para o controle destes. Diversos trabalhos têm mostrado o potencial destes microrganismos endofíticos para o controle biológico de doenças e pragas (HALLMANN et al., 1997; M'PIGA et al., 1997, BACON; et al., 2001), e na promoção de crescimento da planta hospedeira (HALLMANN et al., 1997; BENT ; CHANWAY, 1998). Em citros alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de avaliar a interação destes endófitos com a planta hospedeira, bem como o potencial destes microrganismos em controlar doenças e/ou promover crescimento em citros (ARAÚJO et al, 2002a, LACAVA et al., 2004).

Resultados preliminares indicam possíveis interações entre bactérias endofíticas e *X. fastidiosa* no desenvolvimento da CVC (ARAÚJO et al., 2002b; LACAVA et al., 2004; LACAVA et al., 2005), mas a interação de bactérias endofíticas com as cigarrinhas que transmitem a doença não foi ainda avaliada.

O gênero *Methylobacterium* é composto de bactérias de coloração rósea metilotróficas facultativas (PPFM – Pink Pigmented Facultative Methylophyc). Os membros do gênero *Methylobacterium* ocupam os mais diferentes habitats, incluindo solo, água, superfícies de folha, nódulos, grãos de arroz, ar, sedimentos, ambientes tipicamente urbanos (VAN AKEN et al., 2004) e plantas (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002b; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; SY et al., 2001; CHANPRAME et al., 1996). Em citros, *Methylobacterium* spp. têm sido consistentemente isolada como endófito (ARAÚJO et al., 2002b; LACAVA et al., 2004) e LACAVA (2000) e LACAVA et al. (2004), observaram interações com *X. fastidiosa* em estudos *in vitro*. Andreote et al., (2006) descreveram *Methylobacterium mesophilicum* colonizando *Catharanthus roseus*, planta modelo para o estudo de *X. fastidiosa* (MONTEIRO et al., 2001), sugerindo a possibilidade de avaliação da interação entre essas bactérias *in planta*.

Os trabalhos que enfocam comunidades bacterianas é de grande importância para o entendimento do desenvolvimento de doenças de origem bacteriana, já que essa comunidade pode estar interagindo com o patógeno. Métodos dependentes de cultivo têm sido substituídos por técnicas de biologia molecular capazes de permitir o acesso à comunidade bacteriana em seu habitat natural, como a análise do gene de 16S rRNA (AMANN et al., 1995). Das metodologias baseadas no 16S rDNA para o estudo de populações microbianas complexas, o Gradiente Desnaturante em Gel de Eletroforese (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) identifica diferenças baseadas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA (HEUER; SMALLA, 1997). Araújo et al. (2002b) também demonstrou que o DGGE pode auxiliar no estudo da comunidade endofítica, e permitir a avaliação do efeito de bactérias sobre a comunidade endofítica total natural de citros. O entendimento das relações entre a comunidade endofítica de citros, *X. fastidiosa* e o insetos vetores envolvidos na disseminação do patógeno, pode auxiliar o desenvolvimento de uma estratégia eficiente de controle da doença baseados

na compreensão dos fatores envolvidos no aparecimento de sintomas e transmissão da CVC.

A formação de biofilme por bactérias é importante para o desenvolvimento de doenças (SOUZA, et al., 2006) e a sua formação depende de muitos fatores, como por exemplo a produção de moléculas *quorum sensing* (DAVIES et al., 1998; LEITE et al., 2001; LAZDUNSKY; VENTRE; STURGIS, 2004; KJELLEBERG; MOLIN, 2002; PARSEK; GREENBERG, 2004).

Dentro desse contexto o presente trabalho teve como objetivos:

1- Estudar a comunidade bacteriana associada aos insetos vetores de *X. fastidiosa* por meio:

a) De isolamento da comunidade bacteriana associada aos diferentes insetos vetores de *X. fastidiosa* e análise da variabilidade dos isolados bacterianos por meio de ARDRA e DGGE;

b) Da detecção e avaliação a presença de endófitos de citros em cabeças de cigarrinhas utilizando a técnica da PCR, com primers específicos;

c) Da capacidade da espécie *B. xanthophis*, vatora de *X. fastidiosa*, em transmitir a bactéria endofítica de citros *M. mesophilicum*;

2- Avaliar o potencial de *Methylobacterium* sp. em interagir com *X. fastidiosa*. Para isso:

d) Avaliar a produção de biofilme e moléculas de *quorum sensing* por isolados de *Methylobacterium* sp.

e) Obter uma biblioteca de mutantes de *M. extorquens*; e selecionar aqueles mutantes que apresentaram resultados negativos para produção de biofilme e produção de moléculas *quorum sensing*;

f) avaliar a colonização de plantas modelo (*Catharanthus roseus*) pelos mutantes e obter imagens da localização de *Methylobacterium* sp. colonizando *C. roseus* para a comprovação da co-localização destas bactérias com *X. fastidiosa*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos endofíticos e seu papel no controle biológico de pragas e doenças

Endófitos são aqueles microrganismos que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos e raízes. Esta comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, e ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causam prejuízos à planta hospedeira nem formam estruturas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

Com o acúmulo de informações a respeito da interação planta/endófitos (ARAÚJO et al., 2001; AZEVEDO et al., 2000), e os resultados promissores observados, têm sido dada uma atenção especial ao uso de bactérias endofíticas como agentes de controle biológico de inúmeras doenças (HALLMANN et al., 1997; M'PIGA et al., 1997) e como promotoras de crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; BENT; CHANWAY, 1998; NETO et al., 2003) e ainda a utilização de bactérias endofíticas em plantas como fitoremediadores de áreas poluídas (NEWMAN; REYNOLDS, 2005).

A interação entre plantas e microrganismos vem sendo relatada há muito tempo e com exceção da associação entre plantas e fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, acreditava-se que esta interação levasse a formação de lesões nos tecidos vegetais, as quais poderiam causar a morte da planta. Mais recentemente, muitos relatos vêm demonstrando a presença de microrganismos no interior de tecidos vegetais assintomáticos, abrindo desta forma novas perspectivas para o estudo das interações plantas/microrganismos (AZEVEDO et al., 2000).

A presença de fungos e bactérias endofíticos já foi constatada em inúmeras espécies vegetais de interesse econômico no Brasil, entre elas citros (CHILDS et al., 1965; GLIENKE, 1995; ARAÚJO et al., 2001), beterraba açucareira (BUGBEE et al., 1975; JACOBS et al., 1985), algodão (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990), cana-de-açúcar (BODDEY et al., 1991), estilosantes (PEREIRA et al., 1993), banana (PEREIRA et al., 1999), milho (ARAÚJO, 2000), soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004), eucalipto

(PROCÓPIO, 2004) e cacau (RUBINI et al., 2005). Com a finalidade de se verificar a localização e a forma de infecção destes microrganismos endofíticos em plantas hospedeiras, trabalhos foram desenvolvidos utilizando métodos citoquímicos e microscopia eletrônica, possibilitando melhor compreensão destes processos de colonização (RUPPEL et al., 1992).

De acordo com Misaghi e Donndelinger (1990), a íntima relação entre bactérias endofíticas e seus hospedeiros envolveu processos coevolutivos podendo, inclusive, influenciar mecanismos fisiológicos da planta. Com o objetivo de se entender esta interação, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos, e várias espécies de fungos e bactérias foram isoladas de tecidos vegetais sadios. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre os aspectos genéticos, ecológicos e fisiológicos da interação planta/endófitos.

As bactérias endofíticas possuem, da mesma forma que fitopatógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistemicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto (MAHAFFEE et al., 1997; QUADT-HALLMANN et al., 1997b), vasos condutores (MAHAFFEE et al., 1997; HALLMANN et al., 1997) e ocasionalmente o meio intracelular (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996; QUADT-HALLMANN et al., 1997a). Com esta colonização sistêmica da planta, estas bactérias podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre as populações de outros microrganismos presentes no interior da planta.

Atualmente, o sistema agropecuário utiliza basicamente agroquímicos agrícolas para o controle de doenças associadas às lavouras (ROBERTO; YAMAMOTO, 1998). No entanto, estes produtos químicos nem sempre têm o efeito desejado, pois podem causar sérios danos ambientais (McCAULEY et al., 2006), bem como selecionar populações do patógeno resistentes ao princípio ativo (FERNANDES et al., 2001).

A introdução de organismos antagonistas aos fitopatógenos no ambiente onde eles interagem pode resultar em controle efetivo da doença, sem os efeitos indesejados dos defensivos. Muitos fungos e bactérias inibem fitopatógenos por meio da competição por nutrientes, do parasitismo direto e da produção de metabólitos secundários (enzimas líticas e antibióticos) (AZEVEDO, 1998).

Bactérias endofíticas estão presentes em todas as espécies vegetais estudadas, permanecendo em estado de latência ou colonizando ativamente os tecidos de forma

local ou sistêmica. Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos, as bactérias endofíticas apresentam grande potencial para o controle biológico (HALLMANN et al., 1997).

2.2 *Xylella fastidiosa* e a Clorose Variegada dos Citros (CVC)

Xylella fastidiosa é uma bactéria restrita ao xilema que possui células em forma de bastonetes, medindo 0,25-0,35 x 0,9-3,5 µm, Gram-negativa, não móvel, aflagelada, oxidase negativa e catalase positiva, aeróbia estrita, não fermentativa, não halofílica e não pigmentada e nutricionalmente fastidiosa. A temperatura ótima para crescimento está em torno de 26-28°C, o pH ótimo varia 6,5- 6,9, e tem a capacidade de hidrolisar gelatina, utilizar piruvato, não fermentar glucose, sendo negativa para indol, H₂S, lipase, amilase, fosfatase e β-galactosidase (WELLS et al., 1987). Seu DNA possui de 50,5 - 53,1 mol % de Guanina + Citosina (G + C) analisado por métodos independentes (KAMPER et al., 1985). A linhagem 9a5c, que teve seu genoma completamente seqüenciado, apresenta 52,7 % de G+C no genoma de cerca 2,6 Mb (SIMPSON et al., 2000).

Em estudos do Mal de Pierce (*Pierce's disease*) inicialmente foi proposto o nome de *Xylemella fastidiosum* para o agente causal (WELLS et al., 1987). Logo em seguida o nome *X. fastidiosa* passou a ser utilizado em um estudo comparativo com linhagens de diferentes hospedeiros (WELLS et al., 1987). Estudos iniciais desenvolvidos por Kamper et al., (1985) revelaram o conteúdo Guanina + Citosina de *X. fastidiosa* variando de 50,1 a 54,0 moles %, enquanto que para *Rochalimaea quintana* (Rickettsiae) estes valores estão ao redor de 38,5 moles %. Esta diferença demonstrou claramente que 'XLB' e Rickettsiae pertenceriam a espécies diferentes. Além do Mal de Pierce a *Xylella* é responsável por causar doenças em outras plantas como café, pêssogo e laranja (HOPKINS, 1989; HOPKINS; PURCELL 2002). Schaad et al. (2004) descreveu diferentes subespécies de *X. fastidiosa* quando comparou 26 isolados de 10 hospedeiros diferentes: *X. fastidiosa* subsp. piercei, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. multiplex subsp. nov., e *X. fastidiosa* subsp. pauca subsp. nov.

A bactéria *X. fastidiosa* tem sido descrita como agente causal de diversas doenças, tais como: doença de Pierce da videira (HARTUNG, 2004); escaldadura das folhas da ameixeira e do cafeeiro e a doença “phony” do pessegueiro e a Clorose Variegada dos Citros (CVC). No Brasil a CVC foi constatada e descrita pela primeira vez em 1987 em pomares de Colina - SP, em seguida no Triângulo Mineiro e nas regiões Norte e Nordeste do Estado de São Paulo (ROSSETTI et al., 1990; DE NEGRI, 1990; LEE et al., 1992; CHANG et al., 1993; HARTUNG et al., 1994). Entretanto, a bactéria foi isolada causando a CVC, por Leite Jr. e Leite (1991). Posteriormente foi verificada a presença desta bactéria em diversas plantas herbáceas associadas ao pomar de citros.

A CVC recebeu o nome popular de "amarelinho" devido ao aspecto amarelado, na parte superior das plantas afetadas e nos frutos miúdos, precocemente amadurecidos. Os sintomas característicos são observados principalmente em folhas maduras como clorose internerval típica de deficiência de zinco, clorose pontuada de distribuição ao acaso e clorose contínua e restrita a algumas áreas da folha. Além disso, os frutos se tornam pequenos, com casca endurecida amarelamento precoce, elevado teor de açúcar (LARANJEIRA; PALAZZO, 1999) e lesões de cor marrom-escura (MACHADO et al., 1992). Segundo Amorim et al. (1993), as plantas muito afetadas podem apresentar debilidade geral, coloração amarelada, ocorrência de subdesenvolvimento com desfolha e morte de ramos ponteiros (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990).

Estes sintomas parecem estar relacionados à capacidade desta bactéria em obstruir os vasos xilemáticos do hospedeiro, pois a bactéria no interior da planta está sempre associada a uma matriz gelatinosa, e juntas reduzem o lúmen do xilema e como consequência à dinâmica da água dentro da planta fica bastante comprometida, afetando processos fisiológicos vitais, como a fotossíntese, respiração e distribuição de nutrientes (ROSSETTI et al., 1990; MACHADO et al., 1994). De Negri e Garcia Júnior (1993) constataram que em períodos de menor precipitação os sintomas foliares ficam mais evidentes, devido ao estresse causado pela falta de água na planta.

Pelas observações de campo, verificou-se que a doença é mais severa quando atinge plantas jovens, diminuindo quando as árvores atingem 8-10 anos após o plantio.

Assim, é preciso que medidas sejam tomadas visando permitir que as plantas afetadas possam ultrapassar essa fase crítica (DE NEGRI, 1990). Em pomares afetados, a produção de frutos é reduzida de 30 a 35% (PALAZZO; CARVALHO, 1992). Em levantamento realizado em diversas regiões do Estado de São Paulo, os danos atingiram 80% para a variedade Pêra, 67% para Natal e 76% para Valência (AYRES, 2000).

Carvalho (1994) constatou que a CVC ataca todas as variedades comerciais de laranja doce (Pêra, Natal, Hamlin, Valência, Folha Murcha, Baianinha e Barão) sobre diferentes porta-enxertos (Limão Cravo, Trifoliata, Tangerinas Cleópatra e Sunki, Laranja Caipira e etc). No entanto, não foram encontrados sintomas nas tangerinas comerciais (Cravo e Poncan), Tangor Murcote, limões verdadeiros (Siciliano e Eureka) e Lima Ácida Galego, mesmo em plantas localizadas em áreas altamente infectadas.

Resultados do projeto de seqüenciamento do genoma de *X. fastidiosa*, financiado pela FAPESP, mostraram a existência de um operon para a síntese de um polímero semelhante à goma xantana (SIMPSON et al, 2000), o qual foi denominado de goma fastidiana (DA SILVA et al., 2001). Segundo os autores, assim como em *Xanthomonas campestris*, esta goma poderia estar envolvida com a patogenicidade desta bactéria.

2.3 Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas vetoras em citros

X. fastidiosa é uma bactéria restrita aos vasos do xilema de seus hospedeiros e é disseminada por meio de insetos vetores, que são cigarrinhas sugadoras da seiva do xilema, pertencentes às famílias Cicadellidae (Subfamília Cicadellinae) e Cercopidae (PURCELL; FINLAY, 1979b; ROSSETTI et al., 1990; PURCELL; HOPKINS, 1996). Esta bactéria sobrevive em dois ambientes, no xilema das plantas e no lúmen do canal alimentar anterior dos insetos hospedeiros. A baixa concentração de nutrientes disponíveis, a alta turbulência e a pressão são características dos vasos do xilema e do canal alimentar das cigarrinhas vetoras (RAVEN, 1984). Assim, acredita-se que a adesão da bactéria à planta ou inseto, seja vital para sua existência e desenvolvimento (DAVIS, et al., 1981; HOPKINS, 1989).

Em citros, a principal forma de disseminação de *X. fastidiosa* é por meio de cigarrinhas já portadoras da bactéria (Lopes et al., 1996). Até o momento 11 espécies pertencentes às famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) e Cercopidae, que se alimentam necessariamente em vasos de xilema, foram identificadas como potencialmente vetoras de *X. fastidiosa*. (LOPES et al., 1996; ROBERTO et al., 1996; KRÜGNER et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2002). As primeiras espécies identificadas como vetoras foram *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* (Signoret), *Acrogonia citrina* Marucci e Cavichioli (LOPES et al., 1996; ROBERTO et al., 1996, GRAVENA et al., 1997), *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) e *Plesiommata corniculata* Young (KRÜGNER et al., 2000). Posteriormente, foram também relatadas como vetoras as espécies *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Parathona gratio* (Blanchard), *Sonesimia grossa* (Signoret), *A. virescens* (Metcalf) e *Homalodisca ignorata* Melichar (YAMAMOTO et al., 2002). Entretanto, apenas cinco espécies foram identificadas como vetoras de importância: *D. costalimai*, *O. facialis*, *Acrogonia sp*, *B. xanthophis* e *P. corniculata* (LOPES, 1996).

