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

**Variabilidade genética de isolados de *Curtobacterium* sp. associados
a citros**

Uira Camilo Furlan Belmonte

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

**Piracicaba
2009**

Uira Camilo Furlan Belmonte
Engenheiro Agrônomo

Variabilidade genética de isolados de *Curtobacterium* sp. associados a citros

Orientadora:
Prof.^a Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

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

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Belmonte, Uira Camilo Furlan

Variabilidade genética de isolados de *Curtobacterium* sp. associados a citros / Uira Camilo Furlan Belmonte. - - Piracicaba, 2009.
67 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Frutas cítricas 3. Marcador molecular 4. Microrganismos endofíticos 5. Variação genética I. Título

CDD 634.3
B451v

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*À Deus e aos meus pais, Leopoldo e Vera,
que sempre acreditaram em mim, não
medindo esforços para que eu pudesse
realizar meus sonhos*

DEDICO

*Aos meus irmãos Tito e Maíra, que sempre me apoiaram
e estiveram ao meu lado em todos os momentos.*

*À minha amada Dr^a Janaina C. Amaral e sua família
por todo o incentivo, amor, carinho, alegria e
companheirismo.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus que nos ilumina e nos mostra os bons caminhos;

À minha família pelo apoio, amor incondicional e ensinamentos que me foram passados;

À ESALQ/USP pela formação profissional, pessoal e pelas oportunidades de importantes viagens;

Aos professores da ESALQ/USP, especialmente aos do Departamento de Genética, que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu desenvolvimento científico e pessoal.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Genética e da biblioteca da ESALQ/USP;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento do material de pesquisa;

À Prof^a. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pela orientação, confiança depositada em meu trabalho, amizade, compreensão e fundamental colaboração na minha formação;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela amizade, exemplo profissional e orientação nesses anos de convivência e trabalho em seu laboratório;

Ao Dr. Ricardo Yara pela amizade, orientação, atenção, paciência, incentivo e fundamental ajuda na realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho durante todos esses anos e principalmente na fase de finalização desta tese e do artigo;

Aos professores Dr. Itamar Soares de Melo (Embrapa Meio Ambiente), Dr. Antonio C. Maringoni (UNESP/Botucatu) e Dra Siu Mui Tsai (CENA) por me acolherem em seus laboratórios para a realização de importantes experimentos;

Aos grandes amigos, pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos: Ana Paula, Bia, Giu, Glenan, Ivan Stella e Eric.

A todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”: Ademir, Aldo, Aline (Romã), Andréa, Anderson, Armando, Carlão, Carol, Cláudia, Danice, Fernanda Bernardes, Fernanda Sebastianes, Fernando, Francisco, Joelma, Léia, Laura, Manu, Marise Suzuki, Mayra, Michele, Lacava, Priscilla, Renata, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Rudi, Vanessa, Viviane Colombari e Zezo.

Aos colegas de outros laboratórios: Vanderlei (Veia), Rafael (Tozado) e Marcus Venicius (Polé).

E a todos aqueles amigos que me ajudaram superar as dificuldades de praticamente 10 anos de ESALQ.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	14
2.1 Revisão Bibliográfica	14
2.1.1 Microrganismos endofíticos	14
2.1.2 O gênero <i>Curtobacterium</i>	15
2.1.3 Estudo da variabilidade microbiana	18
2.2 Material e Métodos	21
2.2.1 Isolados bacterianos	21
2.2.2 Caracterização dos isolados endofíticos de citros	21
2.2.3 Teste de patogenicidade	23
2.2.4 Extração do DNA genômico bacteriano	24
2.2.5 Amplificação do gene 16S rRNA	24
2.2.6 Caracterização dos isolados por ARDRA	25
2.2.7 Caracterização dos isolados por RAPD	25
2.2.8 Caracterização dos isolados por AFLP	26
2.2.8.1 Digestão do DNA	26
2.2.8.2 Preparo dos adaptadores	27
2.2.8.3 Reação de amplificação	27
2.2.8.4 Limpeza das placas	28
2.2.8.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%	28
2.2.8.6 Revelação dos géis	29
2.2.9 Análise dos dados	29
2.2.10 Identificação por perfis de ácidos graxos de membranas celulares (MIDI-FAME)	30

2.2.11 Sequenciamento e análise do gene 16S rRNA	31
2.2.12 Enzimas extracelulares (API-ZYM)	31
2.3 Resultados e Discussão	33
2.3.1 Caracterização dos isolados endofíticos de citros	33
2.3.2 Teste de patogenicidade	35
2.3.3 Caracterização dos isolados por ARDRA	35
2.3.4 Caracterização dos isolados por RAPD e AFLP	39
2.3.5 Perfis de Ácidos Graxos de Membranas Celulares (MIDI-FAME)	47
2.3.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA	49
2.3.7 Atividade enzimática (API-ZYM)	51
3 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

RESUMO

Variabilidade genética de isolados de *Curtobacterium* sp. associados a citros

Microrganismos endofíticos são aqueles, cultiváveis ou não, que habitam o interior da planta hospedeira sem causar danos aparentes, podendo ou não apresentar estruturas externas visíveis. Esta interação endófito-planta é intrínseca a determinadas espécies de plantas e/ou bactérias. Embora bactérias do gênero *Curtobacterium* sejam normalmente estudadas como fitopatógenas, este grupo vem sendo isolado como endófito de diferentes espécies vegetais, tais como citros, trevo, arroz, batata, milho, olmeiro, café e álamo. Tais bactérias vem sendo estudada no controle de doenças em pepino, batata e fumo, na promoção de crescimento, interagindo com bactérias promotoras de crescimento (PGPR) e fitopatógenas. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi estudar a variabilidade genética e fisiológica de *Curtobacterium* sp. isolados endofiticamente de citros, por meio das técnicas moleculares ARDRA, RAPD, AFLP e sequenciamento do gene 16S rRNA, além de características fisiológicas (coloração da colônia, fitopatogenicidade e perfil enzimático). Além dos isolados endofíticos de citros, foram utilizados isolados endofíticos e fitopatogênicos de diversas culturas proveniente de diferentes regiões do Brasil e outros países. Embora a coloração das colônias seja uma característica altamente variável, foi observada correlação, onde os isolados endofíticos de citros apresentaram coloração variando de alaranjado a róseo, enquanto os outros isolados analisados apresentaram coloração amarelada e creme. A análise por ARDRA possibilitou a formação de 4 ribotipos (A, B, C e D), sendo que todos os fitopatógenos foram agrupados no ribotipo D. As análises de variabilidade por meio do RAPD e AFLP permitiram a separação dos isolados bacterianos em 2 grupos principais, endófitos e fitopatógenos, além de mostrar grande variabilidade dentro do grupo de isolados endofíticos de citros. De acordo com os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA, os isolados endofíticos de citros foram agrupados separadamente das demais espécies analisadas. Os resultados do presente estudo demonstram que os isolados endofíticos de citros apresentam genótipo divergente, sugerindo que estes isolados possam pertencer a uma nova espécie ou subespécie de *Curtobacterium*.

Palavras-chaves: Variabilidade genética; *Curtobacterium*; Endófitos; ARDRA; AFLP

ABSTRACT

Genetic variability of *Curtobacterium* sp. associated to citrus plants

The endophytic microorganisms are those, cultivated or not, that inhabit the interior of the plant host without causing apparent damages, presenting or not visible external structures. This interaction microorganisms-plant is specific to certain species of plants and/or bacteria. Although bacteria from genus *Curtobacterium* are normally studied as phytopathogens, this group has been isolated as endophytes from several plants, such as citrus, potato, rice, maize, coffee, elm trees, red clover and poplar. Also, this bacterium has been associated to disease biocontrol in tobacco, cucumber and potato; influencing host growth or interacting with plant growth-promoting rhizobacteria and other phytopathogenic bacteria. Therefore, the aim of this study was to evaluate the genetic and physiological variability of citrus endophytic strains of *Curtobacterium* by physiological traits (colony color, pathogenicity and enzymatic profile), as well as molecular techniques, such as ARDRA, RAPD, AFLP and 16S rRNA gene sequencing. In the present study endophytic and phytopathogenic strains from many different plants and regions around the world were used. Although the colony color is a high variable character, correlation was observed, since phytopathogenic strains presented yellow and ivory colors, while endophytes from citrus presented orange and pink colors. Four ARDRA profile (A, B, C, D) were observed in the evaluated population, being all phytopathogenic strains include in the ribotype D. The RAPD and AFLP analysis allocated the endophytes and phytopathogens in two different major groups, besides a high variability inside citrus endophytes cluster. According to 16S rRNA gene sequence analysis, citrus endophytic were clustered in a different group of others *Curtobacterium* strains. The results of the present study demonstrated that the citrus endophytic strains is a divergent genotype, suggesting that citrus endophytic strains could belong to a new *Curtobacterium* species or subspecies.

Keywords: Genetic variability; *Curtobacterium*; Endophytes; ARDRA; AFLP

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Aspecto das colônias dos isolados endofíticos de citros (sem setas) e eucaliptos (seta branca), e fitopatogênicos (setas negras). **A**: em meio de *Corynebacterium*; **B**: em meio SPW modificado..... 34
- Figura 2 - Teste de patogenicidade dos isolados endofíticos de citros para avaliar sua capacidade de causar sintomas da doença murcha-de-curtobacterium em feijoeiro. Em **A**, planta testemunha inoculada com água destilada autoclavada; em **B**, inoculadas com isolado endofítico de citros ER 1/6 e fitopatogênico Feij-2634; em **C**, inoculada com isolado fitopatogênico Feij-2634; em **D**, comparação dos três tratamentos anteriores..... 36
- Figura 3 - Eletroforese para visualização do padrão de clivagem do produto de PCR do gene 16S rRNA com enzimas de restrição. **1)** marcador molecular *ladder* 100pb; **2)** PCR sem clivar; **3)** *TaqI*; **4)** *AluI*; **5-8)** *MboI*, sendo colunas 5, 6 e 7 endófitos, e coluna 8 fitopatógenos; **9-10)** *HhaI*, sendo coluna 9 endófitos e coluna 10 fitopatógenos..... 36
- Figura 4 - Dendrograma de similaridade obtido por meio do RAPD dos isolados endofíticos e fitopatogênicos. O dendrograma foi calculado pelo método UPGMA, baseado no coeficiente de JACCARD por meio do programa NTSYSpc 2.01e, para ilustrar as relações fenéticas entre isolados. Os valores de *bootstrap* foram calculados com 1000 repetições usando o programa WinBoot e estão mostrados os valores acima de 50%, assim como a escala de similaridade. Os termos à direita representam os ribotipos obtidos por meio do ARDRA..... 40

Figura 5 - Eletroforese dos fragmentos AFLP amplificados de representantes de isolados endofíticos e fitopatogênicos com os iniciadores *EcoRI*+A / *MseI*+C. 1= 50pb, 2= ER 1/6, 3= AR 1/2, 4= PR 2/2, 5= Gal2, 6= SG041, 17= CA4, 8= feij-2500, 9= 2344, 10= CB101, 11= IPO 237, 12= 315..... 43

Figura 6 - Eletroforese dos fragmentos AFLP amplificados de representantes de isolados endofíticos e fitopatogênicos com os iniciadores *EcoRI*+C / *MseI*+G. 1= Gal2, 2= SG041, 3= CA4, 4= ER 1/6, 5= AR 1/2, 6= PR 2/2, 7= feij-2500, 8= 2344, 9= CB101, 10= IPO 237, 11= 315, 12= 50pb..... 44

Figura 7 - Eletroforese dos fragmentos AFLP amplificados de representantes de isolados endofíticos e fitopatogênicos com os iniciadores *EcoRI*+A / *MseI*+T. 1= 50pb, 2= Gal2, 3= SG041, 4= CA4, 5= ER 1/6, 6= AR 1/2, 7= PR 2/2, 8= feij-2500, 9= 2344, 10= CB101, 11= IPO 237, 12= 315..... 45

Figura 8 - Dendrograma obtido pela análise de AFLP. A similaridade genética entre os isolados foi estimada pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento fenético pelo método UPGMA. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap*, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores superiores a 50%..... 46

