**A COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA DE CITROS
E SUA INTERAÇÃO COM *XYLELLA FASTIDIOSA*, AGENTE CAUSAL
DA CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS (CVC)**

WELINGTON LUIZ DE ARAÚJO

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área
de Concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Julho – 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Araújo, Welington Luiz de

A comunidade bacteriana endofítica de citros e sua interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (CVC) / Welington Luiz Araújo. - Piracicaba, 2000.

131 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Biodiversidade 2. Clorose-variegada-dos-citros 3. Controle biológico 4. Endófito 5. Interação 6. Laraja I. Título

CDD 634.31

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

À minha esposa,
Denise Hurtado de Araújo
pelo amor, paciência, dedicação
e incentivo em todos os momentos

DEDICO

À minha filha,
Jessika Fernanda de Araújo
pelo amor e compreensão

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, e em especial agradeço ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela orientação; possibilidade da realização deste trabalho, e principalmente por me ensinar a ser um pesquisador.
- Ao Dr. Jan Dirck van Elsas e Dr. Jim W. L. van Vuurde pela orientação e produtivas discussões que facilitaram a execução de parte deste trabalho no Plant Research International, Wageningen – Holanda.
- À Profa. Dra. Aline Ap. Pizzirani-Kleiner, pela amizade e facilidade concedidas no Lab. de Genética de Microrganismos – ESALQ/USP.
- Ao Dr. Walter Maccheroni Jr. pela amizade, correções e pelo apoio irrestrito a este trabalho.
- À Denise e Jessika pelo amor, incentivo e paciência nas intermináveis noites de Sábado e nas tardes de Domingo no laboratório.
- Aos meus pais, Terezinha M. de Araújo e Luiz V. de Araújo, aos meus irmãos Diogo, Sérgio, Donizete e toda a família pelo carinho, atenção e incentivo.
- Agradeço à Joelma Marcon pela amizade sincera e pelo apoio em todas as etapas deste trabalho.
- Aos amigos André Lima, Carlos Vildoso, Paulo Lacava e Ricardo Yara pela amizade e pelo apoio durante as dificuldades do percurso.
- À Rosemeire Bueno e Gilda Muhlen pela agradável convivência e pela possibilidade de discussões a respeito do trabalho.
- Ao José Antônio da Silva pelo apoio técnico e amizade durante toda a execução deste trabalho no Lab. de Genética de Microrganismos.

- Aos colegas do Lab. de Genética de Microrganismos, em especial Ágata Giancoli, Claudia Gai, Danila Melotto, Derlene Attili, Fernando Andreote, Fernando Barcelos, Julia Sobral, Jucimary Marques, Leonardo de Souza, Margarete Nadalini, Priscila Rosseto pela ajuda e convivência agradável.
- Aos colegas do Plant Research International, em especial Anneke Wolters, Francisco de Souza, Joana Salles, Leonard van Overbeek, Ludwina Lankwarden e Paolina Garbeva pela amizade e pelo apoio técnico e científico na execução da análise da comunidade bacteriana por DGGE.
- Aos amigos “brasileiros” de Wageningen: Delacir e Adriana Brandão, Rômulo e Flávia Scorza, Américo e Cláudia Ciocciola, Pedro e Mari Boff, Fábio e Susan Dal Soglio, Paulo e Veridiana Mello, Etienne e Clayton Perleberg pela agradável convivência.
- Aos funcionários do Depto. de Genética da ESALQ/USP, em especial à Adriana, Léia, Neusa, Silvana, Berdã e Fernando pelo apoio.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado e pela ajuda financeira.
- À CAPES pela concessão de bolsa de estudos “Sandwich” – modalidade PDEE.
- À Fundecitrus pela ajuda na coleta de material e financiamento de parte do trabalho
- A todos os professores que contribuíram para minha formação científica, e às demais pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	01
CAP. 1 - REVISÃO DA LITERATURA	03
1.1. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	04
1.2. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE CITROS	05
1.3. BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DE PLANTAS	07
1.4. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	22
1.5. MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	24
CAP. 2 - DIVERSIDADE DA POPULAÇÃO ENDOFÍTICA E INTERAÇÃO COM <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> EM CITROS	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
2.1. INTRODUÇÃO	30
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.2.1. Amostras vegetais	33
2.2.2. Desinfecção superficial de ramos de citros	34
2.2.3. Isolamento de bactérias endofíticas	34
2.2.4. Extração de DNA	35
2.2.4.1. Cultura bacteriana pura	35
2.2.4.2. Tecidos Vegetais	36

2.2.5. PCR	37
2.2.6. Análise por DGGE	38
2.2.7. Detecção de <i>Xylella fastidiosa</i>	39
2.2.8. Análise Estatística	39
2.3. RESULTADOS	40
2.3.1. Determinação de bactérias culturáveis endofíticas de ramos de citros	40
2.3.2. Detecção de <i>Xylella fastidiosa</i>	48
2.3.3. Análise de DGGE da região 968-1387 do rDNA dos isolados de <i>Methylobacterium</i> spp.	48
2.3.4. Análise de DGGE da comunidade bacteriana endofítica de citros	48
2.4. DISCUSSÃO	54
CAP. 3 - GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE) ASSOCIADO À Sonda ESPECÍFICA PARA A REGIÃO HIPERVARIÁVEL 6 DO GENE DE 16S rRNA PARA O ESTUDO DE POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BATATA	58
RESUMO	59
ABSTRACT	60
3.1. INTRODUÇÃO	61
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.2.1. Isolados bacterianos e condições de cultivo	63
3.2.2. Inoculação de bactérias endofíticas em plantas de batata	63
3.2.3. Desinfecção superficial de tecidos vegetais	64
3.2.4. Isolamento de bactérias endofíticas	64
3.2.5. Extração de DNA	65
3.2.5.1. Cultura bacteriana pura	65