Estas cigarrinhas se alimentam no xilema de plantas de citros infectadas ou em hospedeiros alternativos da bactéria (ROBERTO et al., 1995) e a partir daí transmitem a mesma para plantas saudáveis. Rossetti et al. (1995) observaram que mudas de laranja Natal plantadas em área com alta incidência de CVC apresentaram sintomas apenas quando não estavam protegidas por telado. Além disso, foi constatada a presença de *X. fastidiosa* no aparelho bucal de várias espécies de cigarrinhas em São Paulo. (ROBERTO et al., 1995). As colônias de *X. fastidiosa* encontram-se restritas à parte anterior do tubo digestivo (estomodeu) das cigarrinhas, aderidas ao forro cuticular do pré-cibário, do cibário e da porção anterior do esôfago (PURCELL; FINLAY, 1979b). Após a aquisição de bactérias, as cigarrinhas adultas podem transmitir *X. fastidiosa* indefinidamente, devido à capacidade da bactéria multiplicar-se no vetor (HILL; PURCELL, 1995).

Recentemente, foi verificado que pode ocorrer transmissão destas bactérias de uma planta para outra via raiz (HE et al., 2000; LI et al., 2003), aumentando a taxa de transmissão da doença no pomar. O Manejo Integrado da CVC inclui o controle químico

de insetos, principalmente em pomares com menos de três anos, visando diminuir a transmissão da doença de plantas doentes para pomares sadios (LOPES, 1999).

A eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* (habilidade de um vetor em adquirir e transmitir a bactéria com sucesso) varia dependendo da combinação entre vetor e espécie da planta hospedeira (FRAZIER, 1966; PURCELL, 1980; PURCELL, 1989; SEVERIN, 1949; REDAK et al., 2004).

Grande parte das informações sobre os mecanismos de transmissão de *X. fastidiosa* pelos seus vetores é proveniente dos estudos com os vetores associados à doença de Pierce (PD) em videiras nos Estados Unidos. O mecanismo de transmissão em citros é semelhante ao observado em videira, podendo haver algumas variações em parâmetros temporais da transmissão (LOPES, 1996).

Segundo Purcell (1989), *X. fastidiosa* é transmitida de modo propagativo e não circulativo por cigarrinhas das famílias Cercopidae e Cicadellidae (Cicadellinae). Purcell e Finlay (1979b) observaram que ninfas de *G. atropunctata* perdem a habilidade de transmitir *X. fastidiosa* após a ecdise. Isso ocorre, pois o forro cuticular do estomodeu é perdido durante o processo de muda. A partir de então pode-se dizer que a bactéria se restringe provavelmente à parte anterior do sistema digestivo (estomodeu) e às peças bucais. Imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de fluorescência utilizando um isolado de *X. fastidiosa* expressando constitutivamente a GFP foram feitas e comprovam a presença das bactérias aderidas ao forro cuticular do cibário (câmara de sucção) e na porção anterior do esôfago (PURCELL; FINLAY, 1979b; NEWMAN et al., 2003; NEWMAN et al., 2004).

A eficiência da transmissão de *X. fastidiosa* varia entre as diferentes espécies de cigarrinhas vetoras e de maneira geral, as taxas mais baixas de transmissão de *X. fastidiosa* estão associadas à CVC, onde a transmissão excedeu 10% apenas para *B. xanthophis* e apresentou-se entre 1 e 5% para outras cigarrinhas associadas a doença (REDAK et al., 2004). Krugner et al. (2000) observaram que as cigarrinhas *D. costalimai* e *B. xanthophis*, pertencentes à tribo Cicadellini, apresentam maior eficiência de transmissão, quando comparadas com espécies da tribo Proconiini, tais como *Acrogonia* sp. e *O. facialis*. Entretanto Marucci (2003) observou que a eficiência de

transmissão está mais relacionada com a espécie vetora e planta hospedeira, do que com divisões taxonômicas de tribos.

As cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em citros apresentam baixa eficiência de transmissão quando comparadas aos vetores da estirpe de videiras (LOPES, 1999). Este fato pode estar relacionado com a baixa eficiência de aquisição ou inoculação da bactéria pelos vetores. Além disso, pode ser que a taxa de sobrevivência de *X. fastidiosa* seja muito baixa após a inoculação na planta. A baixa concentração da bactéria em plantas cítricas (ALMEIDA et al., 2001) e o baixo número de vasos colonizados por *X. fastidiosa* em pecíolos de plantas infectadas (6,4 a 13,5%) (ALVES et al., 2003) podem também interferir na eficiência da aquisição pelas cigarrinhas.

O mecanismo de inoculação de *X. fastidiosa* por cigarrinhas ainda não foi completamente desvendado, embora existam algumas hipóteses que tentam explicar este mecanismo (LOPES, 1999). Uma hipótese postula que a tensão negativa do xilema seria capaz de deslocar células da bactéria presentes no canal alimentar do vetor em direção à planta (PURCELL, 1989; ALMEIDA; PURCELL, 2003). Este refluxo poderia ocorrer devido a um assincronismo entre a abertura da válvula pré-cibarial e a dilatação da câmara de sucção (cibário) durante a ingestão de seiva. Os insetos sugadores promovem um decréscimo de pressão no canal alimentar para poder ingerir a seiva do xilema que está sob forte pressão negativa na planta. Se a válvula pré-cibarial abrir antes de se criar uma pressão suficientemente negativa no cibário, pode ocorrer o retorno de líquido da câmara de sucção para a planta. Outra hipótese seria a regurgitação da seiva das plantas durante um processo de seleção do hospedeiro pelo inseto. Caso a seiva amostrada não induza um processo de fagoestimulação no inseto, ela seria regurgitada de volta para a planta e com isso células de *X. fastidiosa* que estariam aderidas ao forro cuticular do canal alimentar seriam inoculadas na planta (PURCELL; 1989).

2.4 Associação de outros microrganismos com insetos vetores

Vários microrganismos estão associados a insetos. Os estudos de vírus fitopatogênicos que têm como vetores insetos, são pioneiros e o primeiro relato

apareceu em 1883, onde a cigarrinha *Ricelia dorsalis* (Hemiptera: Cicadellidae) é a responsável pela transmissão do *rice dwarf virus*. A classificação das diversas maneiras pelas quais um vírus pode estar associado a um inseto, resultando na transmissão destes são: transmissão não-persistente, transmissão semi-persistente, transmissão persistente circulativa e transmissão persistente propagativa (COSTA, 1998).

Alguns estudos mostram a associação de bactérias com insetos, como bactérias associadas à *Bemisia argentifolii* (DAVIDSON et al., 2000), *X. fastidiosa* associada à *Homalodisca coagulata* (COSTA et al., 2000), além dos vários trabalhos sobre a associação de *X. fastidiosa* com *Graphocephala* sp. (PURCELL, 1989; POOLER et al., 1997).

Além de inúmeros estudos que visam a caracterização da associação de insetos e bactérias patogênicas transmitidas por eles, alguns estudos mostram a existência de bactérias endossimbiontes em afídeos como *Buchnera aphidicola* (SHIGENOBU et al., 2000, CHEN; PURCELL, 1997). Dillon et al. (2002) constataram a presença de *Pantoea agglomerans* no sistema digestivo de gafanhotos, as quais são responsáveis pela produção de um ferormônio do inseto, além de desenvolver estudos de mutualismo entre gafanhotos e sua microbiota do mesêntero, composta principalmente por Enterobacteriaceae, que produzem compostos fenólicos antimicrobianos, que contribuem para a defesa dos insetos.

No caso de cigarrinhas (*H. coagulata*), trabalhos descrevem a presença de bactérias endossimbiontes nestes insetos, *Baumania cicadellinicola* e *Sulcia muelleri* (MORAN, et al., 2003; WU et al., 2006). Uma das razões pelas quais os insetos apresentariam bactérias endossimbiontes seria a falta de nutrientes de suas dietas. Bactérias associadas poderiam suprir esta deficiência nutricional e com o tempo ocorreria a redução de seus genomas e elas passariam de bactérias associadas a endossimbiontes obrigatórios dos insetos (MORAN, et al., 2003). No caso de cigarrinhas, a seiva do xilema apresenta a mais baixa concentração de nitrogênio e carbono que qualquer outra parte da planta (REDAK et al., 2004). Com trabalhos de sequenciamento destes endossimbiontes foi sugerido por Wu et al. (2006) que *B. cicadellinicola* apresenta como principal função no inseto prover cofatores,

especialmente aqueles da família das vitaminas B, enquanto *S. mueller* por sua vez, proveria alguns aminoácidos essenciais.

2.5 Análise de comunidade bacteriana

Os microrganismos apresentam grande diversidade genética e desempenham importantes funções na manutenção de ecossistemas (MYERS, 1996). Apesar disso, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos (diversidade de espécies) representa uma pequena fração da diversidade encontrada na natureza (AZEVEDO, 1998). Por meio de estudos comparativos, estima-se que apenas 0,1 à 1,0% dos microrganismos são cultivados por meio do emprego de métodos microbiológicos convencionais (AMANN et al., 1995). As técnicas normalmente utilizadas para avaliar a comunidade microbiana endofítica de plantas não permitem o estudo de microrganismos não cultiváveis ou a análise global da comunidade endofítica, restringindo o estudo a somente grupos já conhecidos. Para se reduzir as dificuldades decorrentes de métodos dependentes de cultivo, ou àqueles que não permitem o estudo de diferentes populações endofíticas presentes na planta hospedeira, o interesse tem sido focalizado no desenvolvimento de técnicas de biologia molecular capazes de permitir o estudo de endófitos em seu habitat natural. Neste contexto, a análise do gene de 16S rRNA tem sido largamente utilizada para o estudo de microrganismos do ambiente (AMANN et al., 1995).

O avanço da biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente para um grande aumento do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Resultados de estudos independentes de isolamento e cultivo, baseados em amplificação e seqüenciamento de fragmentos dos genes de 16S rDNA demonstraram que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é grande (HEAD, 1998). Esses métodos tendem a complementar os métodos baseados em isolamento e cultivo para a realização de levantamentos e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (RANJARD et al., 2000). A aplicação de técnicas baseadas em ácidos nucléicos tem auxiliado muitos estudos de diversidade microbiana. Dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se:

mapas de restrição, hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA, seqüências de subunidades do rRNA, RAPD (Técnica do DNA polimórfico amplificado aleatoriamente - Random Amplified Polymorphic DNA), ARDRA (Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado - Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis), RISA (Análise do espaço ribossomal intergênico - Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), DGGE (Gradiente desnaturante em gel de eletroforese - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (RANJARD et al., 2000).

A ARDRA consiste na amplificação e posterior digestão do rDNA com enzimas de restrição. Este método é baseado no princípio de que os sítios de restrição no rDNA são conservados de acordo com padrões filogenéticos. Desta forma, pode ser utilizado o 16S rDNA para o estudo de grupos heterogêneos ou a região espaçadora entre o 16S e o 23S rDNA para o estudo de grupos muito similares (RANJARD et al., 2000). A metodologia de ARDRA tem sido aplicada para o estudo da diversidade microbiana associada a vegetais ou a diferentes solos (OVREAS; TORSVIK, 1998; CHELIUS; TRIPLETT, 2001; LAGACÉ et al., 2004), análise da diversidade genética de bactérias degradadoras de pesticidas (DESAINT et al., 2000) e caracterização de bactérias diazotróficas (CRUZ et al., 2001).

Das metodologias baseadas no 16S rDNA para o estudo de populações microbianas complexas, o DGGE identifica diferenças baseadas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA. Esta dupla fita submetida a um crescente ambiente desnaturante se separa em fragmentos discretos, chamados de domínios de desnaturação. A temperatura de desnaturação (T_m) de domínios individual é específica para cada seqüência. Quando a T_m de um domínio de desnaturação menor é alcançado, o DNA se tornará parcialmente desnaturado criando moléculas ramificadas, com menor mobilidade no gel de poliacrilamida. No DGGE, o ambiente desnaturante é criado pela combinação uniforme de temperatura de corrida variando entre 50 e 65°C e um gradiente desnaturante linear de uréia e formamida (HEUER; SMALLA, 1997)

O DGGE tem recebido especial atenção por ter sido utilizado com sucesso em diferentes habitats naturais (MUYZER et al., 1993; BRIM et al., 1999; FANTROUSSI et al., 1999; HENCKEL et al., 1999; YANG; CROWLEY, 2000; TZENEVA et al., 2004); em comunidades complexas de bioreatores industriais (DAR et al., 2005), no estudo da

comunidade microbiana associada a plantas transgênicas (HEUER; SMALLA, 1999), bactérias endofíticas (GARBEVA et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002, LACAVA et al. 2006) e para avaliar a comunidade bacteriana associada a vespas (*Vespula germanica*) (REESON et al., 2003). Desta forma, tais técnicas se mostram eficientes na avaliação da diversidade bacteriana e dos efeitos de alteração físico-químicas do ambiente sobre a comunidade microbiana cultivável e não cultivável.

2.6 Moléculas de *quorum sensing* e formação de biofilme

As Acil homoserina lactonas (AHLs), são moléculas de baixo peso molecular produzidas por diversas bactérias Gram-negativas. Estas moléculas apresentam a capacidade de atuar na comunicação celular bactéria-bactéria e bactéria-planta (CHA et al., 1998; GRAM et al., 1999, LAZDUNSKY; VENTRE; STURGIS, 2004) regulando a expressão gênica responsável por diferentes fenótipos, sendo por esse motivo conhecidas como moléculas de *quorum sensing*. (SHAPIRO, 1998). O exemplo clássico de regulação da expressão gênica por moléculas *quorum sensing* é a regulação da bioiluminescência em *Vibrio fischeri* por N-3-oxo-hexanol-homoserina lactona (EBERHARD et al., 1981, FUQUA; WINANS, 1994). Outros mecanismos, como a produção de compostos antifúngicos (WOOD et al., 1997), e produção de polissacarídeos extracelulares (VON BODMAN; FARRAND, 1995) também são descritos como regulados por AHLs (CAMILLI; BASSER, 2006). Loh et al. (2002) descrevem a importância das AHLs na regulação de genes que controlam interações bactéria-planta, podendo resultar na simbiose entre *Rhizobium* spp. e leguminosas, na patogenicidade de *Erwinia* spp, ou na associação epifítica de *Pseudomonas* spp. com a planta hospedeira. A formação de biofilme é também controlada por AHLs (DAVIES et al., 1998; LEITE et al., 2001; LAZDUNSKY; VENTRE; STURGIS, 2004; KJELLEBERG; MOLIN, 2002; PARSEK; GREENBERG, 2004).

Biofilmes podem ser definidos como comunidades estruturadas de agregados microbianos, fechados em uma matriz de polissacarídeos, fixados em uma superfície inerte ou viva (COSTERTON et al., 1995). O termo biofilme também é empregado para designar comunidades de microrganismos (bactérias ou fungos) mobilizadas sobre uma

superfície, que abriga, estabiliza e otimiza a vida do organismo (KOLENBRANDER, 2000). A situação oposta é caracterizada pela vida livre dos microrganismos, também chamados de planctônicos. Muitos microrganismos não ficam restritos a um estilo de vida e podem optar pela vida em comunidade durante um determinado período do ciclo de vida e retornar à vida livre posteriormente. Esta liberdade fenotípica permite que bactérias se adaptem as alterações impostas pelo meio ambiente ao qual estão submetidas. A transição entre um estado e outro é feita de maneira controlada e é altamente complexa sob o ponto de vista fisiológico, bioquímico e molecular (O' TOOLE et al., 2000; STOODLEY et al., 2002; LASA, 2006). Os biofilmes podem ser formados por uma única espécie de bactéria ou por diferentes espécies. (WATNICK; KOLTER, 2000).

Os principais benefícios da vida em um biofilme são, melhor comunicação entre células, em função da solução de continuidade entre elas, facilitando as atividades bioquímicas, a divisão de trabalho, a possibilidade de realizar ações coletivas, cooperação dentro do grupo e também com colônias vizinhas (LEITE et al., 2001). Bactérias em biofilmes são capazes de se comportar de maneira altruísta e assim aumentar a capacidade de competição do grupo (KREFT et al., 2001; KREFT, 2004).

A formação de um biofilme bacteriano passa por diferentes fases. Primeiro as células estabelecem uma associação reversível com organismos já instalados na superfície-alvo até que uma porção seja escolhida para ser o ponto de ligação. Em seguida, as células dão início à formação de microcolônias. O processo segue com a produção de uma matriz extracelular, em grande parte formada por polissacarídeos extracelulares, que caracteriza e organiza tridimensionalmente o biofilme. Por último algumas bactérias podem eventualmente se desalojar e procurar outras superfícies para colonizar (VAN HOUDT et al., 2005). A idéia de que devemos tratar as populações de bactérias como organismos multicelulares vem ganhando mais adeptos desde de que foram descobertas moléculas sinalizadoras que são produzidas pelos indivíduos que interagem entre si levando a uma evolução social (STOODLEY et al, 2002; WEST et al., 2006).