Figura 9 - Dendrograma (neighbour-joining) baseado na comparação das sequências completas do gene 16S rRNA dos endófitos de citros com as sequências de linhagens tipo e patovares do gênero *Curtobacterium* disponíveis no banco de dados. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap*, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores superiores a 50%. A sequência da bactéria *Clavibacter michiganense* DSM 46364 (X77435) foi utilizada como grupo externo..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de <i>Curtobacterium</i> spp. utilizados neste estudo, bem como seus hábitos, hospedeiro, origem e referência bibliográfica.....	22
Tabela 2 - Enzimas de restrição utilizadas na clivagem do produto de PCR do gene 16S rRNA.....	25
Tabela 3 - Características do sítio de restrição das enzimas <i>EcoRI</i> e <i>MseI</i>	26
Tabela 4 - Sequência dos adaptadores utilizados neste estudo.....	27
Tabela 5 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16S rRNA	31
Tabela 6 - Enzimas extracelulares avaliadas pelo teste API-ZYM, com os respectivos números de identificação e os substratos.....	32
Tabela 7 - Ribotipos formados a partir da clivagem dos produtos de PCR do gene 16S rRNA com as enzimas de restrição.....	38
Tabela 8 - Identificação dos isolados endofíticos de citros representativos dos grupos obtidos pelas técnicas de ARDRA, RAPD, AFLP e por perfil de ácidos graxos (FAME).....	47
Tabela 9 - Perfil dos principais ácidos graxos presentes nos 8 isolados endofíticos de citros analisados.....	48
Tabela 10 - Avaliação das atividades enzimáticas pelo teste API-ZYM de isolados endofíticos de citros.....	52

1 INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos podem viver associados aos vegetais, tanto em sua superfície como em seu interior. Tais microrganismos podem ser classificados como epifíticos (habitam a superfície dos órgãos e tecidos vegetais), endofíticos (habitam o interior das plantas hospedeiras sem causar danos a elas) e fitopatogênicos (que causam doenças em plantas). Estima-se que o número de células microbianas que vivem em contato com vegetais é bastante superior ao número de células que formam o próprio hospedeiro. Bactérias endofíticas colonizam um nicho ecológico similar aos dos fitopatogênicos, especialmente aos patógenos de tecido vascular. Isto dá condições aos microrganismos endofíticos em atuarem como agente de controle biológico.

Bactérias do gênero *Curtobacterium* são normalmente estudadas como fitopatogênicas, entretanto algumas espécies têm sido identificadas como endófitos de diversas culturas, tanto de dicotiledôneas como monocotiledôneas, sendo associadas ao controle de doenças, na promoção de crescimento de plântulas e interagindo com outras bactérias promotoras de crescimento.

Estudos anteriores mostraram que bactérias endofíticas do gênero *Curtobacterium* estão predominantemente em plantas de citros sem sintomas da Clorose Variegada dos Citros (CVC), gerando especulações sobre seu papel na limitação do estabelecimento da *Xylella fastidiosa* nessas plantas. Este papel no interior da planta hospedeira poderia ser determinado pela produção de compostos antagonísticos ou indução do mecanismo de defesa da planta.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética e fisiológica de isolados endofíticos de *Curtobacterium* provenientes de citros, por meio das técnicas moleculares ARDRA, RAPD, AFLP e sequenciamento do gene 16S rRNA, além de características fisiológicas (coloração da colônia, fitopatogenicidade e perfil enzimático), e suas relações fenéticas com isolados endofíticos e fitopatogênicos do gênero *Curtobacterium*, buscando investigar as diferenças destas populações e um melhor entendimento de suas relação com a planta hospedeira.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Microrganismos endofíticos

Várias definições para os microrganismos endofíticos podem ser encontradas na literatura. Petrini (1991) definiu endófitos como aqueles microrganismos que habitam o interior das plantas, sem aparentemente causar qualquer efeito negativo aos seus hospedeiros. Hallmann et al. (1997) definem endófitos como todas aquelas bactérias que podem ser recuperadas do interior de plantas saudáveis, após uma cuidadosa desinfecção externa, eliminando desta maneira os microrganismos epifíticos. Azevedo e Araújo (2007) chamam de microrganismos endofíticos todos aqueles que podem ou não crescer em meios de cultura (cultivados ou não), e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas na planta hospedeira. Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição do termo 'microrganismo endofítico', considerando a definição anterior, e adicionalmente, dividindo endófitos em dois tipos, sendo: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. É importante ressaltar que a classificação em microrganismos endofíticos dos Tipos I e II, microrganismos epifíticos ou patógenos tem uma função meramente didática.

É evidente que entre endófitos, epífitos e fitopatógenos existe um gradiente que é intrínseco à Biologia da interação microrganismo-planta. Para penetrar no seu hospedeiro os endófitos podem viver como epífitos uma parte do tempo; bem como, um microrganismo endofítico, pode se tornar fitopatógeno em uma planta em condições de estresse; e ainda, um epífita, eventualmente pode penetrar em uma planta tornando-se um endófito.

Com exceção dos transmitidos por sementes, os endófitos podem penetrar no tecido da planta via zona radicular, caules, cotilédones e flores (KOBAYASHI; PALUMBO, 2000). Os endófitos e os fitopatógenos são capazes de penetrar e colonizar

a planta hospedeira de forma sistêmica ou localizada, habitando ativamente o apoplasto (MAHAFFEE et al., 1997; QUADT-HALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997; MAHAFFEE et al., 1997), e ocasionalmente, pode ocorrer colonização intracelular (MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004; QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996). Com essa colonização sistêmica da planta, podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, podendo atuar sobre as populações de outros microrganismos presentes no interior da planta (ANDREOTE et al., 2006).

Dessa forma, por ocuparem o mesmo nicho que os fitopatógenos, estes microrganismos apresentam potencial como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997; RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007; STURZ; MATHESON, 1996; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000). Este controle biológico pode ocorrer devido a atuação direta sobre o patógeno (PAN et al., 1997), por antagonismo (ALTINDAG et al., 2006; KOZDRÓJ; TREVORS; VAN ELSAS, 2004), por meio de indução de resistência sistêmica na planta hospedeira (KAVINO et al., 2007; SHARMA; NOWAK, 1998; VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2002) ou por competição (MARI; GUIZZARDI; PRATELLA, 1996). Os endófitos também podem promover uma melhora no crescimento e produção de algumas culturas, produzirem fitormônios, atuarem na remoção de contaminantes, solubilizarem fosfato e contribuir na assimilação de nitrogênio pelas plantas (COMPANT et al., 2004, 2005; INIGUEZ; DONG; TRIPLETT, 2004; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; LODEWYCKX et al., 2002; MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006; SESSITSCH et al., 2002).

2.1.2 O gênero *Curtobacterium*

A reclassificação das espécies fitopatogênicas do gênero *Corynebacterium* para os gêneros *Arthrobacter* (COLLINS; JONES; KROPPESTEDT, 1981), *Clavibacter* (DAVIS et al., 1984), *Curtobacterium* (COLLINS; JONES, 1983), *Rhodococcus* (GOODFELLOW, 1984), e, mais recentemente *Rathayibacter* (ZGURSKAYA et al., 1993), fundamentada principalmente na quimiotaxonomia, trouxe uma substancial melhora na taxonomia dessas bactérias, refletindo melhor a sua correlação fenética.

Curtobacterium (Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria (class); Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae) é um gênero criado por Yamada e Komagata (1972) para acomodar as bactérias corineformes isoladas predominantemente de plantas, inclusive fitopatogênicas, que possuem ornitina como diaminoácido da peptidoglicana, mas que eram consideradas distintas do gênero *Cellulomonas* (KOMAGATA; SUZUKI, 1986). Collins e Jones (1983) propuseram formalmente a reclassificação daquelas espécies fitopatogênicas no gênero *Curtobacterium*, reduzindo-as para apenas uma espécie *Curtobacterium flaccumfaciens*, com status de patovares, confirmando a proposição feita por Dye e Kemp (1977) e aceita por Young et al. (1978) por considerarem que essas bactérias são estreitamente relacionadas bioquímica e fisiologicamente, rejeitando a proposta de classificação em subespécies (CARLSON; VIDAVER, 1982). *C. flaccumfaciens* distingue-se ainda das espécies de *Clavibacter* pelo crescimento mais rápido e pela presença de células flageladas móveis (KOMAGATA; SUZUKI, 1986).

Dessa maneira, as corinebactérias fitopatogênicas do gênero *Curtobacterium* passaram a ter a seguinte nomenclatura: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (COLLINS; JONES, 1983), agente causal da murcha vascular e de outros sintomas em leguminosas; *C. flaccumfaciens* pv. *basellae* (GUO et al., 2003), fitopatógena de Bertalha (*Basella rubra* L.), *C. flaccumfaciens* pv. *betae* (COLLINS; JONES, 1983), agente causal da murcha vascular e de manchas foliares em beterraba vermelha; *C. flaccumfaciens* pv. *beticola* (CHEN et al., 2007), fitopatógeno de beterraba; *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* (COLLINS; JONES, 1983), agente causal da infecção vascular, de manchas foliares e dos bulbos de tulipa; *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* (COLLINS; JONES, 1983), agente causal do cancro da haste e de manchas foliares na planta ornamental *Euphorbia pulcherrima*. Entretanto, atualmente tem sido descritas novas espécies, e o gênero *Curtobacterium* está composto por oito espécies: *C. albidum* (YAMADA; KOMAGATA, 1972), *C. ammoniigenes* (AIZAWA et al., 2007), *C. citreum* (YAMADA; KOMAGATA, 1972), *C. flaccumfaciens* (COLLINS; JONES, 1983), *C. ginsengisoli* (KIM et al., 2008), *C. herbarum* (BEHRENDT et al., 2002), *C. luteum* (YAMADA; KOMAGATA, 1972) e *C. pusillum* (YAMADA; KOMAGATA, 1972).

C. flaccumfasciens pv. *flaccumfasciens* (COLLINS; JONES, 1983) é uma bactéria gram-positiva e agente causal da murcha vascular em leguminosas (feijão), infectando as plantas por meio da semente contaminada ou ferimentos e aberturas naturais. Ela está presente em diversas partes do mundo como Europa, Austrália, Ásia, América do Norte e Sul, e África (SMITH et al., 1997).

No Brasil esta doença foi inicialmente identificada no Estado de São Paulo (MARINGONI; ROSA, 1997) e hoje se encontra distribuída em várias áreas produtoras de feijão localizadas nos estados de Goiás, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal (HERBES et al., 2008; LEITE Jr. et al., 2001; THEODORO; MARINGONI, 2006c). Embora exista uma intensa busca por métodos de controle desta doença (RODRIGUES et al., 2006; SOARES et al., 2004; THEODORO; MARINGONI, 2006a; 2006b), seu manejo está fundamentado no uso de cultivares resistentes, rotação de cultura e sementes sadias (MARINGONI, 2002; MARINGONI; CAMARA, 2006; MARINGONI et al., 2006).

Apesar das bactérias do gênero *Curtobacterium* serem classificadas como fitopatogênicas, também tem sido isoladas bactérias endofíticas de culturas como citros (ARAÚJO et al., 2001, 2002), trevo (STURZ; CHRISTIE, 1998), arroz (ELBELTAGY et al., 2000), batata (STURZ; MATHESON, 1996), inhame (TOR; MANTELL; AINSWORTH, 1992), plantas de pradarias (BEHRENDT et al., 2002; ZINNIEL et al., 2002), Olmeiro (MOCALI et al., 2003), café (VEGA et al., 2005) e álamo (ULRICH; ULRICH; EWALD, 2008) sendo associadas ao controle de doenças em diversas culturas como fumo (PARK; KLOEPPER, 2000), pepino (RAUPACH; KLOEPPER, 2000) e batata (STURZ; MATHESON, 1996); na promoção de crescimento de plântulas de trevo (STURZ et al., 1997) ou interagindo com outras bactérias promotoras de crescimento (BENT; CHANWAY, 1998) e fitopatogênicas (LACAVA et al., 2004). Araújo et al. (2002) isolaram *C. flaccumfasciens* de plantas de citros predominantemente sem sintomas da Clorose Variegada dos Citros (CVC), sugerindo que este endófito poderia atuar negativamente sobre o estabelecimento da *Xylella fastidiosa* nessas plantas.