3.2.5.2. Tecidos Vegetais	65
3.2.6. PCR	66
3.2.7. Análise por DGGE	67
3.2.8. Eletro-transferência dos géis de DGGE	67
3.2.9. Desenvolvimento da Sonda V6	68
3.2.10. Hibridização com a Sonda V6	69
3.2.11. Condições para ERIC PCR	70
3.3. RESULTADOS	70
3.3.1. Determinação de bactérias endofíticas culturáveis de <i>Solanum tuberosum</i>	70
3.3.2. Determinação do perfil de DGGE das plantas de <i>Solanum tuberosum</i> e identificação dos isolados bacterianos inoculados por meio de sondas V6	77
3.4. DISCUSSÃO	79
CAP. 4 - COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , <i>Methylobacterium extorquens</i> E <i>M. mesophilicum</i> EM PLÂNTULAS DE CITROS	83
RESUMO	84
ABSTRACT	85
4.1. INTRODUÇÃO	86
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	88
4.2.1. Isolados bacterianos e condições de cultivo	88
4.2.2. Experimentos em casa de vegetação	88
4.2.3. Inoculação de bactérias endofíticas em sementes de citros	89
4.2.4. Desinfecção superficial de tecidos vegetais	90
4.2.5. Isolamento de bactérias endofíticas	90
4.2.6. Detecção de bactérias endofíticas na planta por Microscopia Óptica	91

4.2.7. Extração de DNA	91
4.2.7.1. Cultura bacteriana pura	91
4.2.7.2. Tecidos Vegetais	92
4.2.8. PCR	93
4.2.9. Análise por DGGE	94
4.2.10. Desenvolvimento da Sonda V6	95
4.2.11. Hibridização com a Sonda V6	96
4.2.12. Condições para ERIC PCR	96
4.3. RESULTADOS	97
4.3.1. Determinação de bactérias culturáveis endofíticas de citros	97
4.3.2. Determinação do perfil de DGGE de plântulas de <i>Citrus limonia</i> e identificação dos isolados bacterianos inoculados por meio da sonda V6	102
4.3.3. Estudo de reinoculação de bactérias endofíticas em plântulas axênicas	103
4.3.3.1. Efeito de bactérias endofíticas inoculadas em limão cravo	103
4.3.3.2. Localização dos endófitos na planta hospedeira	105
4.4. DISCUSSÃO	105
5. CONCLUSÕES GERAIS	112
6. REFERÊNCIAS	114

**A COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA DE CITROS
E SUA INTERAÇÃO COM *Xylella fastidiosa*, AGENTE CAUSAL DA
CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS (CVC).**

Autor: Welington Luiz de Araújo

Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

RESUMO

O presente trabalho avaliou a associação entre a comunidade bacteriana endofítica de *Citrus sinensis* (Laranja Natal) e a presença de plantas resistentes à Clorose Variegada dos Citros (CVC). A densidade populacional e a biodiversidade de bactéria endofíticas cultiváveis ou não foi avaliada de ramos descascados de 4 tipos de plantas de citros (plantas saudas, escape e doentes de laranja natal e plantas de Tangerina poncã (*C. reticulata*). Além disso, foi estudada utilizando DGGE a colonização de plântulas de *C. limonia* por 3 espécies endofíticas de *C. sinensis*. Esta estratégia foi desenvolvida em batata (*Solanum tuberosum*) como planta modelo. Não foi observada diferença significativa entre a densidade bacteriana em plantas de laranja. Entretanto, foi observado que a bactéria endofítica *Curtobacterium flaccumfaciens* foi isolada principalmente de plantas escape, enquanto que *Methylobacterium* spp. foi isolada principalmente de plantas doentes. Utilizando a técnica de DGGE (Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante) foi observada a presença de uma banda rica em GC de uma β -proteobactéria não cultivável somente em plantas escapes. Também foi observada maior diversidade genotípica, baseada no gene de rDNA 16S, na população de *Methylobacterium* spp. isolada de plantas doentes. De acordo com estes resultados, foi sugerido que a presença de *C. flaccumfaciens*

e/ou a β -proteobacteria não-cultivável poderia ativar uma reação sistêmica induzida nas plantas escape, e esta resistência ou uma possível antibiose inibiria a colonização desta planta por vários genótipos de *Methylobacterium* spp. e manteria os níveis populacionais de *Xylella fastidiosa* (agente causal da CVC) abaixo daqueles que causam o aparecimento de sintomas da CVC. Após inoculação na semente, o isolado AR1.6/2 de *M. extorquens* foi observado principalmente nas câmaras sub-estomáticas do caule e em tecidos sub-epidérmicos de plântulas de *C. limonia*, as quais exibiram uma redução no acúmulo de biomassa em comparação com plantas controle. O isolado ER1/6 de *C. flaccumfaciens* induziu um acúmulo de biomassa em plântulas inoculadas. O isolado ER1/6 e *M. mesophilicum* (isolado SR1.6/6) foram consistentemente observados no parênquima adjacente aos vasos infectados e também nas câmaras sub-estomáticas dos caules. Os resultados apresentados neste trabalho mostram, pela primeira vez evidências da indução de resistência em *C. sinensis* por bactérias endofíticas, e indicam uma estratégia importante para o entendimento da clorose variegada dos citros, além da possibilidade do seu controle biológico por meio destas bactérias.