Em *Pseudomonas fluorescens* B52, verificou-se que a formação máxima de biofilme se deu entre 20 e 50 horas após a repicagem em meio líquido. Durante esse

período, observou-se, ao microscópio de varredura, que um grande número de células estavam ligadas à matriz de exopolissacarídeos. Em períodos superiores a 50 horas não foram observados incrementos na estrutura do biofilme, mas sim reduções. Culturas velhas de *P. fluorescens* produzem liases de exopolissacarídeos que são especificamente direcionadas para a degradação (digestão) do biofilme e que AHLs poderiam estar envolvidas na sinalização para a formação de biofilmes. (ALLISON et al., 1998).

Fatores de patogenicidade são geralmente regulados por *quorum sensing*. Em *P. aeruginosa* a percepção de AHLs direta ou indiretamente afeta a expressão de mais de 200 genes, entre eles genes que podem estar relacionados com a produção de biofilme (WALKER et al., 2004) Isto sugere que a regulação por AHLs em *P. aeruginosa* poderia explicar o comportamento deste patógeno, já que *P. aeruginosa* é capaz de formar biofilme (SMITH; IGLEWSKI, 2003).

Microarranjos de DNA foram utilizados para estudar a expressão de genes relacionados com a formação de biofilme em *Escherichia coli*. Vinte e dois genes foram induzidos significativamente, incluindo genes de resposta ao estresse e 11 genes com função desconhecida. A expressão de genes para a formação de biofilme em *E. coli*, principalmente genes relacionados à resposta ao estresse, está fortemente associada às condições ambientais (REN et al., 2004). Recentemente, um trabalho descrevendo a rede complexa de transcrição que controla os estágios iniciais da formação de biofilme por *E. coli*, descreve as vias regulatórias do processo, formadas por 16 reguladores principais e centenas de genes regulados por eles (PRÜß et al., 2006).

A goma xantana produzida pelo fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é constituída por uma seqüência repetitiva de pentassacarídeos apresentando unidades de manose, ácido glucorônico e celobiose. A goma fastidiana, produzida por *X. fastidiosa*, apresenta algumas características comuns com a *X. campestris* pv. *campestris* (DOW; DANIELS, 2000). Em função de outras similaridades na capacidade patogênica dessas bactérias que atacam citrus, acredita-se que a patogenicidade da *X. fastidiosa* também dependa da regulação da produção da goma fastidiana, uma vez que mutações em qualquer um dos genes reguladores (*rpfF*) da produção da goma xantana afetam a patogenicidade da *X. campestris* pv. *campestris*

(TANG et al., 1991). Em trabalho recente foi demonstrado que mutantes de *X. campestris* pv. *campestris* que apresentam alterações nas últimas etapas da síntese de goma xantana também exibem redução de agressividade contra plantas utilizadas nos testes de virulência. Com a proximidade dos genomas de *X. campestris* e *X. fastidiosa* foi proposto que o biofilme poderia também ser importante no desenvolvimento de doenças como a CVC (SIMPSON et al., 2000). Newman et al. (2004) em estudos com *X. fastidiosa* descreveram o papel da molécula sinal difundível (*rpfF*) (TANG et al., 1991) em *X. fastidiosa*, como sendo ela a responsável pela formação de biofilme de *X. fastidiosa* (DA SILVA et al., 2001) no interior do estomodeu de insetos vetores e por sua transmissão para plantas.

2.7 Utilização de mutantes em estudos genéticos

Transposons são elementos transponíveis de DNA que têm a capacidade de sair de uma região do genoma e se incorporar em outra. Sendo o movimento do transposon um processo aleatório, quando estes elementos se integram em um genoma, podem se inserir no meio de um gene, tornando-o inativo. Em plantas, uma série de transposons tem sido usados como ferramenta, para isolamento e caracterização de vários genes ou fenótipos. O primeiro gene de planta clonado por transposon, foi o gene bronze, de milho, que codifica UDP-glucose: flavonóide 3-O-glucosiltransferase, uma enzima da via metabólica das antocianinas (FEDOROFF et al., 1984). Genes que tiveram sua expressão alterada pela inserção do transposon são recuperados por meio da amplificação por PCR do DNA extraído do indivíduo com fenótipo mutante (O'TOOLE; KOLTER, 1998; REEVE et al., 1999). Esse processo tem sido utilizado na identificação de genes em *Caenorhabditis elegans* e milho (BENSEN et al., 1995). Em bactérias é grande o número de trabalhos com transposons para a obtenção de mutantes para estudos genéticos, e também é extenso o número de plasmídios e transposons que foram desenhados especificamente para cada bactéria (REEVE et al., 1999; KWON; RICKE, 2000; O'TOOLE; KOLTER, 1998).

Para a bactéria *M. extorquens* AM1, alguns trabalhos com a utilização de transposons foram feitos com o intuito de estudar genes de metilotrofia (MARX et al.,

2003), genes responsáveis para síntese de carotenóides e para coloração das colônias (VAN DIEN et al., 2003a), e genes responsáveis pelos metabolismos C3 e C4 (VAN DIEN et al., 2003b). Em todos, uma biblioteca de mutantes foi feita e os mutantes defectivos para as características de interesse tiveram o gene interrompido seqüenciado para a identificação. Trabalhos de complementação dos mutantes com plasmídeos contendo o gene interrompido também são feitos para a confirmação da atividade dos genes (MARX et al., 2003)

2.8 Utilização da GFP (Proteína Verde Fluorescente – Green Fluorescent Protein) para monitoramento de bactérias

A GFP é uma pequena proteína encontrada na água-viva *Aequorea victoria*, possui a propriedade de fluorescer quando excitada por UV ou por luz azul de onda curta (CHALFIE et al., 1994). A fluorescência se deve a três aminoácidos contínuos próximos ao aminoácido terminal da proteína, e não requer cofatores exógenos para a fluorescência (CODY, et al., 1993). Isso significa que quando o gene da GFP é colocado sob controle de um promotor, o momento e a duração da expressão do promotor podem ser estudados em tempo real no tecido vivo, sem fixação ou destruição de células (GAGE et al., 1996).

Chalfie et al. (1994) relatam o uso de GFP como uma marca para os estudos de expressão de um gene em uma célula específica de um tecido vivo. Em estudos de populações bacterianas pode ser necessário marcar a linhagem de interesse para o seu monitoramento, mas esta marcação não pode afetar os membros da comunidade. A utilização da GFP em análises biológicas tem aumentado muito, pois não necessita da destruição das células nem adição de nenhum substrato exógeno (BLOEMBERG et al., 1997). A GFP é utilizada também para o monitoramento de expressão de genes e localização de proteínas, estudos de interação bactéria-hospedeiro, infecção viral e movimentação do vírus na planta (GAGE et al., 1996).

A GFP tem sido utilizada com sucesso em estudos de diferentes aspectos do processo de infecção de insetos por *Paecilomyces fumosoroseus*, um fungo que tem a capacidade de colonizar insetos e realizar controle biológico destes, (CANTONE;

VANDERBERG. 1999) além de estudos com Microscopia de Fluorescência da colonização de *Folsomia candida* por bactérias habitantes do sistema digestivo (THIMM; TEBBE, 2003). Newman et al. (2003) observaram em sistema digestivo de cigarrinhas a presença de *X. fastidiosa* expressando constitutivamente a GFP. Figueira et al (2000) criaram diferentes mutantes de *M. extorquens* que expressam a GFP.

2.9 O gênero *Methylobacterium* e sua importância como um endófito

O gênero *Methylobacterium* é composto de uma variedade de bactérias de coloração rósea metilotróficas facultativas (Metilotróficas Facultativas com Pigmento Rosado - PPFM – Pink Pigmented Facultative Methylophyc), sendo. Este gênero pertence à subclasse $\alpha-2$ de *Proteobacteria* e possui 14 espécies descritas: *M. chloromethanicum*, *M. dichloromethanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. lusitanum*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. populi*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. suomiense*, *M. thiocyanatu* e *M. zatmanii*. Os membros do gênero *Methylobacterium* ocupam os mais diferentes habitats, incluindo solo, água, superfícies de folha, nódulos, grãos de arroz, ar, sedimentos, e ambientes tipicamente urbanos (VAN AKEN et al., 2004). Além de colonizarem endofiticamente diversas espécies de plantas (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002b; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; SY et al., 2001; CHANPRAME et al., 1996).

A presença do gene da nitrogenase (NifH) e de genes para a nodulação (gene nodA) já foi descrita em espécies deste gênero (SY et al., 2001), sugerindo a possibilidade destes organismos fixarem N_2 . *Methylobacterium* spp. também é capaz de sintetizar pectinase e celulase e com isso induzir resistência às plantas hospedeiras (FERREIRA FILHO, 2001); e também apresenta uma importante função no crescimento vegetal (SY et al., 2005) Abanda-Nkpwatt et al. (2006) observaram maior crescimento de plântulas quando expostas ao sobrenadante de *M. extorquens*, sugerindo que a molécula responsável pelo crescimento vegetal é produzida e excretada pela bactéria.

Em citros, *Methylobacterium* spp. têm sido consistentemente isoladas como endófitos (ARAÚJO et al., 2002b; LACAVA et al., 2004). LACAVA (2000) e LACAVA et al. (2004), em estudos de interação *in vitro* com *X. fastidiosa* e bactérias do gênero

Methylobacterium spp. e *M. mesophilicum* isoladas endofiticamente de *Citrus* spp. afetadas pela CVC, observaram um estímulo no crescimento deste fitopatógeno vascular. Estes resultados da interação *in vitro*, assim como os dados de isolamento de bactérias endofíticas de citros, realizados por ARAÚJO et al. (2002b) e Lacava et al. (2004), sugerem que a presença de *Methylobacterium* spp. e *X. fastidiosa* e suas concentrações dentro das plantas pode ser resultado de uma interação onde *X. fastidiosa* é auxiliada por *Methylobacterium* spp. durante o desenvolvimento de sintomas em plantas. Uma das hipóteses é a utilização do biofilme de *Methylobacterium* spp. Por *X. fastidiosa* durante a colonização da planta e

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Insetos, bactérias e planta

Os insetos, *D. costalimai* (Young), *A. citrina* (Marucci & Cavichioli) e *O. facialis* (Signoret) utilizados nos experimentos de avaliação da comunidade bacteriana foram coletados em Bebedouro (Fundecitrus – Centro de Citricultura. SP, Brasil, 20°50'57"S, 48°29'26"W) em campos de citros afetados por CVC. As coletas foram feitas em três datas (23/março, 05/maio e 14/junho de 2002) usando-se uma rede entomológica. Para transporte ao laboratório os insetos foram mantidos em mudas de laranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck cv. pêra).

Para os experimentos de transmissão e aquisição de uma bactéria endofítica por uma cigarrinha vetora de *X. fastidiosa* foram utilizados, o isolado SR1.6/6 da bactéria *M. mesophilicum* (LACAVA et al. 2004; LACAVA et al. 2006; ANDREOTE et al. 2006) previamente isolada de plantas de citros (ARAÚJO, 2000) e a mesma linhagem contendo o gene para expressão constitutiva da GFP, que compõe a coleção de microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, ESALQ/USP. As cigarrinhas da espécie *B. xanthophis* foram cedidas pelo Laboratório de Transmissão do Departamento de Entomologia, ESALQ/USP.

Foi utilizada, para os experimentos de avaliação da produção de biofilme e moléculas *quorum sensing* e para obtenção de mutantes o isolado AR 1.6/2 (ARAÚJO, 2000) de *M. extorquens* do Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, ESALQ/USP.

A microscopia para a localização do endófito dentro de plantas foi feita utilizando-se os dois isolados de *Methylobacterium* sp. citados acima (SR 1.6/6 e AR 1.6/2).

A planta *Catharanthus roseus*, que já foi descrita como planta modelo para o estudo de *X. fastidiosa* (MONTEIRO et al., 2001) e endofíticos (ANDREOTE et al., 2006) foi utilizada para os experimentos de microscopia e transmissão.

Para a microscopia foram utilizadas plantas axênicas e para isto as sementes foram esterilizadas superficialmente com álcool 70% por 5 minutos, hipoclorito (1,5%) por 1 minuto e lavadas duas vezes com água destilada e autoclavada. Foram então

colocadas para germinar em potes plásticos com meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

3.2 Meios de cultura

3.2.1 TSB (Tryptone Soy Broth) 5%

Extrato de triptona de soja	1,5g
água	1000ml
pH	6,8

3.2.2 CHOI 3

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,5 g
KH_2PO_4	1,305 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,02 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,45 g
Solução de metais*	10 ml
Ágar	15 g
Água	1000 ml

*Solução de metais

$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2 g/
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2 g/
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,26 g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,08 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,08 g
H_3BO_3	0,06
Água	1000 ml

Metanol (10 ml/l), foi adicionado após autoclavar o meio de cultura.

Tetraciclina 50 µg/ml, foi adicionada para o crescimento das bactérias transformadas com GFP. Canamicina 100 µg/ml foi adicionada para o crescimento das bactérias mutantes.

3.2.3 M3 (SPW modificado)

peptona de soja	4 g
extrato de malte	5 g
triptona	1 g
sacarose	10 g
K ₂ HPO ₄	1,2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4 g
Glutamina	0,4 g
Histidina	0,2 g
Ágar	15 g
Água	1000 ml
pH	6,6

3.3 Soluções

3.3.1 PBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24
Água	1000 ml
pH	7,4

3.3.2 Tris EDTA (TE)

Tris-HCL (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

3.3.3 Tampão de extração

Tris-HCl (pH 8,0)	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS (p/v)	1%.
pH	8,0

3.3.4 Tampão de carregamento de amostras em DGGE 6X

azul de bromofenol	0,5 g
sucrose	400 g
EDTA (pH 8,0)	0,1 M
SDS	5 g
Água	1000 ml

3.3.5 Solução A estoque para DGGE

acrilamina (37:1)	60 g
Água	1000 ml

3.3.6 Solução B estoque para DGGE

acrilamina (37:1)	60 g
uréia formamida	800 g
Água	1000 ml

3.3.7 Solução S estoque para DGGE

acrilamina (37:1)	80 g
uréia formamida	0 g
Água	1000 ml

3.4 Isolamento de bactérias associadas à cabeça das cigarrinhas

Como mencionado anteriormente, os insetos foram coletados em campos de citros afetados por CVC, na cidade de Bebedouro – SP, em três datas diferentes (22/março, 05/maio e 14/junho de 2002). Cada coleta resultou em 10 insetos de cada espécie (*O. facialis*, *A. citrina* e *D. costalimai*) para as análises por isolamento. No total 90 insetos foram analisados. Suas cabeças foram separadas do corpo e maceradas, uma a uma, em 1 ml de tampão PBS. Uma alíquota de 100 µL da solução resultante foi semeada em meio TSB 5%. As placas foram incubadas a 28°C por 5 dias e as colônias foram contadas, separadas por grupos morfológicos e o número de unidades formadoras de colônia por cabeça (UFC/cabeça) foi determinado. Os isolados foram estocados em frascos com TSB 5% (ARAUJO et al., 2002a)

Dentre eles, 120 isolados foram escolhidos como representantes dos principais grupos morfológicos e utilizados para as análises de ARDRA .

Os isolamentos foram feitos com a cabeça inteira do inseto, pois o objetivo foi avaliar as bactérias que poderiam interagir com *X. fastidiosa*, que coloniza o sistema digestivo anterior dos insetos. Não foi feita uma desinfecção superficial, pois a capilaridade do estilete das cigarrinhas é grande e a esterilização acaba ocorrendo também no interior do tubo digestivo.

3.5 Extração de DNA

De uma cultura bacteriana em meio TSB 5% líquida, 1,5 mL foram centrifugados por 2 minutos a 3.000 g, o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de TE (10 mM de Tris-HCl; pH = 8) e centrifugado novamente. O precipitado foi novamente ressuspendido em 500 µL de TE e adicionado esferas de vidro (0,1 mm de diâmetro – Sigma) e 30 µL de SDS 10 %. Esta suspensão foi agitada (3000 bpm) em agitador de pérolas (*Bead beating*) por 30 segundos.

Foram adicionados 500 µL de fenol e homogeneizados por inversão. A mistura foi centrifugada por 10 minutos (12000 g), coletada a fase aquosa e adicionados 400 µL de clorofane (25 fenol: 24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico), homogeneizado e

centrifugado novamente (12000 g) por 5 minutos. A fase aquosa foi coletada e 400 µL de clorofil (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico) foram adicionados, misturados e centrifugado (12000 g) por 5 minutos. A fase aquosa foi novamente coletada, adicionada 1/10 volume de 5M NaCl e 0,6 volume de isopropanol, mantido à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugado (12000 g) por 10 minutos.