2.1.3 Estudo da variabilidade microbiana

Os microrganismos compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponível entre os seres vivos. Entretanto essa diversidade ainda é pouco explorada e conhecida (MELO; TOCZYSKL, 2002; PROSSER et al., 2007). A compreensão dessa diversidade genética é de fundamental importância para o entendimento da interação entre endófito-planta, auxiliando em seu uso na agricultura sustentável (AZEVEDO; ARAÚJO; MACCHERONI, 2000).

A evolução da biologia molecular aplicada ao estudo dos microrganismos tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento dessa diversidade microbiana. Métodos baseados na análise das proteínas e principalmente dos ácidos nucleicos têm sido utilizados para a caracterização microbiana (PALLERONI, 1993), apresentando diferentes níveis de resolução para detecção da variabilidade entre linhagens.

As análises do gene 16S rRNA tem sido largamente utilizadas, principalmente em bactérias, para o estudo de microrganismos no ambiente (ANDREOTE, 2007; ANDREOTE et al., 2006; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2005; LACAVAL et al., 2006; LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999). Este gene é bastante utilizado em estudos taxonômicos e de variabilidade genética em bactérias por possuir múltiplas cópias que não codificam proteínas, por ser muito conservado, estar presente em todos os organismos e apresentar um tamanho suficiente para análises filogenéticas (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; WOESE, 1987). Adicionalmente, o gene 16S rRNA depois de amplificado e sequenciado, pode ser analisado em diferentes bases de dados, permitindo a identificação dos isolados ao nível de gênero e, possivelmente, ao nível de espécie (CHENEY et al., 2000).

A amplificação do gene 16S rRNA por Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite realizar a Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado - ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), a qual consiste na amplificação e posterior digestão do rDNA com enzimas de restrição,

formando grupos de acordo com a similaridade das bandas, observadas por eletroforese em géis de agarose.

Esta técnica tem sido usada como uma ferramenta molecular rápida, barata e eficaz no intuito de filtrar, agrupar e diferenciar o grande número de colônias obtidas em isolamento (BAIK et al., 2008; GURTNER et al., 2001; HEYNDRICKX et al., 1996; VAN ELSAS et al., 1998). O polimorfismo dos perfis de bandas (ribotipos) observados nos géis vem sendo utilizado para estudos de filogenia, variabilidade ou agrupamento genotípico de isolados bacterianos (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; LEI et al., 2008; LUVITTO, 2008; MOCALI et al., 2003; SOUZA, 2005; SUN et al., 2008).

O Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso - RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) surgiu com o desenvolvimento da técnica de PCR (WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990), sendo baseada na amplificação simultânea de vários locos anônimos dispersos no genoma, utilizando um único iniciador de sequência arbitrária de bases, que se anelam em vários pontos do DNA genômico.

Os marcadores de RAPD permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética. Esta técnica tem a vantagem por ser rápida e de baixo custo, permitindo uma alta densidade de mapeamento, abrangendo todo o genoma, sem a necessidade de conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que flanqueiam a região do DNA de interesse (LOPES et al., 2002; MICHELMORE; PARANI; KESSELI, 1991), por isso vem sendo empregada na avaliação da variabilidade genética de diversas bactérias (GUPTA et al., 2001; HIRATA et al., 2008; LACAVA et al., 2001; SOUZA, 2005, 2006).

O Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados – AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995) baseia-se na variação do comprimento de fragmentos de restrição amplificados seletivamente. O ensaio de AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da clivagem do genoma com enzimas de restrição, com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR, detectando um maior número de locos. Essencialmente uma análise de AFLP consiste em quatro etapas. Na primeira etapa, o DNA genômico total é clivado com duas enzimas de restrição. Na segunda etapa, adaptadores específicos

são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando iniciadores especificamente desenhados para reconhecer as sequências dos adaptadores. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em um gel de alta resolução e é feita a análise das bandas detectadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; LOPES et al., 2002).

Esta técnica permite determinar distâncias e similaridades entre materiais genéticos de difícil discriminação genética, possibilitando a elaboração de dendrogramas que tentarão elucidar questões a respeito da evolução filogenética e variabilidade genética dentro de um mesmo grupo. Este método tem sido utilizado para diferenciação de bactérias (LIN; KUO; MA, et al., 1996; TORRIANI et al., 2001; VOS et al., 1995) e no estudo de variabilidade de várias espécies de organismos (AVROVA et al., 2002; FEBERWEE et al., 2005; GONZALEZ, et al., 2004; JOHN et al., 2004; MASIGA et al., 2006; NARUZAWA, 2008; SOUZA, 2005). Esta técnica apresenta como vantagem a maior quantidade de fragmentos obtidos, proporcionando maior cobertura do genoma, permitindo alta capacidade de detecção de polimorfismo em sítios de restrição e alta especificidade de amplificação devido ao uso de iniciadores mais longos que os de RAPD (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Outra forma de caracterizar microrganismos está baseada na variação da produção de enzimas extracelulares. Para isso o sistema API-ZYM é um método rápido e reproduzível que permite o estudo semi-quantitativo de algumas enzimas extracelulares produzidas por diferentes amostras (microrganismos, suspensões celulares, tecidos, etc.) Através de um kit apropriado é possível detectar simultaneamente a atividade de 19 enzimas a partir de pequenas quantidades de amostras em apenas 4 horas. Este sistema vem sendo empregado em diversos microrganismos, principalmente para estudos de diversidade e caracterização microbiana (DONAT et al., 2007; ESTRADA, 1997; HESAMI et al., 2008; LU et al., 2008).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Isolados bacterianos

Foram utilizadas linhagens endofíticas de citros, eucaliptos e trevo, gramíneas (*Bouteloua curtipendula*), e fitopatogênicas de feijão, beterraba, tulipa, soja, provenientes do Brasil, Estados Unidos, Canadá, Holanda e Alemanha (Tabela 1). Os isolados endofíticos de citros utilizados neste estudo, com iniciais AR e AF foram isolados de ramos e folhas, respectivamente, de plantas com sintomas da CVC; iniciais ER e EF, isolados de ramos e folhas, respectivamente, de plantas com *Xylella fastidiosa*, mas sem sintomas da CVC; iniciais SR e SF, isolados de ramos e folhas, respectivamente, de plantas de pomares saudáveis.

2.2.2 Caracterização dos isolados endofíticos de citros

Foram feitos experimentos comparando o crescimento e coloração das colônias de isolados endofíticos e fitopatogênicos, para isso, foram utilizados dois meios de cultura, sendo um o meio SPW modificado (ARAÚJO, 2000) e o outro foi o meio para *Corynebacterium* (<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/media/medium000053.html>). Para observação, os microrganismos foram crescidos por 2 dias a 28°C seguido de 5 dias a 10°C.

Foi avaliada a produção de pigmentos pelos isolados endofíticos de citros, os quais foram inoculados em placas de Petri contendo meio de Burkholder (MARINGONI, 2000) por 5 dias a 28° C. Outro teste realizado foi para avaliar o crescimento de todos os isolados em meio seletivo para *Corynebacterium*. Neste experimento, os isolados foram inoculados em placas de Petri com meio D2 (COLLINS; BRADBURY, 1999) por 5 dias à 28° C.

Tabela 1 - Isolados de *Curtobacterium* spp. utilizados neste estudo, bem como seus hábitos, hospedeiro, origem e referência bibliográfica

Isolados	Espécie	Hábitos	Hospedeiro	Origem	Referência
AR 1/2, AR 4/15, AR 1.4/7, AF2/7, EF 1/6, AR 1.4/11, AR 1.5/3, AR 4/6, ER 1.4/2, ER 1.4/8, ER 1/11, ER 1/5, ER 1/6, ER 1/7, ER 1/9, ER 4/15, SR 1/6, SR 1/8, SR 2/1, SR 3/13, SR 3/8, SR 4/1, SR 4/8, AF 2/5, SF 2/17, SR 1.3/6, SR 1.4/9, SR 3/19, SR 4/7	<i>Curtobacterium</i> sp.	Endófito	Laranja doce ⁽¹⁾	Brasil	Araújo et al. (2002)
PR 1.1/8, PR 1/10, PR 1/11, PR 1/8, PR 2/2, PR 2/3, PR 3/2, PR 4/3, PR 1.4/8, PR 1.4/1	<i>Curtobacterium</i> sp.	Endófito	Ponkan	Brasil	Araújo et al. (2002)
Gal ₂ , CbIII ₂	<i>C. flaccumfaciens</i>	Endófito	Eucalipto	Brasil	
IPO 237, IPO 238	<i>C. flaccumfaciens</i>	Fitopatógeno	Feijão	Holanda	
1290, 1336, 1337	<i>C. f. pv. flaccumfaciens</i>	Fitopatógeno	Feijão	Brasil	
Feij-2500, Feij-2502, Feij-2634, Feij-2910, Feij-2912	<i>C. f. pv. flaccumfaciens</i>	Fitopatógeno	Feijão	Brasil	Maringoni e Kurozawa (2002)
315	<i>C. f. pv. betae</i>	Fitopatógeno	Beterraba	Brasil	
SG041	<i>Curtobacterium</i> sp.	Endófito	<i>Bouteloua curtipendula</i> (gramínea)	Estados Unidos	Zinniel et al. (2002)
20035C, 2A-Lt, 2344	<i>C. f. pv. flaccumfaciens</i>	Fitopatógeno	Soja	Estados Unidos	Zinniel et al. (2002)
CB101	<i>C. f. pv. betae</i>	Fitopatógeno	Beterraba	Estados Unidos	Zinniel et al. (2002)
CO101	<i>C. f. pv. oortii</i>	Fitopatógeno	Tulipa	Estados Unidos	Zinniel et al. (2002)
CA 1, CA 2, CA 3, CA 5	<i>C. flaccumfaciens</i>	Endófito	Trevo	Canadá	Sturz e Christie (1998)
CA 4	<i>C. luteum</i>	Endófito	Trevo	Canadá	Sturz e Christie (1998)

⁽¹⁾ Endofíticos de citros com iniciais AR e AF foram isolados de ramos e folhas, respectivamente, de plantas com sintomas da CVC; iniciais ER e EF, isolados de ramos e folhas, respectivamente, de plantas com *Xylella fastidiosa*, mas sem sintomas da CVC; iniciais SR e SF, isolados de ramos e folhas, respectivamente, de plantas de pomares saudáveis.

2.2.3 Teste de patogenicidade

Os isolados endofíticos de citros foram avaliados quanto à patogenicidade em feijoeiro. O experimento foi conduzido no Departamento de Produção Vegetal - Setor de Defesa Fitossanitária, FCA/UNESP, em Botucatu/SP. Foi utilizada a cultivar Pérola como padrão de suscetibilidade ao isolado bacteriano *C. f. pv. flaccumfaciens* Feij 2634, utilizado como controle positivo.

As plântulas de feijoeiro foram cultivadas em vasos, contendo o volume aproximado de 2 litros de substrato autoclavado constituído da mistura de terra, esterco de curral curtido e areia grossa lavada (1:2:1), além de adubo químico (MARINGONI, 2002). Neste estudo foram empregadas 3 repetições para cada isolado e em cada vaso foram mantidas três plantas. Nove dias após a emergência a bactéria foi inoculada por meio de duas punções no caule, entre as folhas cotiledonares e as folhas primárias, com uma agulha entomológica previamente umedecida em suspensão bacteriana com concentração de 10^7 UFC ml⁻¹, crescidas em meio de cultura TSB, durante 72 h a 28°C, e ressuspensionado em água destilada autoclavada.

Na testemunha, as plantas de feijoeiro da cultivar Pérola receberam água destilada autoclavada. Os vasos foram mantidos sob condições de telado, com temperatura oscilando entre 20 e 30°C e umidade relativa entre 70 a 90%. O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso com três repetições. As plantas foram irrigadas diariamente e pulverizadas semanalmente com defensivos agrícolas registrados para a cultura, visando o controle de ácaros e insetos. Os sintomas foram avaliados 25 dias após a inoculação.