ENDOPHYTIC BACTERIAL COMMUNITY FROM CITRUS AND INTERACTION
WITH *Xylella fastidiosa*, CAUSAL AGENT OF
CITRUS VARIEGATED CHLOROSIS (CVC)

Author: Welington Luiz de Araújo

Adviser: Dr. João Lúcio de Azevedo

ABSTRACT

The present work was carried out to evaluate whether the bacterial endophyte communities contributes to Citrus Variegated Chlorosis (CVC) resistance in sweet orange (*Citrus sinensis*). The population density and biodiversity of culturable and unculturable endophytic bacteria was examined from peeled branches of 4 types of citrus plants (healthy, escape and diseased plants of sweet orange and tangerine - *C. reticulata*). In addition, the interaction between endophytic bacteria and seedlings of *C. limonia* was studied using molecular strategy developed in a model plant (*Solanum tuberosum*). There were no significant differences for population density of bacteria among sweet orange plants. However, the endophytic bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* was detected mainly in escape plants, while *Methylobacterium* spp. was detected in diseased plants. Using the DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) technique, the presence of a consistent high-GC band of unculturable β -proteobacteria was detected only in escape plants. In addition, more diversity of 16S rDNA genotypes of *Methylobacterium* spp. was detected in diseased plants. These results suggest the hypothesis that the presence of *C. flaccumfaciens* and the unculturable β -proteobacteria could elicit a induced systemic resistance in escape plants, which or a possible antibiosis could inhibit the colonization of this plant by many *Methylobacterium* spp.

genotypes and keep the *Xylella fastidiosa* (causal agent of CVC) population in a low level, avoiding of development CVC diseased. After seed treatment with AR1.6/2 strain of *M. extorquens*, the endophytic bacteria were observed mainly in sub-epidermic tissues of *C. limonia*, which plants shown a reduced growing in comparison of control plants. The endophytic *C. flaccumfaciens* strain ER1/6 shown a plant growth-promoting effect in *C. limonia* seedlings. This ER1/6 strain and *M. mesophilicum* (strain SR1.6/6) were abundant in the parenchyma adjacent to infected vessels, and also filled sub stomatal chambers of stems. Results of the present study provide the first evidence of induced systemic resistance by endophytic bacteria in *C. sinensis* and a promising approach to understand the CVC disease, and its biological control.

INTRODUÇÃO

Bactérias endofíticas são aquelas que podem ser isoladas do interior de tecidos vegetais desinfetados superficialmente e que não causam aparentemente dano às plantas. Estes endófitos colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos e, portanto, podem ser importantes candidatos para o controle destes. Diversos trabalhos têm mostrado o potencial das bactérias endofíticas para o controle biológico de doenças e pragas, e na promoção de crescimento da planta hospedeira. Em citros poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de se avaliar a interação destes endófitos com a planta hospedeira, e o potencial destes microrganismos em controlar doenças e/ou promover crescimento vegetal.

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, sendo responsável por 30% da produção, 53% do suco de laranja e 80% do suco concentrado distribuído no mercado internacional, movimentando anualmente mais de 5 bilhões de reais. Entretanto, dados recentes têm mostrado que 34% dos pomares produtivos na safra de 97/98 estavam apresentando sintomas da Clorose Variegada dos Citros (CVC), conhecida também por “amarelinho”. Esta doença é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, a qual ataca principalmente laranja doce (*Citrus sinensis* L.). Esta bactéria coloniza o xilema da planta hospedeira produzindo lesões cloróticas nas folhas e frutos, maturação precoce dos frutos com uma redução do tamanho dos mesmos, e enrijecimento da casca que pode causar danos às máquinas utilizadas na produção de suco. Sabe-se que o

aparecimento dos sintomas da CVC está associado a fatores ambientais, mas até o presente momento não se tem definido quais são estes fatores.

Com base no exposto, o presente trabalho teve por objetivos (i) isolar e caracterizar a comunidade endofítica de ramos de *Citrus sinensis* e *C. reticulata*, em diferentes locais e épocas do ano, (ii) verificar se ocorre variação na comunidade endofítica de citros associada à CVC, (iii) desenvolver estratégia molecular para o estudo da comunidade endofítica de citros, (iv) reintroduzir bactérias endofíticas em plântulas de citros e avaliar o efeito destas bactérias sobre a comunidade endofítica, natural destas plântulas e sobre o desenvolvimento vegetal de plântulas axênicas, (v) estudar a localização destas bactérias no interior de plântulas de citros.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

Parte deste capítulo foi uma compilação de parte das publicações:

- AZEVEDO, J.L., W. MACCHERONI JR., J.O. PEREIRA, W.L. ARAÚJO. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. EJB: Electronic Journal of Biotechnology [online]. 15 June 2000, 3: Available on the Web: <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4>. ISSN: 0717-3458.
- AZEVEDO, J.L., W.L. ARAÚJO, W. MACCHERONI JR. 2000. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. Cap. 3. In: **Controle Biológico de Pragas 3**. I. S. MELLO & J. L. AZEVEDO. Embrapa, *No prelo*.