O precipitado foi lavado com isopropanol 80 % e secado a vácuo por 5 minutos. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de TE e a integridade do DNA foi verificada correndo 5 µL em gel de agarose (0,8 %).

A extração de DNA das cabeças das cigarrinhas foi feita para 10 cabeças de cada espécie em cada coleta de campo. Para isto cada inseto teve sua cabeça separada do corpo e cada cabeça foi congelada em nitrogênio líquido e triturada em 1 ml de tampão de extração. A extração foi feita conforme o protocolo apresentado para a extração de DNA bacteriano.

3.6 PCR

Para a amplificação da região do 16S rDNA das bactérias isoladas da cabeça das cigarrinhas, foram utilizados os *primers* R1387 e PO27F (Tabela 1). As reações foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), tampão 1X e 1 µL de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cyclor 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94° C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94° C; 1 minuto a 62,5° C; 1 minuto a 72° C, e uma extensão final de 7 minutos a 72° C.

O fragmento de DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% a 3 V.cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotodocumentado.

Tabela 1- *Primers* utilizados neste estudo para as PCRs de amplificação de 16S rDNA universal e também de bactérias específicas. Além dos primers utilizados para as análises de DGGE

Primer	DNA alvo	Sequencia (5' _3')	Referência
MMV6	<i>M. mesophilicum</i> (SR1.6/6) 16S rDNA	ACGTGGAGAGATTCACGG	ROSSETTO et al., 2000
CF16S	<i>C. flaccumfaciens</i> 16SrDNA	ATCAGGAGCTTGCTCCTGTGA	ROSSETTO et al., 2000
530R	16S rDNA	CCGCGGCKGCTGGCAC	LANE et al., 1985
968F	16S rDNA	AACGCGAAGAACCTTAC	HEUER et al., 1985
U968GC	16S rDNA	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGG- AACGCGAAGAACCTTAC	HEUER et al., 1999
PO27F	16S rDNA	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
R1378	16S rDNA	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA CG	HEUER et al., 1999

Tabela 2- Resumo das reações de PCR deste estudo. Combinação de *primers* e temperatura de anelamento (TA) para cada reação

Reação	Primer Forward	Primer Reverse	TA	Número de ciclos
16S rDNA	PO27F	R1378	62,5° C	30
Detecção de <i>M. mesophilicum</i>	MMV6	R1378	62° C	35
Detecção de <i>C. flaccumfaciens</i>	CF16S	530R	56° C	35
DGGE, segunda reação	U968GC	R1378	55° C	30
Reação para reamplificação de bandas de DGGE	968F	R1378	<i>Touch down</i> de 66 à 62° C	30

Para detecção de bactérias endofíticas de citros nas cabeças das cigarrinhas, foram feitas análises por PCR da presença de dois endófitos *M. mesophilicum* e *C. flaccumfaciens* (ARAÚJO, 2000, ROSSETTO et al., 2000).

A primeira reação foi a de amplificação do gene 16S rDNA usando-se como molde o DNA total da cabeça das cigarrinhas e em seguida foi feita uma reação de PCR aninhada utilizando-se como molde o produto da PCR 16S rDNA. A segunda reação de PCR foi realizada utilizando-se o mesmo protocolo apresentado para a amplificação do

gene 16S rDNA, porém para a detecção cada bactéria endofítica foi feita com primers específicos. Foram utilizados os primers MMV6 e R1378 (Tabela 1), que geram um produto de 300 pb, para a detecção de *M. mesophilicum*. CF16S e 530R (Tabela 1), que geram um produto de 400 pb foram utilizados para a detecção de *C. flaccumfaciens*. as reações foram feitas com o mesmo protocolo utilizado para a reação de 16S rDNA e o detalhamento da reação de amplificação pode ser encontrado na Tabela 2.

Para a análise de DGGE também foi utilizada a estratégia de utilização de dois ciclos de amplificação, sendo o primeiro ciclo utilizando-se os primers para 16S rDNA como DNA total das cigarrinhas como molde e o segundo ciclo utilizando-se o produto do PCR 16S rDNA diluído 1:10 como molde e os primers U968GC e R1378. As condições utilizadas foram as mesmas utilizadas para as duas reações, Detalhes dos primers utilizados e da reação de amplificação podem ser vistos na Tabela 2.

Detalhes de todos os *primers* utilizados neste trabalho podem ser vistos na Tabela 1 apresentada anteriormente.

3.7 Caracterização de isolados por ARDRA

A variabilidade genética de 120 bactérias associadas a cabeça das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* foi analisada por meio da técnica do ARDRA. Para isso, um μg do produto da PCR 16S rDNA amplificado foi digerido com 2U da enzima de restrição *ALU I* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) por 5 horas à 37°C. Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose a 2 % a 5 V.cm⁻¹. O tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotodocumentado. As bactérias foram separadas em haplótipos de acordo com o padrão de digestão apresentado. Algumas bactérias, representantes de alguns haplótipos tiveram seu 16S rDNA seqüenciados.

3.8 DGGE

A diversidade da comunidade bacteriana associada a cabeça dos insetos foi analisada via DGGE. Para isto foram feitas rações de PCR como indicado anteriormente.

Para a preparação e corrida do gel de DGGE, foram feitas duas soluções estoque: A e B. Essas soluções foram misturadas em proporções de tal forma a compor um gel de 45 a 65% de desnaturação. A solução de alta concentração (H) foi feita com 4,7 mL de A e 20,3 mL de B e a solução de baixa concentração (L) com 11 mL de A e 14 mL de B. Para a polimerização foram adicionados 150µL de persulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ 10% e 12µL de TEMED ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$) em cada uma das soluções H e L. O *stacking* gel, preparado para as canaletas, foi constituído de 5mL da solução S com adição de 25µL de persulfato de amônio 10% e 7µL de TEMED.

Os produtos de amplificação foram aplicados no gel juntamente com tampão de carregamento de amostras 6x. A corrida foi no aparelho *PhorU2 system* (Ingenu), por 15h a 100V. Após a corrida, o gel foi corado com *SYBR Green I nucleic acid gel stain* (1:10,000 dilution; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) e fotodocumentado.

As imagens dos géis foram analisadas com o software GelCompar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

As bandas proeminentes foram cortadas do gel colocadas em 10 µL de água MilliQ e reamplificadas como os primers 968F and R1378. O protocolo consiste em utilizar 1 µL da água como molde para a reação e a amplificação consistiu em 5 minutos a 94° C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto de anelamento em touch down começando com 66° C descendo-se um grau a cada dois ciclos até 62° C, 1 minuto a 72° C e uma extensão final de 10 minutos a 72° C. As bandas reamplificadas foram então submetidas ao seqüenciamento.

3.9 Identificação e análise de seqüências

Os produtos da PCR 16S rDNA isolado representantes de haplótipos foram enviados para sequenciamento e as seqüências foram analisadas juntamente com as

seqüências das bandas de DGGE, cortadas do gel e reamplificadas, e seqüências de isolados endofíticos de citros (ARAÚJO, 2000) usando o software MEGA 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). As seqüências foram comparadas com seqüências do banco de seqüências do NCBI para identificação (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.10 Bioensaio de transmissão

Avaliação da capacidade de aquisição, e transmissão da bactéria endofítica de citros, *M. mesophilicum* pela cigarrinha vetora de *X. fastidiosa*, *B. xanthophis*.

Foram utilizadas cigarrinhas (*B. xanthophis*) que foram confinadas em tubos de acrílico e alimentadas por 12 a 16 horas com solução da bactéria *M. mesophilicum* expressando a GFP crescida em meio M3 entre membranas (Anexo A), sobre fundo preto e sob luz branca a 25° C (PURCELL; FINLAY, 1979a). Antes da alimentação em membrana foi feito isolamento de 5 cabeças de cigarrinhas que foram maceradas com 1 ml de tampão PBS e 100 µL desta solução semeados em meio CHOI 3 contendo tetraciclina para controle. Após o período de alimentação, foi feito o isolamento da cabeça de 5 insetos, da mesma maneira descrita anteriormente, para avaliar a aquisição imediatamente após a alimentação. Os insetos foram transferidos e confinados em gaiolas sobre folhas das plântulas de *C. roseus* (Anexo B) em casa de vegetação, onde se alimentaram por 24 horas. Como controle negativo foi utilizado tampão PBS para alimentação e algumas plantas não receberam insetos.

Depois do período de alimentação nas plantas, foi realizado o isolamento de bactérias da cabeça dos insetos restantes por trituração em 1 ml de tampão PBS e 100 µL da solução foi semeada em CHOI 3 contendo tetraciclina.

Após 30 dias, as plântulas inoculadas foram submetidas à desinfecção superficial (álcool 70% por 5 minutos, hipoclorito (1,5%) por 1 minuto, álcool 70% 1 minuto e duas lavagens com água destilada e autoclavada) e isolamento por trituração das folhas em tampão PBS. As folhas foram cortadas, pesadas e trituradas em 1ml de PBS. Cem µL da solução foi então semeada em meio CHOI 3 contendo tetraciclina. A análise da colonização foi feita após 5 dias fazendo-se a observação das placas sob luz Ultra Violeta (UV).

3.11. Avaliação da produção de moléculas de *quorum sensing* por *Methylobacterium extorquens*

A produção de moléculas de *quorum sensing* (AHLs) por *M. extorquens* (AR 1.6/2) e *M. mesophilicum* (SR 1.6/6), foi avaliada através de bioensaios utilizando-se as bactérias indicadoras, *Pseudomonas putida* F117 (pKR-C12), *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pFC372) e *Chromobacterium violaceum* CV026. Foram também quantificadas por MS LC/LC segundo Neito-Peñalver et al. (2006).

3.12 Obtenção de mutantes de *Methylobacterium extorquens* e detecção de defectivos para a produção de biofilme e moléculas de *quorum sensing*

A metodologia de geração de mutantes com o uso do transposon mini-Tn5 foi realizada segundo Reeve et al. (1997).

A identificação de bactérias mutantes com alteração na produção de biofilme foi realizada segundo O'toole et al. (2000), utilizando-se cristal violeta. Resumidamente, as bactérias foram crescidas em meio de cultura CHOI 3 (contendo canamicina) líquido (100 µL) por 5 dias, em placas de microtítulo de poliestireno. As bactérias que produziram biofilme ficaram grudadas às paredes da placa. Cem µL de cristal violeta 10% foi adicionado a cada poço da placa e incubado por 15 minutos. As placas foram então lavadas 3 vezes com água destilada, e 100 µL de etanol 70% foram adicionado e as bactérias formadoras de biofilme que se encontra aderido à parede dos pocinhos se dissolvem, formando uma solução uniforme. Após 15 minutos de incubação, a absorbância a 570 nm foi medida. As bactérias que não produziram biofilme apresentaram absorbância baixa, próxima ao controle negativo (meio de cultura esterilizado).

As bactérias defectivas para a produção de AHLs foram detectadas através do bioensaio com *P. putida* F117 (NIETO-PEÑALVER et al., 2006). As bactérias mutantes foram crescidas por 5 dias em placas em meio CHOI 3 (contendo canamicina) sólido. Após uma camada de meio TSB 5% semi-sólido contendo *P. putida* F117 (NIETO-PEÑALVER et al., 2006) foi colocada sobre a placa com os mutantes crescidos. As

bactérias com produção de AHLs causaram o aparecimento de um halo fluorescente após incubação de 24 horas. Os mutantes que não apresentavam o halo foram selecionados.

3.13 Caracterização dos mutantes quanto ao gene mutado – *southern blot*

Os mutantes para formação de biofilme e para produção de AHLs, foram submetidos a uma análise de *southern blot* (SAMBROOK et al., 1989) para a confirmação do número de transposons inseridos no genoma de cada um.

O DNA dos mutantes foi extraído e digerido com as enzimas *EcoRI* ou *SmaI*, (Fermentas, Vilnius, Lithuania) por 12 horas à 37° C. Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose a 0,8 % a 5 V.cm⁻¹. O tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotodocumentado. O gel contendo o DNA foi lavado com solução ácida (HCl 0,25 M) por 10 minutos para depuração, seguida de solução básica (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 30 minutos para desnaturação e com duas lavagens de 15 minutos cada com solução de neutralização pH 7,5 (NaCl 1,5 M; Tris HCl 0,5 M; EDTA 1 mM), todas intercaladas com enxágues em água MilliQ autoclavada.

Após lavagem, o DNA foi transferido do gel para a membrana de nylon *Hybond-N+* (Amersham Biosciences) segundo Sambrook et al. (1989) O DNA foi fixado à membrana por aquecimento a 80° C por duas horas. O transposon mini-TN5 (REEVES et al., 1999) foi isolado do plasmídeo, com uma digestão com *NotI* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) por 12 horas a 37° C, marcado radioativamente e utilizado como sonda. Todos os passos da hibridização foram realizados no forno de hibridização Hybridiser HB-2D (Techne). Após a hibridação a membrana foi lavada com tampão SSC (20X: NaCl, 3 M; citrato de sódio, 0,3 M; água MilliQ, 500 ml; pH 7) e documentada por autoradiografia.

3.14. Avaliação da colonização de plantas de *Catharanthus roseus* por mutantes de *Methylobacterium extorquens*.

Plantas de *C. roseus* foram germinadas em casa de vegetação e *M. extorquens* AR1.6/2 e seus mutantes para a produção de biofilme, P3A8, P8A4, P19D12 e P50G10, foram inoculadas via raiz segundo Andreote et al. (2006).

Depois de 15, 25, 35 e 45 dias da inoculação das bactérias foi realizado um isolamento, utilizando-se o meio de cultura CHOI 3 com adição de canamicina para recuperação dos mutantes. Os resultados estão expressos em UFC/grama (UFC/g) de tecido vegetal fresco.

3.15 Microscopia para localização de *Methylobacterium* sp. em *Catharanthus roseus*

Foram utilizadas duas técnicas para a localização de *Methylobacterium* sp. em *C. roseus*, planta modelo para o estudo de *X. fastidiosa* e bactérias endofíticas (ANDREOTE et al., 2006).

M. mesophilicum isolado SR1.6/6, expressando a GFP, foi inoculada em plantas axênicas via raiz segundo Andreote et al. (2006) e após 45 dias da inoculação, as plantas foram cortadas e imediatamente avaliadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot II), sob luz UV.

M. extorquens (AR1.6/2), foi inoculada em plantas como descrito acima, porém as observações foram feitas com a fixação do material em paraformaldeído seguida de corte em micrótomo e coloração das lâminas com azul de toluidina 5%. As imagens foram capturadas em microscopia de luz (TIMMERS et al., 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de bactérias associadas à cabeça de cigarrinhas

Trinta indivíduos de cada espécie de cigarrinha (*O. facialis*, *A. citrina* e *D. costalimai*) foram utilizados para os experimentos de isolamento bacteriano. Os grupos bacterianos cultiváveis obtidos no isolamento foram classificados inicialmente de acordo com as características morfológicas. No total foram obtidos 17230 isolados, sendo 14414 proveniente de *O. facialis* (média de 480,46 UFC/cabeça), 1821 de *A. citrina* (60,7 UFC/cabeça) e 995 de *D. costalimai* (33,16 UFC/cabeça).

Os grupos morfológicos encontrados entre os isolados de bactérias da cabeça de cigarrinhas foram: G1) actinomicetos, G2) colônias rosa escuras (*Curtobacterium* sp.), G3) colônias rosa claras (*Methylobacterium* sp.), G4) colônias amarelas (*Sphingomonas* sp.), G5) colônias brancas (*Bacillus* sp.), G6) colônias alaranjadas (*Curtobacterium* sp.), G7) colônias brancas de crescimento difuso (*Bacillus* sp.), G8) colônias amarelas de crescimento difuso (*Sphingomonas* sp.), G9) colônias transparentes (*Microbacterium* sp.). As espécies entre parênteses são o resultado do seqüenciamento 16 S rDNA de um dos representantes dos grupos. As concentrações em Unidades formadoras de Colônia por cabeça de cigarrinha (UFC/cabeça) do isolamento de cada grupo bacteriano em cada espécie de cigarrinha estão apresentados a seguir na Figura 1.

A espécie *O. facialis* apresentou uma maior concentração de bactérias associadas à sua cabeça (480,46 UFC/cabeça) quando comparadas com as outras duas espécies. Isto pode ocorrer devido ao seu hábito alimentar polifágico, ou seja, esta espécie tem uma maior diversidade de plantas hospedeiras, o que pode ter levado a uma maior diversidade de espécies bacterianas com as quais estes insetos tiveram contato e conseqüentemente um maior número de bactérias são capazes de se estabelecer nesta espécie.