Os sintomas da doença foram avaliados por meio da adaptação da escala de notas empregada para murcha-de-Fusarium, recomendada pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), descrita por Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987), que se segue: 0 = sem sintomas de doença; 1 = sintoma de mosaico nas folhas; 2 = poucas folhas murchas (1 a 3 folhas, menos de 10% das folhas da planta); 5 = aproximadamente 25% de folhas apresentam murchas e amarelecimento; 7 = aproximadamente 50% de folhas murchas, amarelecimento e necrose de folíolos, plantas com nanismo; 9 = aproximadamente 75% ou mais de folhas com murcha e/ou

necrose, queda prematura de folhas, nanismo severo e ou morte da planta. As reações de resistência e de suscetibilidade foram consideradas, respectivamente, para notas médias de severidade até 2 e superiores a 2,1.

2.2.4 Extração do DNA genômico bacteriano

Os isolados bacterianos foram cultivados em 5 mL de meio TSB a 28°C por 36 horas. As células presentes em 1,5 mL deste cultivo foram peletizadas por centrifugação por 1 minuto a 10.000g. Os demais procedimentos para a extração de DNA foram realizados de acordo com Araújo et al. (2002). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1,0% (p/v). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio, observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

2.2.5 Amplificação do gene 16S rRNA

Para a amplificação do gene 16S rRNA foram utilizados os iniciadores PO27F e R1387 (HEUER et al., 1997). As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 1 µL da suspensão bacteriana, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxiribonucleotídeos trifosfato, 0,2 µM de cada iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Um controle negativo (reação de PCR sem DNA bacteriano) foi incluído em todos os eventos de amplificação. A PCR foi realizada em um termociclador PTC – 200 (MJ Research, USA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 62,5°C por 1 min e 72°C por 1 min. Uma extensão final de 72°C por 7 min. A confirmação da amplificação do fragmento de DNA alvo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), coloração com brometo de etídio e observação do fragmento de tamanho esperado (1400 pb) sobre luz ultravioleta.

2.2.6 Caracterização dos isolados por ARDRA

A análise de restrição dos fragmentos amplificados a partir dos isolados foi realizada por digestão de 1 µg dos produtos de PCR resultante da amplificação do gene 16S rRNA, utilizando 2U de cada uma das 4 enzimas de restrição (Tabela 2), de acordo com as recomendações do fabricante. A avaliação dos perfis de restrição foi realizada por eletroforese em géis de agarose 2,5% (p/v) corados com brometo de etídio e fotodocumentado sobre luz ultravioleta. Os perfis de clivagem foram comparados e a ocorrência de cada um dos ribotipos determinada dentro de cada amostra.

Tabela 2 - Enzimas de restrição utilizadas na clivagem do produto de PCR do gene 16S rRNA

Enzima	Tampão	Temperatura	Tempo	Sítio de clivagem
<i>TaqI</i> (Gibco)	REact 2	65°C	3 horas	T↓CGA
<i>AluI</i> (Invitrogen)	REact 1	37°C	3 horas	AG↓CT
<i>MboI</i> (Fermentas)	R+	37°C	3 horas	↓GATC
<i>HhaI</i> (Gibco)	REact 2	37°C	3 horas	GCG↓C

2.2.7 Caracterização dos isolados por RAPD

Para a realização da análise da variabilidade genética por RAPD foram testadas várias concentrações de DNA e dos diferentes reagentes (Taq polimerase, iniciadores, MgCl₂, tampão) para otimizar a amplificação dos iniciadores testados, visando uma melhor observação das bandas a serem geradas (WILLIAMS et al., 1993).

As reações de RAPD foram conduzidas em um termociclador (*Perkin-Elmer Gene Amp-PCR System 9700*) programado da seguinte forma: 5 minutos inicial de desnaturação a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto à 35°C e 2 minutos à 72°C, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

A amplificação por RAPD foi realizada em um volume final de 25 µl, contendo 10 ng de DNA genômico, 0,4 µM de iniciador, 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 3 mM de MgCl₂, e 2 U de Taq DNA polimerase (*Fermentas*). Os produtos do PCR foram

analisados em um gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídio e fotodocumentado sobre luz ultravioleta.

Os iniciadores utilizados na análise foram: OPP-12 (5'-AAGGGCGAGT-3'), OPP-19 (5'-GGGAAGGACA-3'), OPC-02 (5'-GTGAGGCGTC-3'), OPC-08 (5'-TGGACCGGTG-3') e OPA20 (5'-GTTGCGATCC-3') (*Operon Technologies*).

2.2.8 Caracterização dos isolados por AFLP

A análise de AFLP foi realizada conforme descrito por Masiga et al. (2006).

2.2.8.1 Digestão do DNA

A digestão do DNA genômico foi realizada com a utilização das enzimas de restrição *EcoRI* (corte raro) e *MseI* (corte freqüente) (Tabela 3). As reações de digestão foram realizadas com aproximadamente 200 ng do DNA bacteriano, 5 µL do tampão One Phor All 10X (OPA; Amersham Pharmacia Biotech), 0,5 µL de solução BSA 10 µL µg⁻¹ (New England), 0,5 µL da enzima *MseI* 10U µg⁻¹ (New England) e 0,5 µL da *EcoRI* 10U µL⁻¹ (Invitrogen) em volume final de 50 µL. O mix foi incubado a 37°C por 12 horas e depois aquecida a 70°C por 15 minutos para inativar as enzimas.

Tabela 3 - Características do sítio de restrição das enzimas *EcoRI* e *MseI*

Enzima	Sequência
<i>EcoRI</i>	5' – T↓TAA – 3'
<i>MseI</i>	5' – G↓AATTC – 3'

2.2.8.2 Preparo dos adaptadores

Os adaptadores neste estudo estão na Tabela 4. Para o preparo dos adaptadores *EcoRI* foram utilizados: 6,4 μL ($500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) do oligonucleotídeo I, 5,6 μL ($500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) do oligonucleotídeo II, 7,0 μL do tampão OPA 10X e 101 μL de água ultra pura. No preparo do adaptador *MseI* foram utilizados: 5,6 μL ($600 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) do oligonucleotídeo I, 4,8 μL ($620 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) do oligonucleotídeo II, 6,0 μL do tampão OPA 10X e 103,6 μL de água ultra pura. A hibridização das fitas de adaptadores foi realizada no termociclador (Gene Amp PCR System 9700 – Applied Biosystems), com a seguinte programação: 10 minutos a 65°C , 1 minuto a 37°C e 10 minutos a 25°C . Após o preparo, os adaptadores foram acondicionados a -20°C até o momento da utilização.

Tabela 4 - Sequência dos adaptadores utilizados neste estudo

Enzima	Sequência
<i>EcoRI</i> Adaptador	5' – CTC GTA GAC TGC GTA CC– 3' 3' – CAT CTG ACG CAT GGT TAA – 5'
<i>Mbol</i> (Fermentas)	5' – G ACG ATG AGT CCT GAG – 3' 3' – TAC TCA GGA CTC AT – 5'

2.2.8.3 Reação de amplificação

Na reação de amplificação foi utilizado 2,5 μL da amostra de DNA ligada aos adaptadores, 1,0 μL ($25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) do iniciador da enzima *EcoRI*, 1,0 μL ($25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) do iniciador da enzima *MseI*, 0,4 μL de dNTPs 2,5mM, 1,0 μL do tampão 10X, 0,3 μL de MgCl_2 50mM, 0,3 μL de *Taq* DNA polimerase ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$; Fermentas) e 3,5 μL de água ultra pura. O programa de PCR utilizado foi composto de 26 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 94°C por 2 min. Cada ciclo foi constituído de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 min. O ciclo final foi seguido de uma extensão a 72°C por 5 min. O produto desta reação foi

armazenado a -20°C . Foram utilizadas as seguintes combinações de iniciadores: *EcoRI*+A / *MseI*+C, *EcoRI*+C / *MseI*+G e *EcoRI*+A / *MseI*+T.

2.2.8.4 Limpeza das placas

O etanol 95% foi utilizado para limpeza das placas. Na placa maior foi aplicado 1,0 ml de Plus One Repel-Silane (Amershan Pharmacia Biotech) e deixado agir por 5 minutos. Na placa menor foi aplicado um mix de 990 μL de etanol 95% e 5 μL de ácido acético glacial e 5 μL de Plus One Bind Silane (Amershan Pharmacia Biotech).

2.2.8.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% com utilização do sistema Sequi-gen GT (BioRad) e fonte de 3000V. A solução estoque da matriz do gel foi feita com 20 g de uréia, 3 g de bisacrilamida, 60 g de acrilamida e o volume completado a 1 litro. A matriz foi filtrada (filtro Milipore 0,2 μm) e armazenada sob refrigeração.

O gel foi preparado com 28 mL da matriz, 14 mL de TBE 10X, 120 μL de TEMED (Promega), 800 μL de persulfato de amônio 10% (Promega) e o volume completado a 120 mL com água ultra pura. O gel foi aplicado entre as placas com auxílio de uma seringa e deixado polimerizar por 1 hora.

Foi realizada a pré-corrida, visando aquecer e limpar o gel, durante 40 minutos na potência de 80W. Foram adicionados às amostras 8 μL do tampão de carregamento (formamida 98%, EDTA 10,0 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002% e xilene cianol 0,002%). Em seguida as amostras foram desnaturadas a 94°C por 5 minutos e imediatamente colocados no gelo. Após essa etapa, 10 μL da amostra foram aplicados no gel e a eletroforese foi realizada durante 4 horas e 15 minutos com potência de 80W.

2.2.8.6 Revelação dos géis

A revelação dos géis foi realizada conforme protocolo descrito por Crestes, Tulmann Neto, Figueira (2001), com nitrato de prata. A coloração dos géis, realizada dentro de bandejas plásticas sob agitação constante, foi realizada da seguinte maneira:

- **Fixação:** 10 minutos em 2 litros de solução fixadora (10% de etanol, 1% de ácido acético);
- **Lavagem:** 1 minuto em 2 litros de água destilada ultra pura;
- **Pré-tratamento:** 3 minutos em 2 litros de ácido nítrico 1,5%;
- **Lavagem:** 1 minuto em 2 litros de água destilada ultra pura;
- **Impregnação:** 20 minutos em 2 litros de prata (AgNO_3) 0,2%;
- **Lavagem:** duas lavagens de 30 segundos em 2 litros de água ultra pura;
- **Revelação:** revelação do gel com 2 litros de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 3% acrescido de 600 μL de formaldeído 0,02%, divididos em duas etapas com 1 litro cada, sendo a primeira o início do aparecimento das bandas e a segunda até obter o padrão de revelação desejado;
- **Bloqueio:** 5 minutos em 2 litros de ácido acético glacial 5% para bloquear a revelação;
- **Lavagem:** 1 minuto em 2 litros de água destilada ultra pura.

Após a revelação os géis foram mantidos em temperatura ambiente para secar e a leitura das bandas foi realizada manualmente.

2.2.9 Análise dos dados

Os perfis de bandas obtidos pelo RAPD e AFLP foram transformados em variáveis binárias, ou seja, o número 1 significou presença de banda e o número 0 ausência de banda. A matriz resultante, constituída dos perfis gerados pelos iniciadores utilizados, foi analisada pelo programa NTSYSpc 2.01e Copyright (c) 1986-1997 (Applied Biostatistics Inc.), no qual foi calculada a matriz de similaridade por meio do

coeficiente de Jaccard. O programa utilizou os dados da matriz de similaridade para a construção do dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) de agrupamento hierárquico. Os valores de *bootstrap* foram calculados por meio do programa *Winboot Bootstrapping for Binary Data PHYLIP* Copyright © 1986-1991, *University of Washington*. O dendrograma agrupou os isolados de acordo com o nível de similaridade genética entre eles. As análises foram feitas de maneira separada para as técnicas de RAPD e AFLP.