1.1. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

A teoria da associação benéfica ou neutra entre bactérias e plantas se iniciou com o trabalho de Perotti (1926). Entretanto, o conhecimento de bactérias em tecidos vegetais assintomáticos iniciou-se antes de 1870 com Pasteur (revisado por Smith, 1911 e citado por Hallmann *et al.*, 1997). Com o acúmulo de informações a respeito desta interação endófitos-planta, e com os resultados promissores da utilização destas bactérias no controle biológico de pragas e doenças e também como promotoras de crescimento, tem sido verificada uma atenção especial ao estudo de bactérias endofíticas como agentes de controle biológico de inúmeras doenças (Lemanceau & Alabouvette, 1993; Hallmann *et al.*, 1997; M'Piga *et al.*, 1997) e como promotoras de crescimento vegetal (Hallmann *et al.*, 1997; Bent & Chanway, 1998). Estudos recentes têm mostrado que bactérias consideradas da rizosfera colonizam endofiticamente a planta, onde também são ativas na promoção de crescimento (Shishido *et al.*, 1999).

As bactérias endofíticas, da mesma forma que fitopatógenos apresentam a capacidade de penetrar na planta e se disseminarem sistemicamente no hospedeiro, habitando de forma ativa o apoplasto (Mahaffee *et al.*, 1997; Quadt-Hallmann *et al.*, 1997b; James & Olivares, 1998; Reinhold-Hurek & Hurek, 1998), vasos condutores (Ruppel *et al.*, 1992; Bell *et al.*, 1995; Mahaffee *et al.*, 1997; Hallmann *et al.*, 1997; James & Olivares, 1998) e ocasionalmente pode haver colonização intracelular (James *et al.*, 1994; Quadt-Hallmann & Kloepper, 1996; Quadt-Hallmann *et al.*, 1997a). Nestes

habitats, as bactérias devem induzir alterações fisiológicas e morfológicas no hospedeiro, além de alterar a população de outros microrganismos associados à planta.

1.2. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE CITROS.

Poucos estudos foram realizados para o entendimento da interação da comunidade endofítica com citros. O fungo *Physotheria citri* foi o primeiro microrganismo isolado endofiticamente deste hospedeiro (*Citrus sinensis*) (Childs *et al.*, 1965). Mais recentemente foram avaliados flores, frutas, pedicelas e ramos assintomáticos de tangerina poncã (*C. reticulata*) tratados ou não com óxido cloreto de cobre, em duas estações. Neste estudo foi observado que os patógenos *Phomopsis citri* (*Diaporthe citri*), *Lasiodiplodia theobromae* e *Botryosphaeria* sp. estiveram de forma latente nos tecidos vegetais (Wright *et al.*, 1998). Outros gêneros de fungos patogênicos também foram isolados como endófitos, incluindo *Colletotrichum* (antracnose), *Guignardia/Phyllostictina* (pinta preta), *Mycosphaerella* (mancha gordurosa – “greasy”), *Cladosporium* e *Alternaria*, os quais apresentaram uma flutuação populacional ao longo da época de amostragem. Os autores verificaram que plantas amostradas em outras regiões e plantas não tratadas com o fungicida apresentaram uma maior biodiversidade, sugerindo que o uso de fungicidas e a domesticação podem reduzir a prevalência e a diversidade da comunidade de fungos endofíticos em árvores frutíferas (Wright *et al.*, 1998).

Em outro estudo com tangerinas, verificou-se que os fungos patogênicos de citros *Guignardia citricarpa* e *Colletotrichum gloesporioides* são muito prevalentes em tecidos foliares assintomáticos (Glienke, 1995). Entretanto, foi verificada por meio de

marcadores de RAPD duas subpopulações de *G. citricarpa* sendo uma caracterizada por isolados provenientes de lesões (isolados patogênicos) e outra constituída de isolados provenientes de tecidos assintomáticos (isolados endofíticos) (Glienke-Blanco, 1999). Este resultado mostra a existência da utilização de linhagens endofíticas deste patógeno, as quais poderiam ser utilizadas para o controle do patógeno.

De acordo com a tabela 1, pode ser observado que inúmeras espécies bacterianas têm sido isoladas endofiticamente de plantas cítricas. Os primeiros trabalhos com bactérias endofíticas de citros tinham por objetivo associar presença de bactérias no xilema com o declínio de plantas jovens (Feldman *et al.*, 1977; Nemec *et al.*, 1975). Estes autores isolaram diferentes grupos de bactérias, entre elas *Pseudomonas* spp. e uma bactéria fastidiosa ("rickettsia-like bacterium"), mas estas bactérias não foram associadas aos sintomas estudados. Posteriormente, foi avaliada a comunidade endofítica do xilema de raízes de limão (*C. jambhin*). Neste estudo, Gardner *et al.* (1982) isolaram 850 bactérias endofíticas distribuídas em pelo menos 17 gêneros, e verificaram que 4% dos isolados ativaram reação de hipersensibilidade em tabaco, indicando se tratar de potenciais patógenos. As demais bactérias não tiveram qualquer correlação com fitopatogenicidade, indicando serem endófitos do xilema dessas plantas, os quais segundo os autores, podem ter um papel importante no vigor e na nutrição de citros.