Figura 1- Número médio de Unidades Formadoras de Colônia por cabeça de cigarrinha (log UFC/cabeça). G1) actinomicetos, G2) colônias rosa escuras, G3) colônias rosa claras, G4) colônias amarelas, G5) colônias brancas, G6) colônias alaranjadas, G7) colônias brancas de crescimento difuso, G8) colônias amarelas de crescimento difuso, G9) colônias transparentes. Resultado total dos três experimentos de isolamento

Figura 2- Número médio de Unidades Formadoras de Colônia por cabeça de *O. facialis* (log UFC/cabeça). G1) actinomicetos, G2) colônias rosa escuras, G3) colônias rosa claras, G4) colônias amarelas, G5) colônias brancas, G6) colônias alaranjadas, G7) colônias brancas de crescimento difuso, G8) colônias amarelas de crescimento difuso, G9) colônias transparentes. Resultado dos três experimentos de isolamento

Figura 3- Número médio de Unidades Formadoras de Colônia por cabeça de *A. citrina* (log UFC/cabeça). G1) actinomicetos, G2) colônias rosa escuras, G3) colônias rosa claras, G4) colônias amarelas, G5) colônias brancas, G6) colônias alaranjadas, G7) colônias brancas de crescimento difuso, G8) colônias amarelas de crescimento difuso, G9) colônias transparentes. Resultado dos três experimentos de isolamento

Figura 4- Número médio de Unidades Formadoras de Colônia por cabeça de *D. costalimai* (log UFC/cabeça). G1) actinomicetos, G2) colônias rosa escuras, G3) colônias rosa claras, G4) colônias amarelas, G5) colônias brancas, G6) colônias alaranjadas, G7) colônias brancas de crescimento difuso, G8) colônias amarelas de crescimento difuso, G9) colônias transparentes. Resultado dos três experimentos de isolamento

Quanto à presença relativa de bactérias pertencentes aos diferentes grupos morfológicos encontrados, o Grupo 2 (colônias rosa escuras, representadas por *Curtobacterium* sp.) foi o encontrado com maior frequência em *O. facialis* e em *A. citrina*, enquanto em *D. costalimai* o Grupo 7 (colônias brancas e de crescimento difuso, *Bacillus* sp.) foi o mais frequentemente isolado. Este grupo foi ainda o único isolado com uma frequência constante de todas as espécies.

Os Grupos 1 (actinomicetos) e 8 (bactérias amarelas e de crescimento difuso) não foram isolados de *A. citrina*. *D. costalimai* apresentou todos os grupos morfológicos, porém em menor número quando comparados com *O. facialis*.

Avaliando-se os isolamentos de cada espécie separadamente, nas três diferentes datas quando foram realizados os isolamentos (Figuras 2, 3 e 4), pode-se observar uma tendência de mudança na comunidade bacteriana associada à cabeça das cigarrinhas. Alguns grupos praticamente desaparecem no último isolamento, como Grupos 6 e 8, que não foram isolados de *O. facialis* (Figura 2), apenas 4 grupos foram isolados de *A. citrina* (Figura 3) e apenas dois grupos permaneceram colonizando *D. costalimai* (Grupos 1 e 7) (Figura 4). Além da especificidade de grupos dependendo da época avaliada, como por exemplo, o Grupo 7 que aparece em alta frequência no isolamento do mês de março e praticamente desaparece nos isolamentos seguintes, para as três espécies de cigarrinhas avaliadas.

Em geral a quantidade de isolados totais decresce de março a junho (Tabela 3), o que pode ser reflexo da diminuição da temperatura e da precipitação no período avaliado (março à junho de 2002), que alteram a atividade dos insetos no campo. Segundo Laranjeira et al. (1998), a CVC apresenta uma maior disseminação durante a primavera e verão, e sabe-se também que a flutuação populacional das cigarrinhas é influenciada por fatores climáticos (ROBERTO; YAMAMOTO, 1998) e a população cresce no início do verão e no outono, declinando no inverno e na primavera (GARCIA JÚNIOR et al., 1997). Além disso, a condição das plantas no campo, dependendo da época do ano, pode ser determinante para a escolha das plantas hospedeiras, já que os insetos podem habitar plantas adjacentes (HEWITT; FRAZIER; FREITAG; 1949 HUANG; SHERALD, 2004) aos pomares de citros. Além de haver plantas que podem servir hospedeiro alternativo para de *X. fastidiosa* (RODRIGUES et al., 2003) e que

apresentam uma comunidade bacteriana endofítica diferente de citros. Com tantos fatores influenciando o comportamento dos insetos em campo e das bactérias nas plantas, espera-se uma tendência de alteração da comunidade bacteriana associada aos insetos. Porém aquelas bactérias, que permanecem durante todo o período nos insetos, podem apresentar alguma adaptação específica que as permitam continuar aderidas ao inseto, multiplicando-se dentro dele (HILL; PURCELL, 1995).

Tabela 3- Médias climatológicas para o estado de São Paulo de 1916 a 1990

1961 a 1990	Temperatura média (°C)	Precipitação média (mm)
Março	25	160
Maio	20	80
Junho	15	60

Adaptado de <http://www.inmet.gov.br/html/clima/>

4.2 ARDRA e seqüenciamento para identificação de isolados bacterianos

Após o isolamento e a amplificação do fragmento de 16S r DNA dos isolados bacterianos, foi realizada uma digestão enzimática dos fragmentos que foram analisados em gel de agarose.

Os 120 isolados representantes dos principais haplótipos, foram escolhidos para a análise e foram separados em 16 haplótipos diferentes (Figura 5). Os representantes dos principais haplótipos foram identificados por seqüenciamento do fragmento de 16S rDNA (Tabela 4).

Os haplótipos encontrados a partir da análise por ARDRA e apresentados na Tabela 3 foram consistentes e cada haplótipo praticamente representa um gênero bacteriano. Sendo H1 (*Curtobacterium*), H3 (*Methylobacterium*), H4 (*Brevibacillus*), H6 (*Brevundimonas*), H7 (*Nocardia* sp.), H8 (*Shingomonas* sp.), H9 (*Bacillus firmus*), H10 (*Brachybacterium* sp), H11 (*Rhodococcus*), H12 (*Pseudoclavibacter*) e H13 (*Paenibacillus*). Os haplótipos H2 e H5 apresentaram mais de um gênero (H2, *Curtobacterium* e *Microbacterium*, H5, *Nostocoida* e *Bacillus*)

Tabela 4- Haplótipos encontrados entre os isolados bacterianos de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa*

Haplótipo	Inseto	Isolado	Resultado do Blast
H1	<i>O. facialis</i>	CG66	<i>Curtobacterium</i> sp. AY688361.1 (96%),
H1	<i>O. facialis</i>	CG67	<i>C. flaccumfaciens</i> (98%) AY167859
H1	<i>O. facialis</i>	CG69	<i>C.luteum</i> CL16SR (100%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG74	<i>C. flaccumfaciens</i> AY273210 (99%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG34	<i>C. flaccumfaciens</i> AY167859 (98%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG49	<i>Curtobacterium</i> sp. AB046364 (100%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG75	<i>C. flaccumfaciens</i> AY167859 (99%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG37	<i>C. flaccumfaciens</i> AY273210 (88%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG38	<i>Curtobacterium</i> sp. AY828578 (99%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG79	<i>Curtobacterium</i> sp. AY828578 (100%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG80	<i>C. flaccumfaciens</i> AY273210 (99%)
H1	<i>A. citrine</i>	CG52	<i>C. flaccumfaciens</i> AY167859 (99%),
H1	<i>O. facialis</i>	CG41	<i>C. flaccumfaciens</i> AY273210 (99%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG55	<i>Curtobacterium</i> sp. AB046364.1 97%),
H1	<i>O. facialis</i>	CG42	<i>C.luteum</i> CL16SR (99%)
H1	<i>O. facialis</i>	CG83	<i>Curtobacterium</i> sp. AY278888 (100%)
H1	<i>A. citrine</i>	CG43	<i>C.luteum</i> CL16SR (99%)
H1	<i>A. citrine</i>	CG63	<i>C. flaccumfaciens</i> AY273210 (99%)
H1	<i>A. citrine</i>	CG85	<i>C. albidum</i> AB046363 (99%)
H2	<i>O. facialis</i>	CG70	<i>C.luteum</i> CL16SR (100%)
H2	<i>O. facialis</i>	CG33	<i>C. flaccumfaciens</i> AY167859 (99%)
H2	<i>A. citrine</i>	CG57	<i>Microbacterium arborescens</i> MA16SR (99%)
H3	<i>O. facialis</i>	CG32	<i>Sphingomonas</i> sp(90%) DQ337553
H3	<i>O. facialis</i>	CG68	<i>M. radiotolerans</i> AY616142 (99%)
H3	<i>O. facialis</i>	CG47	<i>Methylobacteriaceae bacterium</i> DQ195815 (98%)
H3	<i>O. facialis</i>	CG73	<i>Methylobacterium</i> sp. AB220099.1 100%
H3	<i>O. facialis</i>	CG35	<i>Methylobacterium</i> sp. AB220099 (100%)
H3	<i>O. facialis</i>	CG36	<i>Methylobacteriaceae bacterium</i> DQ195815 (98%)
H3	<i>O. facialis</i>	CG76	<i>Methylobacterium</i> sp. AB220099 (100%)
H3	<i>O. facialis</i>	CG77	<i>Methylobacterium</i> sp. AB220099 (100%)
H3	<i>O. facialis</i>	CG90	<i>M. radiotolerans</i> AY616142 (99%)
H4	<i>O. facialis</i>	CG91	<i>Brevibacillus brevis</i> AB271756 (99%)
H4	<i>O. facialis</i>	CG61	<i>B. brevis</i> AB271756 (99%)
H4	<i>A. citrine</i>	CG53	<i>Bacillus</i> sp. DQ275174 (99%)
H5	<i>D. costalimai</i>	CG40	<i>Nostocoida aromativora</i> AY682381 (95%)
H5	<i>A. citrine</i>	CG56	<i>B. megaterium</i> DQ447778 (99%)
H6	<i>A. citrine</i>	CG58	<i>Brevundimonas</i> sp DQ825663 (98%)
H7	<i>D. costalimai</i>	CG50	<i>Nocardia corynebacterioides</i> AY438619 (99%)
H8	<i>O. facialis</i>	CG48	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i> AY563441 (99%)
H8	<i>O. facialis</i>	CG44	<i>Sphingomonas</i> sp (90%) DQ337553.1
H9	<i>D. costalimai</i>	CG45	<i>Bacillus firmus</i> AB271750 (99%)
H9	<i>A. citrine</i>	CG46	<i>B. firmus</i> AB271750 (100%)
H10	<i>A. citrine</i>	CG87	<i>Brachybacterium conglomeratum</i> DQ223674 (98%)
H10	<i>A. citrine</i>	CG86	<i>Brachybacterium</i> sp. DQ822566 (99%)
H11	<i>A. citrine</i>	CG62	<i>Staphylococcus</i> sp DQ113448 (99%)
H11	<i>D. costalimai</i>	CG51	<i>Rhodococcus fascians</i> AY771765 (97%)
H12	<i>A. citrine</i>	CG59	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> BH16SR (98%)
H13	<i>D. costalimai</i>	CG81	<i>Paenibacillus</i> sp. AF395029 (99%)

Figura 5- Número de isolados de cada um dos 16 haplótipos encontrados com o análise de ARDRA com a enzima *ALU I* de 120 isolados bacterianos de cabeça de cigarrinhas. Haplótipos estão separados por espécie de cigarrinha, e aqueles que tiveram um de seus representantes identificado, estão indicados

Dos haplótipos encontrados, alguns são pertencentes a apenas uma das espécies de cigarrinhas como por exemplo H8 (representado por *Sphingomonas*) e H15 que são exclusivos de *O. facialis*; H10 (*Brachyбактерium*), H12 (*Pseudoclavibacter*). H14 e H16 são exclusivos de *A. citrina* e H15 de *D. costalimai* (Figura 2). Além disso, alguns haplótipos foram encontrados nas três espécies de cigarrinhas, como: H4 (*Bacillus*), H5 (*Nostocoida* e *Bacillus*) e H11 (*Rhodococcus*), H6 (*Brevundimonas*) e H7 (*Nocardia*).

Considerando-se os dados de isolamento e ARDRA, observam-se duas tendências em relação à associação de bactérias e insetos. A primeira é a especificidade de alguns haplótipos pelo inseto vetor, o que pode ser o resultado do desenvolvimento de adaptações pelas bactérias para sobreviver neste habitat. Além disso, também pode indicar a presença desta bactéria no inseto com o intuito de promover uma simbiose para o fornecimento de aminoácidos, produzidos pelas

bactérias, para os insetos, como ocorre para os endossimbiontes (WU et al., 2006, MORAN et al, 2003) que um dia estiveram apenas associados aos insetos e co-evoluíram com estes.

Por outro lado algumas bactérias podem ser isoladas de insetos dependendo da época do ano, o que pode ser resultado da complexa interação entre insetos, plantas hospedeiras, bactérias endofíticas e clima. Cada inseto apresenta uma comunidade bacteriana associada que se altera. Esta alteração pode ser resultado do comportamento destes insetos e de suas populações juntamente como a condição das plantas hospedeiras, tanto as plantas de citros, quanto as plantas adjacentes.

Observando-se os resultados da Tabela 3 e da Figura 5 pode-se observar ainda, que *Curtobacterium* (H1) foi o gênero bacteriano mais frequentemente isolado a partir de cabeças de cigarrinhas das espécies *O. facialis* e *A. citrina* (Haplótipo 1, Figura 5). No entanto *D. costalimai* tem como principal haplótipo H11 (*Rhodococcus*)

Um estudo com isolamento de bactérias endofíticas de citros mostrou que *Curtobacterium* sp. pode ter um importante papel no desenvolvimento da CVC no sentido de controlar o aparecimento de sintomas nas plantas infectada. Essas bactérias foram isoladas com maior frequência em plantas de citros assintomáticas em relação a CVC (ARAÚJO et al., 2001; LACAVA et al. 2004). Lacava et al. (2005) observaram que plantas co-inoculadas com *C. flaccumfaciens* e *X. fastidiosa* apresentaram sintomas de CVC menos severos quando comparadas com plantas inoculadas somente com *X. fastidiosa*.

A presença do gênero bacteriano *Curtobacterium*, como um endófito de citros (ARAÚJO et al. 2001; LACAVA et al. 2004) em cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* pode ser um das razões pela qual a eficiência de transmissão da CVC para plantas de cítricas é mais baixa (5 à 10%) quando comparada com a eficiência de transmissão encontrada em cigarrinhas transmissoras de Mal de Pierce (45%) (KRUGNER et al., 2000; REDAK et al., 2004). *D. costalimai*, uma das espécies da qual não foram isoladas bactérias do haplótipo 1 apresenta maior taxa de transmissão de *X. fastidiosa* em citros (5%) (REDAK, et al., 2004), o que pode ser um indicador de que *Curtobacterium* sp. teria um papel importante na transmissão de *X. fastidiosa*, já que a bactéria endofítica poderia influenciar a adesão do patógeno ou sua multiplicação no inseto.

Methylobacterium foi um dos principais gêneros bacterianos no estudo de microrganismos endofíticos de citros. Foi encontrado principalmente colonizando plantas afetadas por CVC (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004) e apresentou a capacidade de interagir com *X. fastidiosa* *in vitro* e *in planta* (LACAVA et al., 2004; LACAVA et al., 2006a). Os insetos foram coletados em pomares afetados por CVC, portanto era esperado encontrar-se nas cigarrinhas bactérias do gênero *Methylobacterium*. A espécie representa o haplótipo 3, a qual foi isolada de *O. facialis* e de *A. citrina*.

Considerando-se os dados relativos à cigarrinha *D. costalimai*, os grupos G2 (*Curtobacterium* sp.) e G3 (*Methylobacterium* sp.) foram encontrados, no entanto nenhum dos isolados avaliados por ARDRA pertencentes a este inseto e a estes grupos foi classificado como sendo parte de H1 e H3 (*Curtobacterium* sp, e *Methylobacterium* sp, respectivamente). Provavelmente houve um erro na classificação morfológica das colônias bacterianas durante o isolamento, ou a baixa concentração das bactérias nos insetos fez com que durante a amostragem elas não tenham sido escolhidas para as análises.

A diversidade das bactérias associadas às cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* foi grande. Utilizando-se apenas uma enzima de restrição os isolados foram classificados em 16 haplótipos diferentes. Pode-se observar também a presença de haplótipos específicos para cada espécie de cigarrinha, indicando a existência de possíveis mecanismos de especialização da interação inseto–bactéria ou do desenvolvimento de adaptações especiais para a possível colonização de insetos como inicialmente proposto por Hill e Purcell (1995).

4.3 PCR específico para detecção de isolados endofíticos de citros

Foram analisados por PCR específico 10 indivíduos de cada espécie de cigarrinha em cada um dos três isolamentos, totalizando 90 insetos. Destes, 51,7% das cigarrinhas da espécie *O. facialis* apresentaram um resultado positivo para a presença da bactéria endofítica de citros *M. mesophilicum*, 8,7% das *D. costalimai* e 20% das *A. citrina*.