2.2.10 Identificação por perfis de ácidos graxos de membranas celulares (MIDI-FAME)

Os isolados foram inoculados em meio TSBA[®]BBL pelo método das estrias cruzadas e incubados a 28°C por 24 horas. Decorrido este tempo, foi coletado 40 mg (6 alças com capacidade de 10 mg) do terceiro quadrante da placa e transferidas para tubos Kimax (100 x 13mm). Foi adicionado 1 mL do reagente de saponificação, agitado por 10 segundos e incubado em banho-maria (95-100°C) por 5 minutos. Em seguida os tubos foram resfriados em água e novamente agitados por 10 segundos, retornando ao banho-maria por mais 25 minutos.

Após resfriamento em água, foram adicionados 2 mL do reagente de metilação e os tubos agitados por 10 segundos e colocados em banho-maria 80°C por mais 10 minutos seguido por resfriamento em água. Foi adicionado nessa solução 1,25 mL do reagente de extração e posteriormente levado ao rotador clínico (FISHER M346) por 10 minutos. Com o auxílio de pipetas Pasteur, foi descartada a fase inferior (aquosa) e adicionado ao tubo 3 mL do reagente de lavagem básica, retornando os tubos para o rotador clínico por mais 5 minutos. Ao fim deste tempo, os tubos foram centrifugados a 2000g por 3 minutos, quando 2/3 da fase superior (0,5 mL) foi transferido para os frascos de cromatografia (2 mL). Os dados obtidos foram organizados em um cromatograma e a identificação foi realizada pelo método *Microbial Identification System software* (*Sherlock TSBA40 library; MIDI Inc., Newark, DE, USA*).

2.2.11 Sequenciamento e análise do gene 16S rRNA

Os produtos da amplificação do gene 16S rRNA foram sequenciados no Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (IB/USP). Para tanto, os produtos de PCR foram purificados com polietileno glicol (PEG 8000 20%; NaCl 2,5 mM) e submetidos ao sequenciamento parcial e total, para alguns isolados. Visando o sequenciamento completo do gene 16S rRNA, foram utilizados os iniciadores propostos por Thompson et al. (2001), apresentados na Tabela 5.

As sequências obtidas foram comparadas por BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) contra a base de dados do NCBI (*Nacional Center of Biotechnology Information Website*). O alinhamento das sequências e a análise fenética foram conduzidos no programa MEGA 4.0.1 (TAMURA et al., 2007), e o agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Máxima Parcimônia* (MP) com *bootstrap* para 1000 replicatas.

Tabela 5 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16S rRNA

Nome	Posição correspondente em <i>Escherichia coli</i>	Sequência (5' – 3')
16F358	339 – 538	5'CTCCTACGGGAGGCAGT3'
16F536	519 – 536	5'CAGCAGCCGCGGTAATAC3'
16F926	908 – 926	5'AACTCAAAGGAATTGACGG3'
16R339	358 – 339	5'ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG3'
16R519	536 – 519	5'GTATTACCGCGGCTGCTG3'
16R1093	1112 – 1093	5'GTTGCGCTCGTTGCGGGACT3'

2.2.12 Enzimas extracelulares (API-ZYM)

O sistema API-ZYM (*BioMérieux AS* – França) foi utilizado, de acordo com as instruções do fabricante, para avaliar a atividade enzimática dos isolados endofíticos de

citros. Tais isolados foram cultivados em 5 ml de meio TSB a 28°C por 36 horas. As células presentes em 1,5 mL deste cultivo foram peletizadas por centrifugação por 1 minuto a 10.000g. Foi preparada uma suspensão de densidade óptica determinada (5-6 de McFarland) em API *Suspension Medium* (2 mL).

O sistema é constituído por uma galeria plástica contendo 19 “poços” ou locais de reação, cada qual com um substrato diferente (Tabela 6). Em cada orifício foram colocados 65 µL da suspensão em cada “poço” e o kit foi incubado a 37°C durante 4 horas, sendo utilizados 2 kits por isolado. Após a incubação, foram adicionados 60 µL de cada reagente Zym A e Zym B aos “poços” e foi deixado reagir por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os kits foram mantidos sob luz fluorescente para serem feitas as avaliações das colorações produzidas.

Foram atribuídos valores de 0 (zero) a 5, conforme carta de cores fornecida pelo fabricante, a cada “poço”. A nota 0 (zero), 1 e 2 corresponde à ausência de reação e as notas 3, 4 e 5 representam reação positiva. A coloração do produto resultante é um indicativo da atividade enzimática enquanto que a intensidade da coloração quantifica o produto formado.

Tabela 6 - Enzimas extracelulares avaliadas pelo teste API-ZYM, com os respectivos números de identificação e os substratos

(continua)

Nº	Enzima	Substrato	Reação Positiva
1	Controle	-	-
2	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato	Violeta
3	Esterase (C4)	2-naftil butirato	Violeta
4	Esterase lipase (C8)	2-naftil caprilato	Violeta
5	Lipase (C14)	2-naftil miristato	Violeta
6	Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida	Laranja
7	Valine arilamidase	L-valil-2-naftilamida	Laranja
8	Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftilamida	Laranja
9	Tripsina	N-benzol-DL-arginina-2-naftilamida	Laranja

Tabela 6 - Enzimas extracelulares avaliadas pelo teste API-ZYM, com os respectivos números de identificação e os substratos

(conclusão)

Nº	Enzima	Substrato	Reação Positiva
10	α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	Laranja
11	Fosfatase ácida	2-naftil fosfato	Violeta
12	Naftol-AS-BI-Fosfohidrolase	Naftol-AS-BI-fosfato	Azul
13	α -galactosidase	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosida	Violeta
14	β -galactosidase	2-naftil- β D-galactopiranosida	Violeta
15	β -glucuronidase	Naftol-AS-BI- β D-glucuronida	Azul
16	α -glucosidase	2-naftil- α D-glucopiranosida	Violeta
17	β -glucosidase	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosida	Violeta
18	N-acetil- β -glucosaminidase	1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminida	Castanho
19	α -manosidase	6-Br-2-naftil- α D-manopiranosida	Violeta
20	α -fucosidase	2-naftil- α L-fucopiranosida	Violeta

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Caracterização dos isolados endofíticos de citros

Os experimentos comparando o crescimento e coloração das colônias mostraram que os isolados endofíticos de citros apresentaram uma coloração variando de alaranjado a róseo; ao passo que os fitopatogênicos e demais isolados apresentaram coloração creme amarelada. No meio SPW modificado a coloração das colônias foi

mais intensa e brilhante do que nas placas contendo meio para *Corynebacterium* (Figura 1).

A variabilidade na coloração das colônias das diferentes espécies e patovares do gênero *Curtobacterium* já foi observada em outros trabalhos, com predominância de coloração creme amarelada para isolados fitopatogênicos (AIZAWA et al., 2007; BEHRENDT et al., 2002; CHEN et al., 2007; KIM et al., 2008).

Jacobs e Sundin (2001) e Sundin e Jacobs (1999) demonstraram que isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* que apresentavam coloração roseada e alaranjada eram altamente tolerantes à radiação ultra-violeta UV-B, o que facilitaria, em tese, um eventual emprego destes microrganismos para aplicação em campo para controle biológico.

No teste realizado para avaliar a produção de pigmentos pelos isolados endofíticos de citros, no meio de Burkholder, não foi possível verificar a presença do pigmento roxo durante o período de observação de 5 dias. Esse fato indica que todos os isolados avaliados não pertencem à variedade *violaceum*, de *Corynebacterium flaccumfaciens*, concordando com resultados obtidos por Maringoni (2000).

Com relação ao teste realizado para avaliar o crescimento em meio D2, seletivo para *Corynebacterium*, os resultados mostram que apenas cerca de 71% das linhagens cresceram, mostrando que este meio D2 não pode ser utilizado como seletivo para isolados de citros.

Figura 1 - Aspecto das colônias dos isolados endofíticos de citros (sem setas), eucaliptos (seta branca), e fitopatogênicos (setas negras). **A:** em meio de *Corynebacterium*; **B:** em meio SPW modificado

2.3.2 Teste de patogenicidade

Para realização do teste de patogenicidade dos isolados endofíticos de citros foi escolhida a cultura do feijoeiro, por se tratar da interação planta-patógeno mais importante para o gênero *Curtobacterium* (MARINGONI; ROSA, 1997), na qual a doença é conhecida como Murcha-de-Curtobacterium. Os resultados obtidos pelo teste de patogenicidade demonstram que os isolados endofíticos de citros não causam sintomas de murcha no feijoeiro. Os sintomas foram observados apenas no controle positivo inoculado com o isolado Feij-2634, onde seis plantas receberam a nota 9, duas receberam nota 7 e apenas uma recebeu nota 2, no total das nove plantas avaliadas entre as três repetições. Esse resultado indica que os isolados endofíticos de citros não são fitopatogênicos à cultura do feijoeiro, que apresenta com fitopatógeno bactérias pertenceriam à espécie *C. f. pv. flaccumfaciens* (Figura 2).

Este resultado não garante que tais isolados endofíticos de citros não sejam fitopatogênicos para as demais culturas conhecidas como hospedeiras de bactérias do gênero *Curtobacterium*, visto que a patogênese é uma relação bactéria-planta específica (DYE et al., 1980). Chen et al. (2007) observaram, ao descrever o novo patovar *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola*, que a bactéria não foi capaz de desenvolver sintomas da doença em tulipa e feijão, sendo caracterizada como fitopatogênica apenas para a cultura da beterraba.

2.3.3 Caracterização dos isolados por ARDRA

A reação de amplificação do gene 16S rRNA com os iniciadores PO27F e R1387 foi positiva para todos os isolados analisados, gerando um fragmento entorno de 1350 pares de base. A análise da variabilidade dos isolados por meio da técnica de ARDRA, obtida pelos produtos de clivagens com as quatro enzimas de restrição, geraram um total de oito padrões de bandas (Figura 3). Os perfis de restrição, que foram observados em gel de agarose, permitiram agrupar os isolados em 4 ribotipos (Tabela 7).

Figura 2 - Teste de patogenicidade dos isolados endofíticos de citros para avaliar sua capacidade de causar sintomas da doença murcha-de-curatobacterium em feijoeiro. Em **A**, planta testemunha inoculada com água destilada autoclavada; em **B**, inoculadas com isolado endofítico de citros ER 1/6 e fitopatogênico Feij-2634; em **C**, inoculada com isolado fitopatogênico Feij-2634; em **D**, comparação dos três tratamentos anteriores

Figura 3 - Eletroforese para visualização do padrão de clivagem do produto de PCR do gene 16S rRNA com enzimas de restrição. **1)** marcador molecular ladder 100pb; **2)** PCR sem clivar; **3)** *TaqI*; **4)** *AluI*; **5-8)** *MboI*, sendo colunas 5, 6 e 7 endófitos, e coluna 8 fitopatógenos; **9-10)** *HhaI*, sendo coluna 9 endófitos e coluna 10 fitopatógenos

A clivagem com as enzimas *TaqI* e *AluI* geraram um único padrão de bandas para os todos os isolados, não permitindo a diferenciação entre eles. A clivagem com a enzima *HhaI* gerou dois padrões de bandas característicos, um para isolados endofíticos e outro para fitopatogênicos, permitindo sua diferenciação. Já a clivagem com a enzima *MboI* gerou a formação de quatro padrões, sendo três para a população endofítica e um para a fitopatogênica, permitindo a diferenciação entre estes dois grupos de isolados.

Embora não seja o foco do trabalho, pode ser observado que a diversidade dos isolados endofíticos de citros está associada ao tipo de planta hospedeira, visto que o ribotipo A é composto por 4 isolados endofíticos de laranja doce provenientes de plantas com sintomas da CVC, causada por *Xylella fastidiosa*. No ribotipo B pode ser observado os isolados endofíticos de ponkan (plantas não hospedeira da *X. fastidiosa*), além dos demais isolados endofíticos de laranja doce provenientes de plantas com sintomas da CVC. Todos os isolados endofíticos de laranja doce provenientes de plantas sem sintoma da CVC, mas com a presença de *X. fastidiosa*, e isolados de plantas de pomares saudáveis foram agrupados no ribotipo C, além dos isolados de eucaliptos, trevo e *Bouteloua curtipendula*. Todos os isolados fitopatogênicos ficaram agrupados no ribotipo D.