Foram isoladas bactérias endofíticas de tecidos lenhosos de limão e laranja azeda, e 55 isolados mostraram *in vitro* atividade antagonística contra *Phoma tracheiphila* (agente causal do mal seco dos citros). Desta população, foi verificado que 3 isolados de *B. subtilis* e um de *Pseudomonas fluorescens*, após inoculação no caule

de laranja azeda, foram capazes de reduzir significativamente os sintomas da doença (Lima et al., 1994). Foi verificado que as espécies mais efetivas no controle da doença foram aquelas com a densidade populacional maior na planta inoculada.

A comunidade endofítica é muito dinâmica, havendo interações entre as espécies bacterianas e entre estas com o hospedeiro. Araújo (1996) isolou inúmeras bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros, entre elas *Alcaligenes* sp., *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Burkholderia cepacia* e *Pantoea agglomerans*. Foram realizados *in vitro* testes de interação entre estas bactérias e fungos endofíticos de citros, e verificou-se a ocorrência de forte interação entre estas bactérias e *G. citricarpa*, a qual pode influenciar a composição da população endofítica nas folhas deste hospedeiro. Neste estudo foi verificado que o fungo *G. citricarpa*, isolado endofiticamente de folhas, inibiu consistentemente inúmeras bactérias do gênero *Bacillus*, e estimulou o crescimento de *Erwinia herbicola* (sin. *P. agglomerans*) (Araújo, 1996; Azevedo et al., 2000). De acordo com o autor, este resultado aliado com a alta similaridade por marcadores de RAPD, mostrou que *E. herbicola* deve ser um endófito plenamente adaptado ao hospedeiro e a outros endófitos como *G. citricarpa*, enquanto que *B. pumilus* e *B. subtilis* devem ser bactérias epifíticas que eventualmente, na ausência de competição com *G. citricarpa*, colonizam a planta endofiticamente.

1.3. BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DE PLANTAS

Inúmeros estudos foram realizados para o entendimento da interação entre microrganismos endofíticos, patógenos e pragas de culturas de importância agropecuária, mas, ainda pouco se sabe a respeito dos mecanismos químicos, fisiológicos e ecológicos envolvidos com esta associação.

TABELA 1. Bactérias endofíticas isoladas de plantas sadias de diferentes espécies de citros.

Espécie	Hospedeiro	Tecido do Hospedeiro	Referência
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner <i>et al.</i> , 1982
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner <i>et al.</i> , 1982
<i>Alcaligenes-Moraxella</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner <i>et al.</i> , 1982
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner <i>et al.</i> , 1982
<i>Bacillus</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner <i>et al.</i> , 1982
<i>Bacillus</i> spp.	<i>C. sinensis</i> , <i>C. limonia</i> , <i>C. volcamerian</i> , <i>C. reshni</i> , <i>C. sunki</i> e <i>Poncirus trifoliata</i>	Folha	Araújo, 1996
<i>B. pumilus</i>	<i>C. sinensis</i> , <i>C. limonia</i> , <i>C. volcamerian</i> , <i>C. reshni</i> , <i>C. sunki</i> e <i>Poncirus trifoliata</i>	Folha	Araújo, 1996
<i>B. subtilis</i>	<i>Citrus</i> spp. (limão) e <i>C. sinensis</i>	caule	Lima <i>et al.</i> , 1994
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner <i>et al.</i> , 1982
<i>B. cepacia</i>	<i>C. sinensis</i> , <i>C. reshni</i> e <i>C. sunki</i>	Folha	Araújo, 1996
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner <i>et al.</i> , 1982
<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner <i>et al.</i> , 1982

TABELA 1. Continuação

Espécie	Hospedeiro	Tecido do Hospedeiro	Referência
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>E. cloacae</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>E. sakazakii</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>E. aerogenes</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>Pantoea agglomerans</i> (sin. <i>C. sinensis</i> , <i>C. limonia</i> , <i>C. volcamerian</i> , <i>C. Erwinia herbicola</i>) <i>reshni</i> , <i>C. sunki</i> e <i>Poncirus trifoliata</i>		Folha	Araújo, 1996
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Citrus</i> sp. (limão)	Raiz	Gardner et al., 1985
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>P. fluorescens</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>P. fluorescens</i>	<i>Citrus</i> sp. (limão) e <i>C. sinensis</i>	caule	Lima et al., 1994

TABELA 1. Continuação.

Espécie	Hospedeiro	Tecido do Hospedeiro	Referência
<i>P. putida</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>Providencia</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>Serratia</i> sp.	<i>C. sinensis</i>	Raiz	Gardner et al., 1985
<i>S. marcescens</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>S. liquefaciens</i>	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>Shigella</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>Vibrio</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982
<i>Yersinia</i> sp.	<i>C. jambhiri</i>	Raiz	Gardner et al., 1982

A potencialidade da exploração desta interação endófitos-plantas para o controle de doenças causadas por fungos e bactérias ou pragas já foi constatado em várias culturas. A tabela 2 mostra as bactérias endofíticas descritas na literatura com potencial para o controle biológico de doenças de plantas de interesse econômico. Pode se verificar que estão descritas 34 espécies bacterianas em 15 gêneros, sendo os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* os que apresentam o número maior de espécies com capacidade de reduzir a infecção de plantas de interesse econômico por patógenos. Dentro destes gêneros, *B. pumilus* e *P. fluorescens*, cada uma, mostrou capacidade de reduzir os sintomas de 8 patógenos.