Para *C. flaccumfaciens*, 89,6% das *O. facialis*, 39,1% das *D. costalimai* e 70% das *A. citrina* apresentaram um resultado positivo para a presença deste endófito de citros (Figura 6).

Os resultados positivos para a PCR, indicam que bactérias endofíticas de citros podem ser encontradas colonizando as cigarrinhas que tem estas plantas como hospedeiro. Os endófitos são provavelmente adquiridos pelos insetos durante a alimentação, da mesma maneira que eles adquirem *X. fastidiosa*. Resultados positivos, que indicam a presença de *C. flaccumfaciens*, foram mais freqüentes do que os resultados positivos para *M. mesophilicum*, o que está de acordo com os resultados obtidos no isolamentos. Ambos sugerem que a concentração de *C. flaccumfaciens* em insetos transmissores de *X. fastidiosa* em citros é alta, enquanto que o endófito *M. mesophilicum* está também presente, mas numa concentração menor.

Além disso, um menor número de resultados positivos para a PCR foi encontrado para *D. costalimai*. Isto era esperado já que, observando-se os resultados obtidos no ARDRA (Figura 5) nenhuma das espécies bacterianas foi isolada desta cigarrinha. O que pode explicar o aparecimento de resultados positivos nas reações de PCR é a maior sensibilidade da técnica de PCR quando comparada com isolamento.

Figura 6- Porcentagem de insetos com resultados positivos para a detecção dos isolados endofíticos de citros, *M. mesophilicum* e *C. flaccumfaciens*

Analisando-se os resultados comparativamente com os dados da literatura, a taxa de transmissão de *X. fastidiosa* por *O. facialis* é de 1%, *A. citrina* de 2% e *D. costalimai* de 5% (KRUGNER et al., 2000). Quando são observados os resultados obtidos para a presença de *C. flaccumfaciens*, verificou-se uma tendência contrária a taxa de transmissão, ou seja, quanto menor a taxa de transmissão do inseto, maior a concentração de *C. flaccumfaciens*.

Os trabalhos de Araújo et al. (2001) e Lacava et al (2004), sugerem que *C. flaccumfaciens* pode estar interagindo com *X. fastidiosa*, pois esse endófito de citros foi isolado em maior frequência em plantas assintomáticas em relação a CVC. Lacava et al. (2004), em um experimento de interação *in vitro*, sugerem que o crescimento de *X. fastidiosa* é afetado negativamente por *C. flaccumfaciens*. Lacava et al. (2005) sugerem também que a co-inoculação de *C. flaccumfaciens* e *X. fastidiosa* pode reduzir a expressão dos sintomas da CVC. Os dados obtidos no presente trabalho concordam com os resultados citados acima, sugerindo que em função de *C. flaccumfaciens* ser isolada em maior frequência de cigarrinhas com menor taxa de transmissão do patógeno, esse endófito pode também estar desempenhando um papel semelhante na redução da transmissão de *X. fastidiosa* pelo inseto vetor.

4.4 DGGE

Os géis de DGGE mostraram uma considerável variação entre as espécies dentro de uma mesma coleta (Figura 7a, 7b e 7c), também entre as diferentes coletas a relação entre as espécies foi baixa, como pode ser visto nas análises apresentadas na Figura 7d. Isso também pode ser visto nas Figuras 2, 3 e 4 que apresentam os diferentes grupos de bactérias encontrados em diferentes coletas. Um exemplo pode ser visualizado na Figura 3, onde entre a coleta do dia 05/maio e a coleta do dia 14/junho, para a espécie *A. citrina*, apenas o Grupo 4 foi isolado nas três coletas, o resto da população foi completamente alterada. O mesmo pode ser observado para as outras duas espécies de cigarrinhas. Portanto os resultados de não correlação entre as espécies de cigarrinhas e as diferentes datas de coletas encontrados pela análise dos géis de DGGE não foram discrepantes.

Quando comparam-se as três coletas ao mesmo tempo observa-se uma tendência de alteração da comunidade bacteriana associada aos insetos, já que os padrões de banda apresentados no DGGE, e que representam a comunidade bacteriana, nos dia 22/março estão mais próximos aos padrões para o dia 05/maio do que do a 14/junho. Isso mostra que a alteração da comunidade se deu de maneira gradual e provavelmente devido à alterações climáticas e comportamentais dos insetos (REDAK et al, 2004).

Figura 7a- Alinhamento das bandas de DGGE dos isolados do dia 22 de março

Figura 7b- Alinhamento das bandas de DGGE dos isolados do dia 05 de maio

Figura 7c- Alinhamento das bandas de DGGE dos isolados do dia 14 de junho

Figura 7d- Alinhamento das bandas de DGGE de todos os isolamentos

Além das espécies presentes no marcador dos géis deste estudo (*X. fastidiosa*, *C. flaccumfaciens*, *M. mesophilicum* e *M. extorquens*) podem ser observadas outras bandas que correspondem a diferentes bactérias presentes nas cabeças das cigarrinhas das espécies avaliadas. Estas bandas podem ser representantes de bactérias cultiváveis como *Curtobacterium* sp., e que já foram observadas durante as análises por isolamento, ARDRA e PCR específicos, assim como bactérias não cultiváveis, endossimbiontes (*B. cicadelinicola*.) que só podem ser detectadas graças à técnicas moleculares como o DGGE (AMANN et al., 1995; HEAD, 1998; RANJARD et al., 2000).

As seqüências das bandas cortadas dos géis de DGGE, reamplificadas e seqüenciadas estão na Tabela 5. Como pode ser observado, muitas das bandas não puderam ser identificadas e apresentaram similaridade com bactérias não cultiváveis, como era de se esperar numa análise de DGGE.

O que se pode concluir das análises a partir dos géis de DGGE é que a comunidade varia com o tempo, o que pode ser em função do clima, sendo este fator um dos principais elementos na epidemiologia de doenças causadas por *X. fastidiosa* (REDAK et al. 2006). As coletas foram feitas em três datas diferentes, 22/março, 05/maio e 14/junho. Da primeira para a última coleta ocorreu um decréscimo da temperatura e da disponibilidade de água, como mostra a Tabela 4.

Na Figura 8, algumas bandas identificadas estão indicadas, e também podemos observar a ocorrência de bandas na mesma posição das bandas controle, no entanto os experimentos de seqüenciamento de certas bandas ficou comprometido provavelmente pelo fato de existir em cada banda mais de uma espécie representada, ou seja, em uma única banda encontramos diferentes seqüências, o que atrapalharia a reação de sequenciamento (HEUER; SMALLA, 1999). Mais experimentos devem ser feitos para elucidar se as bandas nas posições dos marcadores são mesmo representantes destas bactérias.

Tabela 5- Bandas de DGGE cortadas e seqüenciadas. Resultados das identificações por Blast

Inseto	Código da banda	Resultado do BLAST
<i>A. citrina</i>	Mar 1a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AY486371 (88%)
<i>O. facialis</i>	Mar 1c	Uncultured bacterium (91%)
<i>D. costalimai</i>	Mar 2b	<i>Bacillus</i> sp. AY763118 (94%)
<i>D. costalimai</i>	Mar 3b	Uncultured soil bacterium (89%)
<i>A. citrina</i>	Mar 4a	<i>Pantoea</i> sp. AY884345 (95%)
<i>D. costalimai</i>	Mar 4b	<i>Bacillus</i> sp. AY763118 (96%)
<i>O. facialis</i>	Mar 4c	<i>Stigonema ocellatum</i> AJ544082 (93%)
<i>D. costalimai</i>	Mar 5b	<i>Stenotrophomonas</i> sp. DQ989233 (95%)
<i>O. facialis</i>	Mar 5c	<i>Stenotrophomonas</i> sp. DQ989233 (96%)
<i>A. citrina</i>	Mar 6a	<i>Curtobacterium</i> sp. AY828578 (98%)
<i>D. costalimai</i>	Mar 6b	<i>Legionella yabuuchiae</i> AB233212 (96%)
<i>O. facialis</i>	Mar 6c	<i>Acinetobacter</i> sp. DQ988936 (100%)
<i>A. citrina</i>	Mar 7	Uncultured bacterium clone (84%)
<i>A. citrina</i>	Mar 7a	Uncultured bacterium (82%)
<i>D. costalimai</i>	Mar 7b	<i>Propionibacterium</i> sp DQ857748 (93%)
<i>O. facialis</i>	Mar 7c	<i>Kineococcus radiotolerans</i> AF247813 (92%)
<i>D. costalimai</i>	Mar 12	<i>Baumannia cicadellinicola</i> AF489427 (100%)
<i>D. costalimai</i>	Mar 13a	Uncultured bacterium clone (92%)
<i>D. costalimai</i>	Mar 13b	Uncultured bacterium clone (98%)
<i>A. citrina</i>	Maio 1	Uncultured bacterium clone (86%)
<i>D. costalimai</i>	Maio 2	Uncultured bacterium clone (88%)
<i>O. facialis</i>	Maio 3	Uncultured phototrophic eukaryote (90%)
<i>A. citrina</i>	Maio 4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AY486371 (86%)
<i>D. costalimai</i>	Maio 5	<i>Enterobacter sakazakii</i> AY803186 (94%)
<i>O. facialis</i>	Maio 6	<i>Pseudomonas</i> sp. AY484469 (95%)
<i>A. citrina</i>	Maio 7	<i>Pseudomonas</i> sp. AY484469 (91%)
<i>D. costalimai</i>	Maio 8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AY486371 (93%)
<i>O. facialis</i>	Maio 9	<i>Pseudomonas</i> sp. (90%)
<i>A. citrina</i>	Maio 10	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp (89%)
<i>D. costalimai</i>	Maio 11	<i>Pseudomonas</i> sp. AY484469 (90%)
<i>O. facialis</i>	Maio 13	Uncultured eubacterium partial 16S rRNA gene (93%)
<i>A. citrina</i>	Jun 1a	<i>Bacillus</i> sp. AY753654 (91%)
<i>O. facialis</i>	Jun 1c	<i>Citrobacter</i> sp. DQ279749 (95%)
<i>A. citrina</i>	Jun 2a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AY486371 (79%)
<i>O. facialis</i>	Jun 2c	<i>Citrobacter</i> sp. DQ279749 (88%)
<i>O. facialis</i>	Jun 3c	Uncultured bacterium (77%)
<i>A. citrina</i>	Jun 4a	<i>Citrobacter</i> sp. DQ279749 (99%)
<i>D. costalimai</i>	Jun 6b	Gamma proteobacterium (80%)
<i>A. citrina</i>	Jun 7a	<i>Phyllobacterium</i> sp. AY968699 (98%)
<i>O. facialis</i>	Jun 7c	<i>Pseudomonas</i> sp. AM402949 (96%)

Figura 8- Gel de DGGE de cabeças de cigarrinhas transmissoras de *X. fastidiosa* M) Marcadores C) *C. flaccumfasciens*, X) *X. fastidiosa*, Mm) *M. mesophilicum* e Me) *M. extorquens*. A) *A. citrina* D) *D. costalimai* O) *O. facialis*. Algumas das bandas identificadas estão indicadas. Coleta do dia 22 de março

4.5. Análise de seqüências

Foi realizada uma análise conjunta, utilizando-se o software Mega 3.1 (KUMAR et al, 2004) de todas as seqüências obtidas neste estudo, sendo elas, a) seqüências de 16 S rDNA de bactérias isoladas da cabeça de insetos e que representam um dos haplótipos obtidos pelas análises de ARDRA (Tabela 3), b) seqüências de 16 S rDNA obtidas a partir de bandas de DGGE que foram extraídas do gel, reamplificadas e seqüenciadas (Tabela 4) e c) seqüências de isolados endofíticos de citros obtidos por Araújo et al. (2001). Além de seqüências do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Figura 9- Resultado da
comparação entre
seqüências de
bactérias
associadas às
cigarrinhas e citros

Na Figura 9 podemos observar as seqüências dos isolados, indicadas pelas iniciais CG (tabela 3), as seqüências das bandas de DGGE que estão indicadas segundo a Tabela 5, as seqüências de isolados de citros (ARAÚJO, 2000) SR 3/27 e WL4 SR 1.6/2 (*Methylobacterium* sp.) e ER 1/6 (*Curtobacterium* sp.) e seqüências pertencentes ao banco de dados do NCBI. Observa-se um alinhamento das seqüências provenientes dos diferentes experimentos, quando as identificações foram semelhantes durante as análises de BLAST.

A alta variabilidade dos isolados de cigarrinha e também a maior diversidade pode ser alcançada quando utiliza-se diferentes métodos de análise de uma comunidade, como pode ser visto nos experimentos de DGGE e isolamento apresentados.

4.6 Aquisição e transmissão de *Methylobacterium mesophilicum* por *Bucephalogonia xanthophis*.

Depois de se alimentarem com a bactéria endofítica *M. mesophilicum* contendo o gene da GFP, algumas cigarrinhas foram submetidas ao isolamento para a confirmação da aquisição da bactéria pelos insetos. De todas as cigarrinhas avaliadas foi possível isolar bactérias fluorescentes.

Após o período de transmissão da bactéria para a planta todos os insetos foram avaliados por isolamento e os resultados foram sempre positivos, mostrando que mesmo após 24 horas se alimentando em plantas, as bactérias continuaram a colonizar o inseto. Na figura 10 é possível observar bactérias isoladas de cigarrinhas, uma foto de placas dos isolamentos sob luz UV, nas quais observam-se bactérias fluorescentes isoladas de insetos logo após sua aquisição em membrana (A), e também após a alimentação em planta (B).

Figura 10- Placas do isolamento de bactérias de cigarrinhas bactérias fluorescentes isoladas de insetos logo após sua aquisição em membrana (A), e também após a alimentação em planta (B)

Depois do período de 30 dias as plantas foram submetidas ao isolamento. Dentre as plantas analisadas nem todas apresentaram a bactéria fluorescentes colonizando seus tecidos internamente, assim a taxa de transmissão da bactéria endofítica de citros, *M. mesophilicum*, pelo inseto foi de aproximadamente 13,3%. Este valor está próximo ao valor apresentado por *B. xanthophis* para a transmissão de *X. fastidiosa*, que é de 10% (REDAK et al., 2004), o que sugere que as duas bactérias poder estar sendo transmitidas pelo mesmo mecanismo pelos insetos. A bactéria endofítica provavelmente está sendo adquirida pelo inseto, está colonizando seu estomodeu, o que permitiria então a sua transmissão para plantas.

4.7 Caracterização da produção de biofilme e de moléculas *quorum sensing* por *Methylobacterium extorquens*

A produção de moléculas *quorum sensing* (AHLs) por *Methylobacterium* sp., foi primeiramente avaliada através de bioensaios utilizando-se as bactérias indicadoras, *P. putida* F117 (pKR-C12), *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pFC372) e *C. violaceum* CV026 (NEITO-PEÑALVER et al. 2006).

Constatou-se que os dois isolados avaliados, *M. extorquens* e *M. mesophilicum*, não produzem AHLs com cadeias carbônicas contendo 6 ou 8 carbonos (resultados negativos para os testes com *A. tumefaciens* e *C. violaceum*). Porém ambos isolados

produzem AHLs com cadeias maiores que 12 carbonos (resultados positivos nos testes com *P. putida*).

Extratos orgânicos dos dois isolados foram analisados segundo Nieto-Peñalver et al. (2006) e os resultados da concentração de AHLs de cadeia carbônica longa estão apresentados nas Figuras 11 e 12 .

Como pode ser visto na Figura 11, *M. mesophilicum* apresenta uma maior produção de moléculas *quorum sensing* do que *M. extorquens*. Entretanto em comparação com os resultados de Nieto-Peñalver et al. (2006), o isolado de *M. extorquens* proveniente de citros produz uma quantidade maior de AHLs de cadeia carbônica de 12 ou mais carbonos quando comparada com o isolado padrão de *M. extorquens* (AM1). Além disso, AM1 produz AHLs com cadeias carbônicas de 6 e 8 carbonos (NIETO-PEÑALVER et al., 2006).

Figura 11- Quantidade de AHLs (ng/litro de cultura) produzida por *Methylobacterium* sp. com diferentes cadeias carbônicas. Picos apresentam concentração da molécula em ng/litro de sebnadante de uma cultura da bactéria em meio CHOI 3 líquido

Depois das análises quantitativas para AHLs com cadeias carbônicas de tamanhos diferentes (LC-MS/MS) foram realizadas análises da presença de moléculas com insaturações, mas por falta de moléculas padrões, com as quais são construídas

curvas de concentração que servem de base para a interpolação e determinação da concentração destas moléculas na solução da bactéria, os valores determinados e apresentados correspondem à área do pico da molécula nos gráficos de espectrometria de massa (Figura 12).