Poucos são os trabalhos que analisaram a variabilidade genética de linhagens do gênero *Curtobacterium*. Estudos nessa linha revelaram alta diversidade genética quando caracterizadas por serologia e rep-PCR (MCDONALD; WONG, 2000) e por produção e sensibilidade à bacteriocinas (MARINGONI; KUROZAWA, 2002). Entretanto, Guimarães et al. (2001) e Tegli, Sereni e Surico (2002) afirmaram que há pouquíssima diferença entre o código genético do gene 16S rRNA, região conservada do genoma, entre os patovares de *Curtobacterium flaccumfaciens*. No trabalho realizado por Behrendt et al. (2002) também foi observado alta similaridade dessa região entre os patovares quando clivados com enzimas de restrição. Além disso, os autores sugerem que diferentes padrões gerados por clivagem com enzimas de restrição para essa região corresponderiam a outras espécies. Isso permitiria sugerir que os diferentes padrões obtidos no presente trabalho, poderiam corresponder a espécies diferentes.

Tabela 7 - Ribotipos formados a partir da clivagem dos produtos de PCR do gene 16S rRNA com as enzimas de restrição

Ribotipos / Isolados ⁽¹⁾	Hospedeiros	Hábitos
A		
AR 1/2, AR 1.4/7, AR 1.4/11, AR 4/15	Laranja doce	Endófito
B		
AF 2/5, AF 2/7, AR 1.5/3, AR 4/6	Laranja doce	Endófito
PR 1.1/8, PR 1/10, PR 1/11, PR 1/8, PR 2/2, PR 2/3, PR 3/2, PR 4/3, PR 1.4/8, PR 1.4/1	Ponkan	
C		
EF 1/6, SF 2/17, ER 1/6, ER 1.4/2, ER 1.4/8, ER 1/5, ER 1/7, ER 1/9, ER 1/11, ER 4/15, SR 1/6, SR 1/8, SR 1.3/6, SR 1.4/9, SR 2/1, SR 3/8, SR 3/13, SR 3/19, SR 3/21, SR 4/1, SR 4/7, SR 4/8	Laranja doce	Endófito
CA 1, CA 2, CA 3, CA 4, CA 5	Trevo	
SG041	<i>Bouteloua curtipendula</i> (gramínea)	
Gal ₂ , CbIII ₂	Eucaliptos	
D		
IPO 237, IPO 238, 1290, 1336, 1337	Feijão	Fitopatogênica
315	Beterraba	
20035C, 2A-Lt, 2344	Soja	
CB101	Beterraba	
CO101	Tulipa	
Feij-2500, Feij-2502, Feij-2634, Feij-2910, Feij-2912	Feijão	

⁽¹⁾ Endofíticos de citros com iniciais AR e AF foram isolados de ramos e folhas, respectivamente, de plantas com sintomas da CVC; iniciais ER e EF, isolados de ramos e folhas, respectivamente, de plantas com *Xylella fastidiosa*, mas sem sintomas da CVC; iniciais SR e SF, isolados de ramos e folhas, respectivamente, de plantas de pomares saudáveis.

2.3.4 Caracterização dos isolados por RAPD e AFLP

A análise da variabilidade dos isolados por meio da técnica de RAPD obtida pelo uso dos 5 iniciadores revelou um total de 71 bandas, sendo que 8 foram monomórficas, onde o tamanho das bandas variou entre 300 a 2500 pb. De acordo com o dendrograma foi possível verificar a formação de 5 grupos distintos a 54% de similaridade (Figura 4). O grupo 1 a 4 incluiu os isolados de citros, enquanto o grupo 5 foi constituído por isolados fitopatogênicos, mostrando variabilidade intra-grupo em função de pertencerem a patovares diferentes. Estes resultados indicam que os isolados fitopatogênicos são diferentes geneticamente dos isolados endofíticos de forma geral, considerando que os isolados endofíticos de citros apresentam variabilidade genética intra-grupo, sugerindo que possa existir mais de uma comunidade destes isolados colonizando endofiticamente plantas de citros.

O dendrograma revela a diferença entre os isolados, principalmente entre endofíticos e fitopatogênicos. A correlação com os ribotipos obtidos pelo ARDRA mostra que o ribotipo A ficou agrupado com alguns isolados do ribotipo C, formando o grupo 2. O ribotipo B teve correlação alta com o grupo 1, onde se observa que os isolados de plantas com sintomas da CVC formaram um subgrupo, assim como os isolados de ponkan. Já o ribotipo C, que agrupava isolados endofíticos de diferentes origens, foi separado nos grupos 2, 3 (formado por isolados provenientes de plantas sem sintoma da CVC, mas com a presença de *X. fastidiosa* e isolados de plantas de pomares saudáveis) e 4 (endófitos de eucaliptos). O grupo 5 teve alta correlação com o ribotipo D, onde ficaram agrupados os isolados fitopatogênicos.

A avaliação da variabilidade genética por AFLP obteve uma grande quantidade de fragmentos a partir de 3 combinações de iniciadores. O número médio de fragmentos obtidos por combinação foi de 49, dos quais 44, em média, foram polimórficos. Para a combinação *EcoRI*+A / *MseI*+C, 93,8% (Figura 5) das bandas reproduzíveis foram polimórficas, para a combinação *EcoRI*+C / *MseI*+G, 89,8% (Figura 6) e para a combinação *EcoRI*+A / *MseI*+T, 85,7% (Figura 7).

Ao todo foram avaliados 147 fragmentos, dos quais 15 foram monomórficos. Não foram encontrados isolados 100% similares, indicando a alta variabilidade entre os isolados avaliados. A similaridade genética máxima observada entre isolados foi de 96%, entre os isolados endofíticos de citros PR 2/3 e PR 1.4/1, e a menor foi de 22%, entre o isolado endofítico de laranja doce AR 1/2 e o fitopatogênico de feijão *C. f. pv. flaccumfaciens* Feij-2500.

Os fragmentos gerados foram avaliados por inspeção visual dos géis. O dendrograma gerado por meio da análise do perfil de bandas permitiu estudar a relação genética entre os isolados, descrevendo a formação de, no mínimo, 7 grupos a 52% de similaridade (Figura 8). Foi possível observar a separação dos isolados endofíticos e fitopatogênicos, assim como observado pela técnica de ARDRA e RAPD, em 2 clados diferentes com 30% de similaridade.

No grupo 1 ficaram agrupados isolados endofíticos de laranja doce e todos os de ponkan, confirmando os resultados obtidos pela técnica de RAPD e ARDRA, e novamente houve a formação de dois subgrupos, separando os isolados provenientes de plantas com sintomas da CVC daqueles isolados de ponkan. No grupo 2 e 3 foram observados os isolados endofíticos de laranja doce, resultado também obtido pelo ARDRA e RAPD, provenientes de plantas sem sintoma da CVC, mas com a presença de *X. fastidiosa* e isolados de plantas de pomares saudáveis. O grupo 4 ficou composto por apenas isolados endofíticos de laranja doce provenientes de plantas com sintomas da CVC. Assim como observado pela técnica de RAPD, os isolados endofíticos de eucaliptos ficaram separados no grupo 5, confirmando sua diferença genética em relação aos demais isolados. No grupo 6 encontram-se os demais isolados endofíticos utilizados nesse estudo, no qual foi possível observar diferenças genéticas entre o isolado SG041, isolado da gramínea *Bouteloua curtipendula* e os isolados de trevo. Por

último, foi formado o grupo 7, onde se encontram todos os isolados fitopatogênicos, os quais, assim como verificado pelo RAPD, apresentaram considerável variabilidade genética intra-grupo, podendo ser devido ao fato de terem sido isolados de hospedeiros diferentes e pertencerem a diferentes patovares da espécie *C. flaccumfaciens*.

A técnica de AFLP permitiu uma maior distinção dos isolados avaliados em grupos diferentes quando comparados com as técnicas de ARDRA e RAPD, confirmando seu maior poder de discriminação entre isolados geneticamente correlacionados (MULLER; WOLFENBARGER; 1999).

Estes resultados demonstram que os isolados endofíticos de citros apresentam significativa variabilidade genética em relação aos demais isolados endofíticos avaliados e, principalmente, em relação aos isolados fitopatogênicos utilizados neste estudo, sendo essa diferença verificada pelo baixo valor de similaridade entre eles. Além disso, corroboram a idéia de que os isolados endofíticos de citros formam uma comunidade com variabilidade genética intra-grupo. No geral é possível dizer que as três técnicas de estudo da variabilidade genética utilizadas foram eficientes em detectar a variabilidade genética entre os isolados analisados, principalmente na diferenciação entre os isolados endofíticos e os fitopatogênicos. Guimarães et al. (2003) analisaram a variabilidade genética dos patovares de *C. flaccumfaciens* por meio das técnicas de AFLP, rep-PCR e PFGE e observaram uma correlação positiva entre os perfis e o hospedeiro.

Figura 5 - Eletroforese dos fragmentos AFLP amplificados de representantes de isolados endofíticos e fitopatogênicos com os iniciadores *EcoRI*+A / *MseI*+C. 1= 50pb, 2= ER 1/6, 3= AR 1/2, 4= PR 2/2, 5= Gal2, 6= SG041, 7= CA4, 8= feij-2500, 9= 2344, 10= CB101, 11= IPO 237, 12= 315

Figura 6 - Eletroforese dos fragmentos AFLP amplificados de representantes de isolados endofíticos e fitopatogênicos com os iniciadores *EcoRI*+C / *MseI*+G. 1= Gal2, 2= SG041, 3= CA4, 4= ER 1/6, 5= AR 1/2, 6= PR 2/2, 7= feij-2500, 8= 2344, 9= CB101, 10= IPO 237, 11= 315, 12= 50pb

Figura 7 - Eletroforese dos fragmentos AFLP amplificados de representantes de isolados endofíticos e fitopatogênicos com os iniciadores *EcoRI*+A / *MseI*+T. 1= 50pb, 2= GaI2, 3= SG041, 4= CA4, 5= ER 1/6, 6= AR 1/2, 7= PR 2/2, 8= feij-2500, 9= 2344, 10= CB101, 11= IPO 237, 12= 315

Figura 8 - Dendrograma obtido pela análise de AFLP. A similaridade genética entre os isolados foi estimada pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento fenético pelo método UPGMA. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap*, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores superiores a 50%

2.3.5 Perfis de Ácidos Graxos de Membranas Celulares (MIDI-FAME)

Baseado nos resultados obtidos pelas técnicas de RAPD e AFLP, 8 isolados endofíticos de citros foram selecionado para identificação por cromatografia gasosa de ácidos graxos (MIDI-FAME). Os isolados foram identificados com valores de similaridade variando de 0,759 até 0,898 com a base de dados TSBA40 (Tabela 8). A identificação por FAME, ao nível de espécies, é considerável confiável para valores de similaridade superiores a 0,70, enquanto que valores menores podem ser utilizados para agrupar isolados em níveis taxonômicos superiores, como gênero ou família (HEYRMAN et al., 1999).

Tabela 8 - Identificação dos isolados endofíticos de citros representativos dos grupos obtidos pelas técnicas de ARDRA, RAPD, AFLP e por perfil de ácidos graxos (FAME)

Isolados	Espécies	ARDRA	RAPD	AFLP	Similaridade
AF 2/5	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	B	1	1	0,763
PR 2/2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	B	1	1	0,834
AR 1/2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae/oortii</i>	A	2	4	0,813
SR 1/6	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	C	2	3	0,776
ER 1/5	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	C	2	3	0,871
ER 1/6	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	C	3	2	0,898
EF 1/6	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	C	3	2	0,764
SF 2/17	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	C	3	3	0,750

Apesar de todos os isolados analisados terem sido identificados como pertencentes à espécie *Curtobacterium flaccumfaciens*, deve-se levar em consideração a limitação inerente de qualquer técnica quando utilizada individualmente, principalmente em relação à base de dados de referência para bactérias do gênero

Curtobacterium, uma vez que os resultados apresentados até aqui indicam que os isolados endofíticos de citros são geneticamente diferentes das espécies descritas no gênero *Curtobacterium*. Neste contexto, Zinniel et al. (2002) isolaram a bactéria endofítica SG041 da gramínea *Bouteloua curtipendula* e não conseguiram chegar a um consenso sobre sua identificação ao nível de espécie, ficando identificada apenas como *Curtobacterium* sp., devido ao fato de que cada método que eles utilizaram, apresentaram resultados divergentes: Ácidos graxos (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*), fontes de carbono (*Curtobacterium citreum*) e sequenciamento do gene 16S rRNA (*Curtobacterium luteum*).