Bactérias endofíticas colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, favorecendo-as como agentes de controle biológico de doenças (Hallmann *et al.*, 1997). Este controle pode ocorrer principalmente devido a atuação direta sobre o patógeno, no interior da planta hospedeira (Pan *et al.*, 1997), por antibiose (Sturz & Matheson, 1996; Pleban *et al.*, 1997; Assis *et al.*, 1998; Sturz *et al.*, 1999), por indução de resistência sistêmica (Krishnamurthy & Gnanamanickam, 1997; Duijff *et al.*, 1997; M'piga *et al.*, 1997; Benhamou *et al.*, 1998; Nowak, 1998; Raupach & Kloepper, 1998) e/ou por competição por nutrientes (Mari *et al.*, 1996). Entretanto, em algumas formas de resistência a doenças, a planta deve apresentar uma predisposição a ser colonizada por endófitos específicos, os quais poderiam conferir este caráter (Sturz & Matheson, 1996).

TABELA 2. Bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais sadios, com potencial para o controle biológico de doenças fúngicas e bacterianas.

Endófito	Patógeno	Hospedeiro do Patógeno	Referência
<i>Alcaligenes piechaudii</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	repolho	Assis <i>et al.</i> , 1998
<i>Arthrobacter ilicis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> B	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Verticillium dahliae</i>	Acer sp.	Hall <i>et al.</i> , 1986
<i>B. alcalophilus</i> ssp. <i>Halodurans</i>	<i>Erwinia carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata	Sturz & Matheson, 1996
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata	Sturz & Matheson, 1996
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Pera	Mari <i>et al.</i> , 1996
<i>B. brevis</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>B. cereus</i>	<i>R. solani</i>	Algodão	Pleban <i>et al.</i> , 1995; Pleban <i>et al.</i> , 1997.
<i>B. cereus</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Feijão	Pleban <i>et al.</i> , 1995
<i>B. megaterium</i> ;	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998

TABELA 2. Continuação.

Endófitos	Patógenos	Hospedeiro do Patógeno	Referência
<i>B. pumilus</i>	<i>B. cinerea</i>	Pera	Mari <i>et al.</i> , 1996
<i>B. pumilus</i>	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Pepino	Raupach & Kloepper, 1998
<i>B. pumilus</i>	<i>E. tracheiphila</i>	Pepino	Raupach & Kloepper, 1998
<i>B. pumilus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis</i> – <i>licopersici</i>	Tomate	Benhamou <i>et al.</i> , 1998
<i>B. pumilus</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>lactrymans</i>	Pepino	Raupach & Kloepper, 1998
<i>B. pumilus</i>	<i>R. solani</i>	Algodão	Pleban <i>et al.</i> , 1995
<i>B. pumilus</i>	<i>S. rolfsii</i>	Feijão	Pleban <i>et al.</i> , 1995
<i>B. subtilis</i>	<i>S. rolfsii</i>	Feijão	Pleban <i>et al.</i> , 1995
<i>B. subtilis</i>	<i>R. solani</i> e <i>Pythium ultimum</i>	Algodão	Pleban <i>et al.</i> , 1995
<i>B. subtilis</i>	<i>C. orbiculare</i>	Pepino	Raupach & Kloepper, 1998
<i>B. subtilis</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>lactrymans</i>	Pepino	Raupach & Kloepper, 1998
<i>B. subtilis</i>	<i>E. tracheiphila</i>	Pepino	Raupach & Kloepper, 1998
<i>B. subtilis</i>	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Castanha	Wilhelm <i>et al.</i> , 1998

TABELA 2. Continuação.

Endófitos	Patógenos	Hospedeiro do Patógeno	Referência
<i>B. subtilis</i>	<i>Phoma tracheiphila</i>	Poncã	Lima <i>et al.</i> , 1994
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Banana	Pan <i>et al.</i> , 1997
<i>Cellulomonas turbata</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>Curtobacterium citreum</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>C. flaccumfaciens</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>C. flaccumfaciens</i>	<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata	Sturz & Matheson, 1996
<i>C. flaccumfaciens</i>	<i>C. orbiculare</i>	Pepino	Raupach & Kloepper, 1998
<i>C. flaccumfaciens</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>lactymans</i>	Pepino	Raupach & Kloepper, 1998
<i>C. flaccumfaciens</i>	<i>E. tracheiphila</i>	Pepino	Raupach & Kloepper, 1998
<i>C. luteum</i>	<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata	Sturz & Matheson, 1996
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>E. cloacae</i>	<i>F. moniliforme</i>	Algodão	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>E. cloacae</i>	<i>F. moniliforme</i>	Milho	Hinton & Bacon, 1995
<i>Erwinia herbicola</i>	<i>E. amylovora</i>	Pera	Erskine & Lopatecki, 1975

TABELA 2. Continuação.