Comparando-se os picos de espectrometria, pode-se observar em *Methylobacterium* sp. a produção preferencial de moléculas de AHLs com 14 carbonos e uma insaturação na sua cadeia.

Quanto a produção de biofilme pelos isolados de citros, comparando-se com *M. extorquens* AM1, pode-se observar na Figura 13 que os isolados de citros produzem uma quantidade maior de biofilme.

Figura 12- Quantidade relativa de moléculas de AHLs de cadeias longas apresentando uma ou duas insaturações na cadeia carbônica. Valores de Y representam a área dos picos nos gráficos das análises de LC/MS-MS

Figura 13- Produção de biofilme por *M. extorquens*, *M. mesophilicum* e *M. extorquens* AM1. Absorbância à 570 nm de uma solução de biofilme bacteriano corado com cristal violeta

De maneira geral os isolados de citros produzem uma maior quantidade de moléculas *quorum sensing* e de biofilme quando comparados com AM1.

No entanto, apesar de uma maior produção de AHLs por *M. mesophilicum*, *M. extorquens* produz uma maior quantidade de biofilme. Portanto a produção de biofilme por *Methylobacterium* sp. pode ser dependente da produção de AHLs, como mostra a literatura, (DAVIES et al., 1998, NIETO-PEÑALVER et al., 2006), porém aparentemente a maior produção de AHLs não necessariamente leva a uma maior produção de biofilme.

4.8 Obtenção e caracterização de mutantes de *Methylobacterium extorquens* negativos para formação de biofilme e para produção de moléculas *quorum sensing*

Foi montada uma biblioteca de 500 mutantes de *M. extorquens* a partir da inserção aleatória do transposon mini-TN5 no genoma. Destes, 28 foram caracterizados como defectivos para a produção de biofilme e 32 foram selecionados como sendo

defectivos para a produção de moléculas de AHLs (Tabela 6). Porém os mutantes para biofilme apresentavam diferenças morfológicas como pode ser observado na Figura 14.

Tabela 6- Lista de mutantes defectivos para a produção de biofilme e moléculas de *quorum sensing*

Mutantes para a formação de biofilme	Mutantes para a produção de AHLs
P3A8	P2F1
P8A4	P4C3
P8A6	P4E4
P8A9	P4G2
P8B5	P4B12
P8B8	P5A9
P8B9	P5H12
P12F9	P6F8
P12H2	P15A7
P18B7	P15A8
P19D12*	P15A9
P20C4	P15B10
P20E6	P15C8
P20E9	P15C11
P20F2	P15D12
P20G2	P16A12
P20H11	P16B12
P21D5	P16H6
P21E8	P19D12*
P22C8	P21F9
P22E7	P23D7
P22E8	P25B3
P36E2	P27H7
P36F8	P31F11
P40H12	P38A3
P48E10	P45A4
P45C3	P45B8
P50G10	P45D3
	P45F2
	P45F6
	P50E4
	P50E12

*Duplo mutante

Figura 14- Aspecto morfológico de alguns mutantes de *M. extorquens*. 1. *M. extorquens* AR 1.6/ 2 selvagem, 2. P3A8, 3. P50G10, 4. P19D12, 5. P8A4

Os mutantes produzidos e selecionados apresentam diferentes alterações na morfologia do biofilme como a formação de biofilme completamente inibida, a adesão do biofilme de diferentes maneiras nas paredes do tubo de ensaio e a formação de agregados. Comparando-se os mutantes com o isolado selvagem de *M. extorquens*, o mutante P3A8 apresentou uma formação de biofilme apenas na parte anaeróbica do meio líquido, contrariamente ao isolado selvagem que produz biofilme principalmente em condições aeróbicas. P50G10 não produz biofilme aderido ao vidro, porém ainda é capaz de produzir aglomerados de bactérias. P19D12 apresenta comportamento totalmente planctônico e P8A4 além do comportamento planctônico apresenta uma deficiência na produção do pigmento rosa. Além de outros mutantes que se apresentaram intermediários a estes fenótipos.

Os mutantes negativos para produção de biofilme foram caracterizados quanto a formação de biofilme *in vitro* utilizando-se a técnica descrita por O'toole et al. (2000) e na Figura 15 estão representadas as médias de absorbâncias dos mutantes e do isolado selvagem.

Figura 15- Quantificação da produção de biofilme por *M. extorquens*, isolado selvagem e dos mutantes defectivos para a produção de biofilme. Valores indicam a absorbância (570nm) de soluções de cristal violeta. Média de 3 repetições

Da mesma maneira que foram observadas diferenças na morfologia do biofilme dos mutantes, a quantificação destes também foi diferenciada para cada um deles. Isso indica que diferentes genes podem estar envolvidos na formação de biofilme por *M. extorquens*, cada um responsável por um aspecto ou por uma etapa de formação diferente. A identificação dos genes responsáveis pelos diferentes aspectos da formação de biofilme auxilia no entendimento do desenvolvimento desta característica que pode estar envolvida na patogenicidade de bactérias.

O fato mais relevante acontece com o mutante P19D12 que apresenta células exclusivamente planctônicas e não produz moléculas de AHLs. O que se apresenta como um forte indício de que, a formação de biofilme por bactérias pode ser dependente da comunicação entre elas através de moléculas de *quorum sensing* como já relatado anteriormente (DAVIES et al., 1998; LEITE et al., 2001; LAZDUNSKY; VENTRE; STURGIS, 2004; KJELLEBERG; MOLIN, 2002; PARSEK; GREENBERG, 2005).

4.9 Colonização de plantas de *Catharanthus roseus* por mutantes de *Methylobacterium extorquens*

Os mutantes de *M. extorquens* foram inoculados via raiz e reisolados de plantas. Os resultados dos reisolamento, feitos em quatro datas diferentes, para o acompanhamento da colonização das plantas pelos mutantes estão na Figura 16. Valores referentes a uma planta por mutante em cada isolamento.

Figura 16- Quantificação de bactérias colonizando plantas de *C. roseus* expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de tecido vegetal fresco

Observa-se que há uma tendência do aumento da concentração de bactérias na planta com o passar do tempo, o que é esperado até o ponto onde a população bacteriana se estabiliza dentro da planta e pára então de aumentar. Pela análise, o que se pode ver é que, aparentemente, o fato de não produzir biofilme fez com que as bactérias colonizassem as plantas mais rapidamente quando comparadas com a bactéria selvagem. Os mutantes alcançaram o ponto de equilíbrio da população dentro da planta com 35 dias, enquanto o isolado selvagem alcançou a mesma concentração no 45º dia.

Além disso, mutantes que apresentam apenas células planctônicas atingiram uma menor concentração final dentro da planta. O que mostra que o biofilme pode ser importante para o estabelecimento de um maior número de células dentro da planta, provavelmente por proporcionar um ambiente favorável à vida das bactérias. No entanto estes resultados são preliminares e os experimentos precisam ser refeitos com repetições para uma melhor avaliação e para uma conclusão mais precisa e confiável.

4.10 Caracterização dos mutantes quanto ao gene mutado - *southern blot*

Para estudos de caracterização dos genes envolvidos na produção de biofilme e moléculas de AHLs por *Methylobacterium* sp., foram escolhidos 20 mutantes, sendo 10 mutantes negativos para produção de biofilme, 9 para produção de AHLs e um mutante negativo pra as duas características.

Os mutantes foram submetidos a um *southern blot* com as enzimas *EcoRI* ou *SmaI*, e o transposon mini TN-5 marcado radiativamente, foi usado como sonda para a confirmação do número de inserções do transposon no genoma dos mutantes. Em todos os casos foi confirmada uma única inserção. Foi observado que para cada mutante negativo para a produção de biofilme há apenas uma banda (Figura 17).

Figura 17- *Southern blot* com 9 mutantes negativos para biofilme (1 a 9) e o mutante duplo (10) para produção de biofilme e de AHLs, utilizando-se a enzima *SmaI*. M) marcador 1) P3A8, 2) P8A4, 3) P8A6, 4) P8B5, 5) P8B8, 6) P8B9, 7) P12F9, 8) P12H2, 9) P18B7 10)P19D12

4.11. Microscopia para a localização de *Methylobacterium* sp. em plantas

M. mesophilicum (Figura 18) e *M. extorquens* (Figura 19) isoladas endofiticamente de citros foram inoculadas em plantas de *Catharanthus roseus* e ambas as espécies foram observadas colonizando vasos xilemáticos, o mesmo nicho ocupado por *X. fastidiosa*.

Figura 18- Microscopia de fluorescência de *M. mesophilicum* habitando vasos xilemáticos de *C. roseus*. A e B) barra de escala com 10 μ m C e D) barra de escala com 5 μ m

Figura 19-. Microscopia de luz de *M. extorquens* habitando vasos xilemáticos de *C. roseus*. Barra de escala com 5 μ m

As duas espécies colonizam os vasos de maneira aleatória, formando colônias e nem todos os vasos apresentam as bactérias. Isso indica que apesar das *Methylobacterium* sp. colonizarem o mesmo nicho de *X. fastidiosa* (MONTEIRO et al., 2001), em *C. roseus*, como as duas colonizam os vasos de maneira aleatória, pode não ocorrer uma interação física entre as elas. Apesar disso, produtos das bactérias como AHLs podem se difundir entre os vasos e influenciar o desenvolvimento da CVC.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A comunidade bacteriana associada á cigarrinhas transmissoras de *X. fastidiosa*, causadora da CVC, apresenta uma grande variabilidade de espécies que a compõem;
- Bactérias descritas como sendo endófitos de citros, como *Methylobacterium* sp. e *Curtobacterium* sp., fazem parte da comunidade bacteriana associada às cigarrinhas;
- A comunidade bacteriana associada às cigarrinhas varia de acordo com a espécie do inseto e também a época o ano em que são feitas as avaliações;
- *Curtobacterium* sp. pode ter um papel importante na transmissão de *X. fastidiosa* pelas cigarrinhas, como um possível agente de biocontrole, diminuindo da taxa de transmissão de *X. fastidiosa*;
- *M. mesophilicum* e *M. extorquens* habitam o mesmo nicho ocupado por *X. fastidiosa* dentro de plantas hospedeiras.
- O endófito de citros *M. mesophilicum* pode ser transmitido pela cigarrinha *B. xanthophis* o que indica que tanto patógenos quanto endófitos podem estar usando a mesma via de transmissão através dos insetos;

As *Methylobacterium* sp. apresentam uma alta produção de moléculas de *quorum sensing* e de biofilme. Estas características podem estar envolvidas com o desenvolvimento dos sintomas de CVC em plantas infectadas por *X. fastidiosa*, além de poder ser um auxiliar na adesão do patógeno no inseto e na transmissão deste para plantas sadias.

Para a confirmação desta hipótese a obtenção de mutantes de *M. extorquens* é um passo inicial importante. A avaliação do efeito da mutação na colonização de plantas e na interação com *X. fastidiosa*, além da identificação do gene mutado podem esclarecer alguns pontos no desenvolvimento da CVC e assim gerar informações para o estudo de um possível controle da doença.

REFERÊNCIAS

- ABANDA-NKPWATT, D.; MUSCH, M.; TSCHIERSCH, J.; BOETTNER, M.; SCHWAB, W. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, IN Press, october, 2006.
- ALLISON, D.G.; RUIZ, B.; SANJOSE, C.; JASPE, A.; GILBERT, P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 167, p. 179-84, 1998.
- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, p. 382–86, 2001.
- ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.H. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, p. 264-71, 2003.
- ALVES, E. Interaction of *Xylella fastidiosa* with different cultivars of *Nicotiana tabacum* : a comparison of colonization patterns. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.151, p. 500-506, 2003.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.
- AMORIM, L.; BERGAMIN, A.F.; PALAZZO, D.A.; BASSANEZI, R.B.; GODOY, C.V.; TORRES, G.A.M. Clorose Variegada dos Citros: uma escala diagramática para a avaliação da severidade da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 174-180, 1993.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.JR.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiol**, Ottawa, v. 52, p. 419-26. 2006.
- ARAÚJO, W.L. A comunidade bacteriana endofítica de Citros e sua interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC). 2000. 131 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J. KUKLINSKY-SOBRA, J.; LACAVA, P.T. **Isolamento de microrganismos endofíticos**: Manual. Piracicaba: CALQ, 86 p. 2002a

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS H.O.; AZEVEDO, J.L. 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.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI Jr, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 4906-4914. 2002b.

AYRES, A.J. **Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro**. Jaboticabal, 2000. 59p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista « Julio de Mesquita Filho ».

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-Meio Ambiente. 1998. cap.18, p. 445-461.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. Fungi, multifaceted microbes, Boca Raton, CRC Press, 2007, 321p.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. EJB: Electronic Journal of Biotechnology [online], Valparaíso, n.3, 15 April 2000. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4>>. Acesso em: 05 maio 2000.

BACON, C.W.; YATES, I.E.; HINTON, D.M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 109, p. 325-232, 2001.

BENSEN, R.J.; JOHAL, G.S.; CRANE, V.C.; TOSSBERG, J.T.; SCHNABLE, P.S.; MEELEY, R.B.; BRIGGS, S.P. Cloning and characterization of the maize An1 gene. **Plant Cell**, Dordrecht, v. 7, p. 75-84. 1995.

BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 980-988, 1998.

BLOEMBERG, G.V.; O'TOOLE, G.A.; LUGTENBERG, B.J.J.; KOLTER, R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 4543-4551, 1997.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 111-117, 1991.

BRIM, H.; HEUER, H.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; MERGEAY, M.; SMALLA, K. Characterization of bacterial community of a zinc-polluted soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 326-338, 1999.

BUGBEE, W.M.; COLE, D F.; NIELSEN, G. Microflora and invert sugar in juice from healthy tissue of sugarbeets. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 29, p. 780-781, 1975.

CAMILLI, A.; BASSLER, B.L. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. **Science**, Washington, v. 311, p. 1113-1116, 2006.

CANTONE, F.A.; VANDENBERG, J.D. Use of the green fluorescent protein for investigation of *Paecilomyces fumosoroseus* in insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, p. 193-197, 1999.

CARVALHO, M.L.V.; ROSSETTI, V.; POMPEU JUNIOR, J. Comportamento de variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) sobreenxertada em Natal/Cleópatra em presença de Clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 320, 1994.

CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y.C.; SHAW, P.D.; FARRAND, S.K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interaction** Saint Paul, v.11, p. 1119-1129, 1998.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, v. 263, p. 802-805. 1994.

CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chorois and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, New York, v. 27, p. 137-142, 1993.

CHANPRAME, S.; TODD, J.J.; WIDHOLM, J.M. Prevention of pink-pigmented methylotrophic bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) contamination of plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 222-225, 1996.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbiology Ecology**, New York, v. 41, p. 252-263, 2001.

CHEN, D.Q.; PURCELL, A.H. Occurrence and transmtion of facultative endosymbionts in aphids. **Current Microbiology**, New York, v. 34, p. 220-225, 1997.

CHILDS, J.F.L.; KOPP, L.E.; JOHNSON, R.E. A species of *Physoderma* present in citrus and related species. **Phytopathology**, Lancaster, v. 55, p. 681-687, 1965.

CODY, C.W.; PRASHER, D.C.; WESTLER, W.M.; PRENDERGAST, F.G.; WARD, W.W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. **Biochemistry**, New York, v. 32, p. 1212-1218, 1993.

COSTA, C.L. Vetores de vírus de plantas - 1. Insetos. IN: ANAIS DA REUNIÃO ANUAL DE PATOLOGIA DE PLANTAS, Passo Fundo, v.6, p. 103-171, 1998.

COSTA, H.S.; BLUA, M.S.; BETHKE, J.A.; REDAK, R.A. Transmition of *Xylella fastidiosa* to oleander by the glasswinged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. **HortScience**, Alexandria, v. 35, p. 1265-1267, 2000.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKY, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**. Palo Alto, v. 49, p. 711-745, 1995.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* sp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

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

DAR, S.A.; KUENEN, J.G.; MUYZER, G. Nested PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 2325-2330, 2005.

DAVIDSON, E.W.; ROSELL, R.C.; HENDRIX, D.L. Culturable bacteria associated with whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). **Florida Entomologist.**, Gainesville, v. 83, p. 150-171, 2000.

DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W.; GREENBERG, P.E. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. **Science**, Washington, v. 280, p. 295-298, 1998.

DE NEGRI, J.D. **Clorose variegada dos citros: nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais**. Campinas: CATI, 1990. 6p. (Comunicado Técnico, 82).

DE NEGRI, J.D.; GARCIA JUNIOR, A. Sugestões para o manejo de pomares com clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.14, p.255-267, 1993.

DESAINT, S.; HARTMANN, A.; PAREKH, N.R.; FOURNIER, J.C. Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 173-180, 2000.

DILLON, R.J.; VENNARD, C.T.; CHARNLEY, A.K. Exploitation of gut bacteria in the locust. **Nature**, London, v. 403, p. 851, 2002.