A análise dos ácidos graxos revelaram que o C_{15:0} antiso, C_{17:0} antiso e C_{16:0} iso (Tabela 9) estão presentes em maior concentração em todos os isolados. Este perfil de ácidos graxos é comum em membros do gênero *Curtobacterium* e *Rathayibacter* (BEHRENDT et al., 2002; KIM et al., 2008).

Tabela 9 - Perfil dos principais ácidos graxos presentes nos 8 isolados endofíticos de citros analisados

Isolados	Porcentagem dos ácidos graxos totais		
	C _{15:0} antiso	C _{17:0} antiso	C _{16:0} iso
AF 2/5	42,96	33,81	8,89
PR 2/2	45,05	30,97	10,70
AR1/2	45,54	29,25	10,45
SR 1/6	46,41	29,19	9,74
ER 1/5	45,18	32,68	8,68
ER 1/6	48,01	30,64	7,48
EF 1/6	50,88	17,69	12,12
SF 2/17	45,86	33,53	9,39

2.3.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Todos os isolados que foram selecionados para identificação por ácidos graxos também tiveram seu gene 16S rRNA 1030pb completamente sequenciados. Para a construção da árvore fenética foram utilizadas sequências de linhagens tipo do gênero *Curtobacterium* e *Rathayibacter*, uma vez que o perfil de ácidos graxos são similares, e como grupo externo foi utilizado a sequência do gene 16S rRNA da bactéria *Clavibacter michiganense* DSM 46364 (X77435), disponíveis na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

De acordo com a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, foi observado a formação de dois grandes grupos, um constituído pelos isolados pertencentes ao gênero *Curtobacterium* e outro ao gênero *Rathayibacter* (Figura 9).

O dendrograma (*neighbour-joining*) mostrou que os isolados endofíticos de citros pertencem ao gênero *Curtobacterium* na família Microbacteriaceae. Um alto valor de similaridade ($\geq 98.3\%$) foi observado com o alinhamento das sequências de 1030 pb do gene 16S rRNA entre todas as espécies de *Curtobacterium* avaliadas.

A similaridade entre as subespécies de *C. flaccumfaciens* foi $\geq 99.9\%$. O mesmo valor de similaridade foi observado entre isolados endofíticos de citros, sugerindo que estes isolados de citros pertencem a um mesmo genótipo. A similaridade entre os isolados endofíticos de citros e as subespécies de *C. flaccumfaciens* foi $\leq 99.4\%$, enquanto a similaridade entre as mesmas subespécies e *C. luteum* foi de $\geq 99.9\%$. A similaridade entre *C. flaccumfaciens* e *C. albidum*, *C. ammoniigenes*, *C. citreum*, *C. herbarum* e *C. pusillum* foi $\geq 99.6\%$ e *C. ginsengisoli* foi 98.6%. Entretanto, a similaridade entre isolados endofíticos de citros e as linhagens tipo destas espécies foi $\leq 99.7\%$ com *C. albidum*, *C. citreum* e *C. pusillum*, $\leq 99.3\%$ com *C. luteum*, $\leq 99.1\%$ com *C. herbarum* e *C. ammoniigenes* e $\leq 98.4\%$ com *C. ginsengisoli*. Embora os isolados endofíticos de citros tenham apresentado alto valor de similaridade na sequência do gene 16S rRNA permitindo incluí-los no gênero *Curtobacterium*, foram agrupados separadamente dos demais avaliados, indicado que podem pertencer a um genótipo diferente dentro do gênero. A confiabilidade destes agrupamentos pode ser confirmada pelos elevados valores de *bootstrap*. A descrição destes isolados endofíticos de citros

como uma nova espécie ou subespécies poderá ser possível com a utilização de técnicas como hibridização DNA-DNA, que de acordo com Stackebrandt e Goebel (1994) deve ser realizada para tal finalidade em situações como a observada neste estudo.

Figura 9 - Dendrograma (*neighbour-joining*) baseado na comparação das sequências completas do gene 16S rRNA dos endófitos de citros com as sequências de linhagens tipo do gênero *Rathayibacter* e *Curtobacterium*, incluindo patovares deste último, disponíveis no banco de dados. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap*, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores superiores a 50%. A sequência da bactéria *Clavibacter michiganense* DSM 46364 (X77435) foi utilizada como grupo externo

2.3.7 Atividade enzimática (API-ZYM)

O sistema API-ZYM, empregado em estudos de diversidade e caracterização microbiana, foi utilizado para caracterização da atividade de 19 enzimas extracelulares.

Os isolados endofíticos de citros, representativos de sua diversidade genética, foram analisados pelo sistema API-ZYM e apresentaram em média 8,25 reações positivas aos substratos testados, conforme Tabela 10.

A análise enzimática mostrou homogeneidade de padrão enzimático entre os isolados avaliados. Todos os isolados apresentaram, com variações na intensidade da coloração, atividade para as seguintes enzimas: leucina arilamidase, α -galactosidase, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetil- β -glucosaminidase e α -manosidase. Entretanto, as enzimas fosfatase alcalina, Lipase (C14), tripsina, α -quimotripsina, Naftol-AS-BI-Fosfohidrolase, β -glucuronidase e α -fucosidase não reagiram para nenhum dos isolados avaliados. Aizawa et al. (2007), Funke, Aravena-Roman e Frodl (2005), Kim et al. (2008) e Palomo et al. (2006) encontraram padrão de atividade semelhantes, ao estudarem diferentes espécies do gênero *Curtobacterium*, corroborando para inclusão dos isolados endofíticos de citros dentro deste gênero, porém diferenciando-os das espécies já descritas.

Os isolados ER 1/6, AF 2/5, e ER 1/5 foram os que mais apresentaram reações positivas. Nestes isolados foram detectadas 9 enzimas das 19 testadas, sendo elas: Esterase lipase (C8) e Cistina arilamidase, Esterase (C4) e fosfatase ácida, Esterase (C4) e Valine arilamidase, respectivamente. Os isolados AR 1/2, EF 1/6 e PR 2/2, apresentaram como enzima extra a Esterase lipase (C8), fosfatase ácida e Cistina arilamidase, respectivamente. Os únicos isolados que apresentaram produção apenas para as 7 enzimas comuns a todos foram SF 2/17 e SR 1/6.

Os resultados observados neste trabalho indicam que este sistema pode ser utilizado para a verificação do potencial enzimático de bactérias endofíticas, como uma análise complementar para a caracterização de isolados.

Tabela 10 - Avaliação das atividades enzimáticas pelo teste API-ZYM de isolados endofíticos de citros

Enzimas	Isolados							
	ER 1/6	AF 2/5	AR 1/2	EF 1/6	PR 2/2	SF 2/17	SR 1/6	ER 1/5
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatase alcalina	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterase (C4)	-	+	-	-	+	-	-	+
Esterase lipase (C8)	+	-	+	-	-	-	-	-
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucina arilamidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine arilamidase	-	-	-	-	-	-	-	+
Cistina arilamidase	+	-	-	-	+	-	-	-
Tripsina	-	-	-	-	-	-	-	-
α -quimotripsina	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatase ácida	-	+	-	+	-	-	-	-
Naftol-AS-BI-Fosfohidrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
α -galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+
β -galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	+
β -glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil- β -glucosaminidase	+	+	+	+	+	+	+	+
α -manosidase	+	+	+	+	+	+	+	+
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-

- = sem atividade (coloração igual ao controle, notas 0, 1 e 2); + = reações positivas (notas 3, 4 ou 5)

3 CONCLUSÕES

No presente trabalho, as técnicas utilizadas para avaliar a diversidade genética dos isolados do gênero *Curtobacterium* revelaram ser eficientes, com diferentes níveis de resolução, na detecção da variabilidade entre isolados endofíticos de citros e, principalmente, entre isolados endofíticos e fitopatogênicos. Em função dos resultados obtidos conclui-se que:

- Os isolados endofíticos de citros apresentaram coloração diferenciada em relação aos demais isolados avaliados;
- Os isolados endofíticos de citros não foram capazes de causar doença na cultura do feijoeiro;
- As técnicas de ARDRA, RAPD e AFLP foram capazes de detectar a variabilidade genética existente dentro do grupo de isolados de citros, discriminando-os dos demais isolados endofíticos e, principalmente, dos fitopatogênicos.
- De acordo a análise pode-se concluir que os isolados endofíticos de citros pertencem ao gênero *Curtobacterium*, porém a análise destas sequências sugere que tais isolados podem pertencer a uma espécie ou subespécie nova.

REFERÊNCIAS

- AIZAWA, T.; VE, N.B.; KIMOTO, K.; IWABUCHI, N.; SUMIDA, H.; HASEGAWA, I.; SASAKI, S.; TAMURA, T.; KUDO, T.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Curtobacterium ammoniigenes* sp. nov., an ammonia-producing bacterium isolated from plants inhabiting acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 57, p. 1447–1452, 2007.
- ALTINDAG, M.; SAHIN, M.; ESITKEN, A.; ERCISLI, S.; GULERYUZ, M.; DONMEZ, M.F.; SAHIN, F. Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholdria*, and *Pseudomonas* application under *in vitro* and *in vivo* conditions. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 369–372, 2006.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada as plantas**. 2007. 201 p. (Tese de Doutorado, Genética e melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- 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 Microbiology**, Ottawa, v. 52, n. 5, p. 419–426, 2006.
- ARAÚJO, W.L. **A comunidade bacteriana endofítica de citrus e sua interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citrus (CVC)**. 2000. 131p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.J.; 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, W.J.; 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 plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906–4914, 2002.

AVROVA, A.O.; HYMAN, L.J.; TOTH, R.L.; TOTH, I.K. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1499-1508, 2002.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. chap. 6, p. 189-207.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI Jr., W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA – Meio Ambiente, 2000. cap. 3, p. 57-93.

BAIK, K.S.; PARK, S.C.; KIM, E.M.; BAE, K.S.; ANN, J.H.; KA, J.O.; CHUN, J.; SEONG, C.N. Diversity of bacterial community in freshwater of Woopo wetland. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 46, n. 6, p. 647-655, 2008.

BEHRENDT, U.; ULRICH, A.; SCHUMANN, P.; NAUMANN, D.; SUZUKI, K. Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 52, p. 1441-1454, 2002.

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.

CARLSON, R.R.; VIDAVER, A.K. Taxonomy of *Corynebacterium* plant-pathogens, including new pathogen of wheat, based on polyacrylamide-gel electrophoresis of cellular proteins. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 315-326, 1982.

CHEN, Y.F.; GUO, J.H.; GUO, Y.H.; ZHANG, X.M.; GE, Y.Y. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola* pv. nov., a new pathovar of pathogen on sugar beet. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 6, p. 677-684, 2007.

CHENEY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121-128, 2000.

COLLINS, M.D.; BRADBURY, J.F. The Genera *Agromyces*, *Aureobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, and *Microbacterium*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community**. New York: Springer-Verlag, 1999. p. 1355-1368.

COLLINS, M.D.; JONES, D. Reclassification of *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 129, p. 3545-3548, 1983.

COLLINS, M.D.; JONES, D.; KROPPENSTEDT, R.M. Reclassification of *Corynebacterium ilicis* (Mandel, Guba & Litsky) in the genus *Arthrobacter*, as *Arthrobacter ilicis* comb. nov. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Abt. 1 Originale**, Stuttgart, v. 2, p. 318-323, 1981.

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

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; AIT BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1685-1693, 2004.