Endófitos	Patógenos	Hospedeiro do Patógeno	Referência
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	repolho	Assis <i>et al.</i> , 1998
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata	Sturz & Matheson, 1996
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Verticillium dahliae</i>	Tomate	Sharma & Nowak, 1998
<i>P. aureofaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Uva e framboesa	Khmel <i>et al.</i> , 1998
<i>P. cichorii</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>P. corrugata</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>P. denitrificans</i>	<i>Ceratocystis fagacearum</i>	Carvalho	Brooks <i>et al.</i> , 1994
<i>P. fluorescens</i>	<i>F. oxysporum</i>	Tomate	M'Piga <i>et al.</i> , 1997
<i>P. fluorescens</i>	<i>F. oxysporum</i>	Rabanete	Leeman <i>et al.</i> , 1995
<i>P. fluorescens</i>	<i>F. oxysporum</i>	Cravo	Van Peer & Schippers, 1992
<i>P. fluorescens</i>	<i>R. solani</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>S. rolfsii</i>	Algodão	Pleban <i>et al.</i> , 1995
<i>P. fluorescens</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerium</i> e <i>C. orbiculare</i>	Pepino	Liu <i>et al.</i> , 1995a

TABELA 1. Continuação.

Endófitos	Patógenos	Hospedeiro do Patógeno	Referência
<i>P. fluorescens</i>	<i>Phoma tracheiphila</i>	Poncá	Lima <i>et al.</i> , 1994
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymas</i>	Pepino	Liu <i>et al.</i> , 1995b
<i>P. fluorescens</i>	<i>R. solani</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>S. roffsii</i>	Feijão	Pleban <i>et al.</i> , 1995
<i>P. fluorescens</i>	<i>R. solani</i>	Arroz	Krishnamurthy & Gnanamanickam, 1997
<i>P. fluorescens</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Uva e framboesa	Khmel <i>et al.</i> , 1998
<i>P. putida</i>	<i>C. fagacearum</i>	Carvalho	Brooks <i>et al.</i> , 1994
<i>P. putida</i>	<i>R. solani</i>	Arroz	Krishnamurthy & Gnanamanickam, 1997
<i>P. solanacearum</i>	<i>V. dahliae</i>	Batata	Kempe & Sequiera, 1983
<i>P. tolaasii</i>	<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata	Sturz & Matheson, 1996
<i>Serratia liquefaciens/grimessi</i>	<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata	Sturz & Matheson, 1996
<i>S. plymuthica</i>	<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata	Sturz & Matheson, 1996
<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998
<i>X. oryzae</i>	<i>R. solani</i>	Trevo e Batata	Sturz <i>et al.</i> , 1998

Foi verificado que uma linhagem de *Burkholderia cepacia*, isolada de aspargos coloniza os espaços intercelulares de raízes de banana e está associada ao controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* neste hospedeiro (Pan *et al.*, 1997). Segundo estes autores, foi observado, *in vitro*, que esta bactéria endofítica coloniza a superfície da hifa e macrósporos deste fitopatógeno, causando protuberâncias anormais nas hifas, resultando numa deformação do micélio.

De acordo com Buchenauer (1998) a produção de antibióticos pelas bactérias antagônicas constitui um importante fator de supressão de doenças na raiz, mas sideróforos produzidos por pseudomonados fluorescentes e a produção de enzimas líticas também estão envolvidas. A produção de compostos antagônicos ao patógeno também tem sido observada em linhagens de bactérias endofíticas avaliadas quanto ao seu potencial no controle biológico, pois, esta característica pode estar associada com o controle efetivo da doença. Neste contexto, foi verificada uma linhagem endofítica de *B. cereus*, que produz e excreta uma quitinase (Quitobiosidase), que aplicada diretamente no solo, protegeu plântulas de algodão (*Gossypium hirsutum*) contra *Rhizoctonia solani* (Pleban *et al.*, 1995; Pleban *et al.*, 1997).

A presença de bactérias com capacidade de síntese de compostos antagônicos parece ser freqüente na comunidade endofítica, pois, diversos estudos têm observado endoófitos com esta característica em inúmeras culturas. Em batata (*Solanum tuberosum*) e trevo vermelho (*Trifolium pratense*) foi constatado que 74% da comunidade endofítica composta de 25 espécies de bactérias (18 gêneros), apresentou *in vitro* antibiose à *R. solani* (Sturz *et al.*; 1998). Em arroz, foram isoladas bactérias endofíticas que apresentaram forte atividade antifúngica contra *R. solani*, *Pythium myriotylum*, *Guamannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum* (Mukhopadhyay *et al.*, 1996). A

presença destes endófitos, apesar de ser freqüente, parece estar associada ao nicho ocupado. Em tubérculos de batata, foi observado que a presença de bactérias com atividade inibitória sobre *F. sambucinum*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum* e *Phytophthora infestans* estava relacionada a localização destas nos tubérculos, indiferentemente dos cultivares utilizados. Neste estudo, foi constatada que bactérias endofíticas que colonizam regiões mais externas dos tubérculos apresentam maior atividade contra estes fungos, os quais iniciam a infecção pela epiderme da planta hospedeira (Sturz *et al.*, 1999).