DOW, J.M.; DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast Review**, Chichester, v. 17, p. 263-71, 2000.

EBERHARD, A.; BURLINGAME, A.L.; EBERHARD, C.; KENYON, G.L.; NEALSON, K.H.; OPPENHEIMER, N.J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry**, New York, v. 20, p. 2444-2449., 1981.

FANTROUSSI, S.E.L.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 982-988, 1999.

FEDOROFF, N.V.; FURTEK, D.B.; NELSON, O.E. Cloning of the bronze locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element Activator (Ac). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 81, p. 3825-3829, 1984.

FERNANDES, M.C.A.; DOS SANTOS, A.S.; RIBEIRO, R.L.D. Sensibilidade ao fungicida benomyl *in vitro* de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjel. A. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, p.89-95, 2001.

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

FIGUEIRA, M.M.; LARAME, L.; MURRELL, J.C.; GROLEAU, D.; MIGUEZ, C.B. Production of green fluorescent protein by the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 193, p. 195-200, 2000.

FRAZIER, N.W. Xylem viruses and their insect vectors. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL CONFERENCE ON VIRUS AND VECTOR ON PERENNIAL HOSTS, WITH SPECIAL REFERENCE TO VITIS, ed. WB Hewitt, pp.91–99. Davis: Univ. Calif. Press, 1966.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C. LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 2796-2806, 1994.

GAGE, D.; BOBO, T.; LONG, S.R. Use of green fluorescent protein to visualize early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfafa (*Medicago sativa*). **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 178, p. 7159-7166, 1996.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN ELSAS, J.D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 369-383, 2001.

GARCIA JUNIOR, A.; LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G. Population survey of leafhopper vectors of *Xylella fastidiosa* in citrus nurseries, in Brazil. **Fruits**, Paris, v. 52, p.371-374, 1997.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. 115 p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

GRAM, L.; CHRISTENSEN, A.B.; RAVN, L.; MOLIN, S.; GIVKOV, M. Production of acylated homoserine lactones by psychotrophic Enterobacteriaceae isolated from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 3458-3463, 1999.

GRAVENA, S.; LOPES, J.R.S.; PAIVA, P.E.B.; YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R. Os vetores de *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Ed.) **Clorose Variegada dos Citros**. Bebedouro: Fundecitros. 1997. cap. 3, p. 37-53.

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

HARTUNG, J.S. Pierce's disease and *Xylella fastidiosa*. In: GOODMAN, R.M. (Ed.). **Encyclopedia of crop and soil science**. New York: Marcel-Dekker, 2004.

HARTUNG, J.S.; BERETTA, M.J.G.; BRALANSKY, R.H.; SPISSO, J.; LEE, R.F. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 64, p. 591-597, 1994.

HE, C.X.; LI, W.B.; AYRES, A.J.; HARTUNG, J.S.; MIRANDA, V.S. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, p. 622-626, 2000.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 1-21, 1998.

HENCKEL, T.; FRIEDRICH, M.; CONRAD, R. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 1980-1990, 1999.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Ed.). **Modern Soil Microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 353-373.

HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 357-371, 1999.

HEWITT, W.B.; FRAZIER, N.W.; FREITAG, J.H. Pierce's disease investigations. **Hilgardia**, Berkeley, v. 19, p. 207-64, 1949.

HILL, B.J.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 209-212, 1995.

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

HOPKINS, D.L.; PURCELL, A.H.. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevines and other emergent diseases. **Plant Disease**, St Paul, v. 86, p. 1056-1066, 2002.

HUANG, Q.; SHERALD, J.L. Isolation and phylogenetic analysis of *Xylella fastidiosa* from its invasive alternative host, porcelain berry. **Current Microbiology**, Ottawa, v. 48, p., 73-76, 2004.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, p. 1262-1265, 1985.

KAMPER, S.M.; FRENCH, W.J.; DEKLOET, S.R. Genetic relationships of some fastidious xylem-limited bacteria. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 35, p. 185-188, 1995.

KJELLEBERG, S.; MOLIN, S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 254-258, 2002.

KOLENBRANDER, P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 413-37, 2000.

KREFT, J.U. Biofilms promote altruism. **Microbiology**, New York, v. 150, p. 2751-60, 2004.

KREFT, J.U.; PICIOREANU, C.; WINPENNY, J.W.T.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Individual-based modelling of biofilms. **Microbiology**, New York, v. 147, p. 2897-2912, 2001.

KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.V. de C.; SANTOS, J.S.; BERETTA, M.J.G.; LOPES, J.R.S. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two vector species. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 2000 Riverside. **Proceedings**.: IOCV, 2000. p. 423.

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

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 5, p.150-163, 2004.

KWON, Y.M.; RICKE, S.C. Efficient amplification of multiple transposon-flanking sequences. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v, 41, p. 195–199, 2000.

LACAVA, P.T. **Isolamento, Caracterização Genética por RAPD e Resistência a Antibióticos em *Xylella fastidiosa***. Piracicaba 2000. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 637-642, 2006.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L. 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.; AZEVEDO, J.L.; HARTUNG, J.S. Interaction between *Xylella fastidiosa* and *Curtobacterium flaccumfaciens*, an endophytic bacterium. In: PIERCE'S DISEASE RESEARCH SYMPOSIUM, 2005. San Diego. **Proceedings of the Pierce Disease Symposium**, 2005. p. 247.

LAGACÉ, L.; PITRE, M.; JACQUES, M.; ROY, D. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 2052–2060, 2004.

LANE, D.B.; PACE, G. J.; OLSEN, D. A.; STAHL, M. L.; SOGIN N.R.; PACE N. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN, F.A.; AMORIM, L. Dynamics and structure of citrus variegated chlorosis (CVC) foci. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 36–41, 1998.

LARANJEIRA, F.F.; PALAZZO, D. Danos qualitativos a produção de laranja « Natal » causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, p.77-91, 1999.

LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**, Barcelona, v. 9, p. 21-28, 2006.

LAZDUNSKI, A.M.; VENTRE, I.; STURGIS, J.N. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.2, p 581-592, 2004.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; DERRICK, K.S.; HOOKER, M.S. Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis a new disease of citrus in Brazil. **Horticulture**, Boston, v. 105, p. 32-35, 1992.

LEITE B.; PASCHOLATI, S.F.; KITAGIMA, E.W.; ISHIDA, M.L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. In: ANAIS DA REVISÃO ANUAL DE PATOLOGIA DE PLANTAS, 9.,2001. Passo Fundo, 2001, p. 1-41.

LEITE JUNIOR, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 17, p. 7, 1991.

LI, W.B.; PRIAJUNIOR, W.D.; LACAVA, P.M.; QIN, X.; HARTUNG, J.S. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 953-958, 2003.

LOH, J.; PIERSON, E.A.; PIERSON III, L. .; STACEY, G.; CHATTERJEE, A. *Quorum sensing* in plant-associated bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, p. 1-5, 2002.

LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicação no manejo da Clorose Variegada dos Citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, p. 329-344, 1999.

LOPES, J.R.S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* dos citros por cigarrinhas e biologia dos vetores. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, p. 240-245, 1996.

LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R.; ALMEIDA, R.P.P.; KRÜGNER, R.; GARCIA JÚNIOR, A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 343, 1996.

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, p. 301-320, 1997.

MACHADO, M.A.; CARUSO, E.; QUAGGIO, J.A.; LAGOA, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com Clorose Variegada dos Citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, p. 53-57, 1994.

MACHADO, M.A.; SILVÉRIO, J.L.; BAPTISTA, C.R.; CRISTOFANI, M.; TEOFILO-SOBRINHO, J. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (CVC). **Laranja**, Cordeirópolis, v. 13, p. 515-531, 1992.

MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN DER WOLF, J.M.; VAN DEN BRINK, M. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89b-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22. In: RYDER, M.H.; STEPHENS, P.M.; BOWEN, G.D. **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria**. Melbourne: CSIRO, Melbourne, 1997. p. 180.

MARUCCI, R.C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arabica* L.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003, 139 p.

MARX, C.J.; O'BRIEN, B.N.; BREEZEE, J.; LIDSTROM, M.E. Novel methylotrophy genes of *Methylobacterium extorquens* AM1 identified by using transposon mutagenesis including a putative dihydromethanopterin reductase **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 1, p. 669-673, 2003.

McCAULEY, L.A.; ANGER, W.K.; KEIFER, M. et al. Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides. **Environmental Health Perspectives**, Oxford, v. 114, p. 953-960, 2006.

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

MONTEIRO, P.B.; RENAUDIN, J.; JAGOUÉIX-EVEILLARD, S.; AYRES, A.J.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, p. 246-251, 2001.

MORAN, N.A. ; DALE, C. ; DUNBAR, H. et al. Intracellular symbionts of sharpshooters (Insecta : Hemiptera : Cicadellinae) form a distinct clade with a small genome. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, p. 116-126, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, p. 695-700, 1993.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, p. 2764-2769, 1996.

NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos Endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 70-84, 2003.

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.101, p.1737-1742, 2004.

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA; R.P.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Use of a Green Fluorescent Strain for Analysis of *Xylella fastidiosa* Colonization of *Vitis vinifera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 7319-7327, 2003.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and Phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 23, p. 6-8, 2005.

NIETO-PEÑALVER, C.G; MORIN, D.; CANTET, F.; SAUREL, O.; MILON, A.; VORHOLT, J.A.; *Methylobacterium extorquens* AM1 produces a novel type of acyl-homocerine lactone with a double unsaturated side chain under methylotrophic growth conditions. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p. 561-567, 2006.

O'TOOLE, G.A.; GIBBS, K.A.; HAGER, P.W.; PHIBBS JR., P.V. The global carbon metabolism regulator *crc* is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 425-431, 2000.

O'TOOLE, G.A.; KOLLER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 28, p. 449-461, 1998.

OVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 303-315, 1998.

PALAZZO, D.A.; CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da Clorose Variegada dos Citros (C.V.C.) em pomares de colina, SP. **Laranja**, Cordeirópolis, v.13, p.489-502, 1992.

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 27-33, 2004.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, Lancaster, v. 85, p. 362-364, 1993.

PEREIRA, J.O.; CARNEIRO-VIEIRA, M.L.; AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 37-40, 1999.

POOLER, M.R.; MYUNG, I.S.; BENTZ, J.; SHERALD, J.; HARTUNG, J.S. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, p. 123-126, 1997.

PROCÓPIO, R.E.L. **Diversidade bacteriana endofítica de Eucaliptus spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 1001 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/ Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2004.

PRÜß, B.M.; BESEMANN, C.; DENTON, A.; WOLFE, A.J. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli* **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, p. 3731-3739, 2006.

PURCELL AH. Almond leaf scorch: leafhopper and spittlebug vectors. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 73, p. 834-838, 1980.

PURCELL, A.H. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. In : Harris, K.F. (Ed.). **Advances in disease Vector Research**,. New York : Springer-Verlag, 1989, v. 6, p. 243-266.

PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H. Acquisition and transmission of bacteria through artificial membranes by leafhopper vectors of Pierce's disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 25, p. 188-195, 1979a.

PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, Lancaster, v. 69, p. 393-395, 1979b.

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

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 577-582, 1997b.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: localization and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 254-259, 1997a.

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

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.

RAVEN, J.A. Phytophages of xylem and phloem: a comparison of animal and plant sap-feeders. **Advances in Ecology Research**, London, v. 13, p. 135-234, 1984.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J.; MIZELL III, R.F.; ANDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 243-270, 2004.

REESON, A.F.; JANKOVIC, T.; KASPER, M.L.; ROGERS, S.; AUSTIN, A.D. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 12, p. 85-91, 2003.

REEVE, W.G.; TIWARI, R.P.; WORSLEY, P.S.; DILWORTH, M.J.; GLENN, A.R.; HOWIESON, J.G. Constructs for insertional mutagenesis, transcriptional signal localization and gene regulation studies in root nodule and other bacteria. **Microbiology**, New York, v. 145, p. 1307-1316, 1999.

REN, D.; BEDZYK, L.A.; YE, R.W.; THOMAS, S.M.; WOOD, T.K. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 88, p. 630-642, 2004.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 517-518, 1996.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; MIRANDA, V.S.; LIMA, J.E.O. Associação entre a clorose variegada e as cigarrinhas do xilema predominantes em citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 348, 1995.

ROBERTO, S.R.; YAMAMOTO, P.T. Flutuação populacional e controle químico das cigarrinhas em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.19, p.269-284, 1998.

RODRIGUES, J.L.; SILVA-STENICO, M.E.; GOMES, J.E.; LOPES, J.R.; TSAI, S.M. Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and gyrB sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 4249-4255, 2003.

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

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M.; BERETTA, M.J.G.; TEXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. Présence bactéries dans le xyleme d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Comptes Rendues de l'Academie de Science**, Paris, v. 310, p. 345-349, 1990.

ROSSETTO, P.B.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L. Desenvolvimento de primer específico para detecção de bactérias endofíticas em citros. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 8., Piracicaba, 2000. **Resumos**. São Paulo: USP, 2000. p. 10.

RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; dos SANTOS, D.R.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, Bethesda, v. 1, p. 24-33, 2005.

RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.; SCHMELZER, R. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, p. 261-273, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, New York, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 765p.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. et al. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. [correction] *fastidiosa* [correction] subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 290-300, 2004.

SEVERIN, H.H.P. Transmission of the virus of Pierce's disease by leafhoppers. **Hilgardia**, Berkeley, v. 19, p. 190-202, 1949.

SHAPIRO, J.A.. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 52, p. 81-104, 1998.

SHIGENOBU, S.; WATANABE, H.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; ISHIKAWA, H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. **Nature**, London, v. 407, p. 81-6, 2000.

SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P. et al. The genome sequence of plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, v. 406 p. 151-159, 2000.

SMITH, R.S.; IGLEWSKI, B.H. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, Washington, v. 6, p. 56-60, 2003.

SOUZA, L.C.; WULFF, N.A.; GAURIVAUD, P.; MARIANO, A.G.; VIRGILIO, A.C.; AZAVEDO, J.L.; Monteiro, P.B. Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC *gumB* and *gumF* genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v.257, p. 236-241, 2006.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 187-209, 2002.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, p. 214-220, 2001.

SY, A.; TIMMERS, A.C.; KNIEF, C.; VORHOLT, J.A. Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p., 7245-7252, 2005.

TANG, J.L.; LIU, Y.N.; BARBER, C.E.; DOW, J.M.; WOOTTON J.C.; DANIELS, M.J. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 22, p., 409-17, 1991.

THIMM, T.; TEBBE, C.C. Protocol for rapid *in situ* hybridization of bacteria in cryosections of microarthropods. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 2875-2878, 2003.

TIMMERS, A.C.; AURIAC, M.C.; DE BILLY, F.; TRUCHET, G. Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 339-349, 1998.

TZENEVA, V.A.; LI, Y.; FELSKE, A.D.M.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L.; VAUGHAN, E.E.; SMIDT, H. Development and application of a selective PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to detect a recently cultivated *Bacillus* group predominant in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 5801-5809, 2004.

VAN AKEN, B.; PERES, C.M.; DOTY, S.L.; YOON, J.M.; SCHNOOR, J.L. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoids* x *nigra* DN34). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1191-1196, 2004.

VAN DIEN, S.J.; MARX, C.J.; O'BRIEN, B.N.; LIDSTROM, M.E. 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.

VAN DIEN, S.J.; OKUBO, Y.; HOUGH, M.T.; KOROTKOVA, N.; TAITANO, T.; LIDSTROM, M.E. Reconstruction of C3 and C4 metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis **Microbiology**, New York, v. 149, p. 601-609, 2003.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C.W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, Amsterdam v. 156, p. 626-633, 2005.

VON BODMAN, S.B.; FARRAND, S.K. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, p. 5000-5008, 1995.

WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; DÉZIEL, E.; SCHWEIZER, H.P.; RAHME, L.G.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. *Pseudomonas aeruginosa* plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation and root exudation. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, p. 320-331, 2004.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 2675-9, 2000.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; JUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen nov. , sp. nov. gram-negative, xylem limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 136-143, 1987.

WEST, S.A.; GRIFFIN, A.S.; GARDNER, A.; DIGGLE, S.P. Social evolution theory for microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**. London, v. 4, 597-607, 2006.

WU, D. ; DAUGHERTY, S.C. ; VAN AKEN, S.E. et al. Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. **PloS Biology**, Washington, v. 4, p. 1079 - 1092, 2006.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA JÚNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; LOPES, J.R.S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homolodisca ignorata* (Hemiptera:Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 28, p. 178-181, 2002.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 345-351, 2000.

ANEXOS

ANEXO A

Aparelho digestivo anterior das cigarrinhas (estomodeu) com a localização das bactérias. Figura adaptada de Purcell; Finlay, 1979b.

ANEXO B

Sistema artificial de alimentação em membranas (PURCELL; FINLAY, 1979a)

Transmissão para plantas modelo