CRESTES, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, Ottawa, v. 19, p. 299-306, 2001.

DAVIS, M.J.; GILLAPIRJR, A.G.; VIDAVER, A.K.; HARRIS, R.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* sp. nov, subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *Cynidontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 34, n. 2, p. 107-117, 1984.

DONAT, V.; BIOSCA, E.G.; PEÑALVER, J.; LÓPEZ, M.M. Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 5, p. 1639-1649, 2007.

DYE, D. W.; KEMP, W.J. A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 20, n. 4, p. 563-582, 1977.

DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOTT, R.A.; SCHROTH, M.N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Review of Plant Pathology**, Kew, v. 59, p. 153-168, 1980.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SUZUKI, H.; SATO, Y.I.; MORISAKI, H.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 46, p. 617-629, 2000.

ESTRADA, K.R.F.S. **Caracterização enzimática de fungos ectomicorrizicos e o envolvimento de enzimas celulolíticas na simbiose *Eucalyptus urophylla* – *Pisolithus tinctorius***. 1997. 135p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

FEBERWEE, A.; DIJKSTRA, J.R.; WYSMULLER, V.B.; GIELKENS, A.L.J.; WAGENAAR, J.A. Genotyping of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis and digitalized Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1-2, p. 125-131, 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220p.

FUNKE, G.; ARAVENA-ROMAN, M.; FRODL, R. First Description of *Curtobacterium* spp. Isolated from Human Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 1032–1036, 2005.

GONZALEZ, C.; RESTREPO, S.; TOHME, J.; VERDIER, V. Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 215, p. 23-31, 2002.

GOODFELLOW, M. Reclassification of *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson in the genus *Rhodococcus* as a *Rhodococcus fascians* comb. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 5, p. 225-229, 1984.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL; A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUIMARÃES, P.M.; SMITH, J.J.; PALMANO, S.; SADDLER, G.S. Characterization of *Curtobacterium flaccumfaciens* pathovars by AFLP, rep-PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 817–825, 2003.

GUIMARÃES, P.M.; PALMANO, S.; SMITH, J.J.; DE SA, M.F.G.; SADDLER, G.S. Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 80, p. 1-10, 2001.

GUO, J.H.; GUO, Y.H.; ZHANG, X.M.; GE, Y.Y. ***Clavibacter fangii* sp. nov., a new speices of pathogen in wheat.** Unpublished, NCBI, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=30523345>. Acesso em: 08 jan. 2009.

GUPTA, V.S.; RAJEBHOSALE, M.D.; SODHI, M.; SINGH, S.; GNANAMANICKAM, S.S.; DHALIWAL, H.S.; RANJEKAR, P.K. Assessment of genetic variability and strain identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* using RAPD-PCR and IS1112-based PCR. **Current Science**, Bangalore, v. 80, n. 8, p.1043-1049, 2001.

GURTNER C. S.; PINAR G.; LUBITZ W.; ROLLEKE S. An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 45, p. 77–87, 2001.

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

HERBES, D.H.; THEODORO, G.F.; MARINGONI, A.C.; DAL PIVA, C.A.; ABREU, A. Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro produzidos em Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 153-156, 2008.

HESAMI, S.; ALLEN, K.J.; METCALF, D.; OSTLAND, V.E.; MACINNES, J.I.; LUMSDEN, J.S. Phenotypic and genotypic analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Ontario salmonids with bacterial coldwater disease. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 54, n. 8, p. 619-629, 2008.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HEYNDRIX, M.; VAUTERIN, L.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K.; VOS, P. D. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 26, p. 247-259, 1996.

HEYRMAN, J.; MERGAERT, J.; DENYS, R.; SWINGS, J. The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 181, p. 55–62, 1999.

HIRATA, R. JR.; PEREIRA, G.A.; FILARDY, A.A.; GOMES, D.L.; DAMASCO, P.V.; ROSA, A.C.; NAGAO, P.E.; PIMENTA, F.P.; MATTOS-GUARALDI, A.L. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 11, p. 986-991, 2008.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 1078-1085, 2004.

JACOBS, J.L.; SUNDIN, G.W. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5488-5496, 2001.

JOHN, U.; GROBEN, R.; BESZTERI, B.; MEDLIN, L. Utility of Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) to Analyse Genetic Structures within the *Alexandrium tamarense* Species Complex. **Protist**, Jena, v. 155, p. 169–179, 2004.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; DAMODARAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; SAMIYAPPAN, R. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1087-1098, 2007.

KIM, M.K.; KIM, Y.J.; KIM, H.B.; KIM, S.Y.; YI, T.H.; YANG, .D.C. *Curtobacterium ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2393–2397, 2008.

KOBAYASHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: BACON, C.W.; HITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. Washington: Marcel Dekker, 2000. p. 199-233.

KOMAGATA, K.; SUZUKI, K. Genus *Curtobacterium* Yamada & Komagata 1972. In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1313-1317.

KOZDRÓJ, J.; TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1775–1784, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, The Hague, v. 273, p. 91-99, 2005.

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

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI Jr., W.; AZEVEDO, J.L. RAPD profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*, causal agente of citrus variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 302-306, 2001.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI Jr., 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, n. 1, p. 55-59, 2004.

LACAVA, P.T.; LI, W.B.; ARAUJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; HARTUNG, J.S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 535-541, 2006.

LEI, X.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia species* grown in temperate region of China. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 190, n. 6, p. 657-671, 2008.

LEITE Jr., R.P.; MENEGUIM, L.; BEHLAU, F.; RODRIGUES, S.R.; BIANCHINI, A. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 300-301, 2001.

LIN, J.J.; KUO, J.; MA, J. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. **Nucleic Acids Research**, London, v. 24, p. 3649-3650, 1996.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

LU, Z.H.; PENG, H.H.; CAO, W.; TATSUMI, E.; LI, L.T. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria and yeasts from sour Mifen, a traditional fermented rice noodle from China. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, n. 3, p. 893-903, 2008.

LUVITTO, D.M. **Caracterização fisiológica e Molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar**. 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MAHAFFEE, W.F.; KLOEPFER, 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. (Ed.). **Improving plant productivity un rhizosphere bacteria**. Melbourne: CSIRO, 1997. p. 180.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; NAKASHIMA, H. Endophyte transmission via seeds of *Lolium perenne* L.: immunodetection of fungal antigens. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 534-541, 2004.

MARI, M.; GUIZZARDI, M.; PRATELLA, G.C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v.7, p. 30-37, 1996.

MARINGONI, A.C. **Caracterização de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-*Curtobacterium***. 2000. 73 p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2000.

_____. Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-*Curtobacterium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 157-162, 2002.

MARINGONI, A.C.; KUROSZAWA, C. Tipificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por bacteriocinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 9, p. 1339-1345, 2002.

MARINGONI, A.C.; ROSA, E.F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 23, p. 164-167, 1997.

MARINGONI, A.C.; CAMARA, R.C.; SOUZA, V.L. Semi-selective culture médium for *Curtobacterium flaccumfaciens* isolation from beans seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 34, p. 117-124, 2006.

MASIGA, D.K.; NDUNG'U, K.; TWEEDIE, A.; TAIT, A.; TURNER, C.M.R. *Trypanosoma evansi*: Genetic variability detected using amplified restriction fragment length polymorphism (AFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Kenyan isolates. **Experimental parasitology**, New York, v. 114, n. 3, p. 147-153, 2006.

McDONALD, J.G.; WONG, E. High diversity in *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* characterized by serology and rep-PCR genomic fingerprinting. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 22, p. 17-22, 2000.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 326-335, 2006.

MELO, J.; TOCZYSKL, D. A unified view of the DNA-damage checkpoint. **Current Opinion in Cell Biology**, Amsterdam, v. 14, p. 237-245, 2002.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L.C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO A.M. (Ed.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE, 2007. p. 129-140.

MICHELMORE, R.W.; PARANI, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA**, New York, v. 88, p. 828-982, 1991.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R.; Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 2, p. 105 –114, 2003.

MULLER, U.G.; WOLFENBARGAR, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 14, p. 389-394, 1999.

NARUZAWA, E.S. **Variabilidade genética entre raças de *Podosphaera xanthii* isoladas de cucurbitáceas avaliadas por meio de polimorfismo de DNA**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PALLERONI, N.J. *Pseudomonas* classification – a new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 64, p. 231-251, 1993.

PALOMO, J.L.; LÓPEZ, M.M.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; VELÁZQUEZ, E.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Evaluation of the API 50CH and API ZYM systems for rapid characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, causal agent of potato ring rot. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, p. 443-451, 2006.

PAN, M.J.; RADEMAN, S.; KUNERT, K.; HASTINGS, J.W. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 by the endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, p. 479-486, 1997.

PARK, K.S.; KLOEPPER, J.W. Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Biological Control**, Orlando, v. 18, p. 2-9, 2000.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 179-197.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLEON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P. Essay – the role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews microbiology**, New York, v. 5, n. 5, p. 384-392, 2007.

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.

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

RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, p. 1073-1075, 2000.

RYU, C.M.; KIM, J.; CHOI, O.; KIM, S.H.; PARK, C.S. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 282-289, 2006.

SCHOONHOVEN, A. VAN; PASTOR-CORRALES, M.A. **Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1987. 56 p.

SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 25-29, 2007.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J.G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 323-378, 2002.

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

SMITH, I.M.; McNAMARA, D.G.; SCOTT, P.R.; HOLDERNESS, M. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. In: _____. **Quarantine pests for Europe**. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 1997. p. 991-994.

SOUZA, A.N. **Estrutura e diversidade genética de *Xylella fastidiosa* determinada por sequenciamento do gene 16S rDNA e análise de polimorfismo por ARDRA e AFLP**. 2005. 91 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SOUZA, F.L. **Variabilidade genética do fungo *Erythricium salmonicolor*, agente causal da rubelose dos citros**. 2006. 55 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1994.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R. The potential benefits from cultivar specific red clover - potato crop rotations. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 133, p 365-373, 1998.

STURZ, A.V.; MATHESON, B.G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 184, n. 2, p. 265-271, 1996.

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

- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, n. 1, p. 13-19, 1997.
- SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, n. 3, p. 415-424, 2008.
- SUNDIN, G.W.; JACOBS, J.L. Ultraviolet Radiation (UVR) Sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 27-38, 1999.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 596-1599, 2007.
- TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, p.331-337, 2002.
- THEODORO, G.F.; MARINGONI, A.C. Efeito de doses de nitrogênio na severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro comum. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 32, p. 132-138, 2006a.
- _____. Efeito de doses de potássio na severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro comum. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 32, p. 139-146, 2006b.
- _____. Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro no Estado de Santa Catarina e reação de genótipos a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 32, p. 34-41, 2006c.
- THOMPSON, F.L.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; SWINGS, J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 520-538, 2001.
- TOR, M.; MANTELL, S.H.; AINSWORTH, C. Endophytic bacteria expressing beta-glucuronidase cause false positives in transformation of dioscorea species. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n. 9, p. 452-456, 1992.
- TORRIANI, S.; CLEMENTI, F.; VANCANNETY, M.; HOSTE, B.; DELLAGLIO, F.; KERSTERS, K. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* Species by RAPD-PCR and AFLP. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 8, 554-560, 2001.

ULRICH, K.; ULRICH, A.; EWALD D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 169-80, 2008.

VAN ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 133–154, 1998.

VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J. S.; Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, n. 5, p. 371–380, 2005.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent *pseudomonas* against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 1-10, 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLA: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n.21, p. 4407-4414, 1995.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 22, p. 6531–6535, 1990.

_____. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, New York, v. 218, p. 706-740, 1993.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

YAMADA, K.; KOMAGATA, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria V: Classification of coryneform bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 18, n. 6, p. 417-431, 1972.

YOUNG, J.M.; DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; PANAGOPOULOS, C.G.; ROBBS, C.F. Proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 21, n. 1, p. 153-177, 1978.

ZGURSKAYA, H.I.; EVTUSHENKO, L.I.; AKIMOV, V.N.; KALAKOUTSKII, L.V. *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb. nov., and six strains from annual grasses. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, n. 1, p. 143-149, 1993.

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