O aumento da comunidade endofítica e da rizosfera com capacidade antagônica a doenças ou pragas pode ser obtido pela adição de compostos no solo. Neste contexto, foi verificado que a adição de quitina no solo antes do plantio de algodão, induziu um aumento na população bacteriana com atividade quitinolítica, reduzindo a infecção do hospedeiro pelo nematóide *Meloidogyne incógnita*. Este composto orgânico afetou a população endofítica de plantas de algodão, visto que a bactéria endofítica *Burkholderia cepacia* esteve presente como espécie dominante no hospedeiro, somente quando o solo foi enriquecido. Por outro lado, *Phyllobacterium rubiacearum* presente endofiticamente na ausência de quitina, teve a sua população reduzida quando foi adicionada quitina ao solo (Hallmann *et al.*, 1999). Segundo estes autores, as bactérias endofíticas se constituem como excelentes candidatas ao controle biológico de nematóides de plantas, pois, colonizam os mesmos tecidos vegetais que estes vermes.

O controle biológico de doenças e pragas de culturas de interesse, utilizando bactérias endofíticas, pode ser realizado de forma indireta. Neste caso, o endófito não atua diretamente sobre o patógeno, mas induz uma resposta na planta, ativando a

resistência ao patógeno. Estudos têm mostrado que a aplicação de rizobactérias (as quais também colonizam endofiticamente o hospedeiro) em sementes ou na raiz pode induzir resistência a múltiplos patógenos dos tecidos foliares como vírus, fungos e bactérias (Kloepper *et al.*, 1999). Em outro caso, foram utilizadas rizobactérias, em combinação ou em aplicações simples de cada bactéria, e verificou-se que estas bactérias além de promover o crescimento vegetal, induziram a resistência sistêmica do hospedeiro às bactérias *P. syringae* pv. *lachrymans*, *E. tracheiphila* e ao fungo *C. orbiculare* (Raupach & Kloepper, 1998). Em tomate, a aplicação da rizobactéria promotora de crescimento *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN) induziu resistência sistêmica a *Verticilium dahliae*. Os resultados deste estudo mostraram que a colonização endofítica da planta pela rizobactéria foi necessária para a indução de resposta contra o patógeno (Sharma & Nowak, 1998). Segundo os autores, como endófito esta bactéria tem a vantagem de evitar a competição microbiológica durante a indução de resistência. Esta característica das bactérias endofíticas pode favorecê-las nesta aplicação, aumentando os seus efeitos sobre a planta e reduzindo as variações decorrentes da interação com outros microrganismos do solo, as quais podem inviabilizar a formulação de um produto comercial ou estratégia de controle.

Foi observado que a cocultura de explantes de tecidos vegetais com bactérias leva a alterações metabólicas nestes tecidos, as quais aumentam a tolerância da planta a estresses bióticos e abióticos, possibilitando a utilização desta tecnologia em micropropagação comercial (Nowak, 1998).

Os fatores que levam à indução de resistência sistêmica contra patógenos ainda não estão bem estabelecidos, mas a penetração ativa de *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN), com hidrólise de celulose sugere que alguns endófitos podem causar

reação de hipersensibilidade, ativando a resistência sistêmica contra patógenos (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997a). Tem sido observado também, que esta indução de resistência em tomate esta relacionada à colonização dos tecidos internos do hospedeiro e à presença de um lipopolissacarídeo da membrana externa (Cadeia O-antigênica) da bactéria endofítica (Van Peer & Schippers, 1992; Duijff *et al.*, 1997).

A indução da resistência sistêmica está associada à alterações bioquímicas e estruturais na planta hospedeira, as quais afetam adversamente o crescimento e desenvolvimento do patógeno (Duijff *et al.*, 1997; M'piga *et al.*, 1997; Benhamou *et al.*, 1998; Sharma & Nowak, 1998). Em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), previamente inoculadas com *P. fluorescens* e *B. pumilus* foi observado o acúmulo de substâncias eletro-opacas ao longo das células da epiderme e/ou nos espaços intercelulares e deposição de β -1,3-glucana na parede celular. Estas alterações morfológicas foram associadas ao aumento da resistência ao ataque de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-licopersici* neste hospedeiro (M'Piga *et al.*, 1997; Benhamou *et al.*, 1998). Os autores verificaram que a aplicação conjunta de *B. pumilus* com quitosam aumentou substancialmente as alterações celulares na plantas, resultando em um melhor controle do patógeno (Benhamou *et al.*, 1998).

Em batata, a inoculação *in vitro* de *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN) induz a um aumento no conteúdo de lignina em torno dos tecidos vasculares (Frommel *et al.*, 1991, Nowak, 1998), um aumento na atividade de fenilalanina amônia liase, na quantidade de ácido clorogênico e altos níveis de compostos fenólicos nos caules (Nowak *et al.*, 1997). O aumento de citocininas em plantas de batata crescidas *in vitro* também pode estar relacionado ao aumento da resistência à patógenos (Lazarovits & Nowak, 1997), visto que foi observado uma correlação positiva entre o aumento deste

fitohormônio e a redução dos sintomas causados por *F. oxysporum* f. sp. *radicis* – *licopersici* em tomate (Reddy *et al.*, 1991).

Até o momento, não se conhecem os mecanismos envolvidos na interação entre microrganismos endofíticos e vírus que infectam plantas. Poucos estudos são direcionados para esta interação, pois, estes organismos ocupam nichos diferentes (bactérias e fungos colonizam preferencialmente espaços intercelulares de raízes e partes baixas da planta, enquanto vírus são intracelulares de partes aéreas do hospedeiro). Entretanto, os dois dependem do metabolismo da planta e, portanto devem competir por nutrientes derivados do hospedeiro (Hallmann *et al.*, 1997). Além disso, Kloepper *et al.* (1999) verificaram que a inoculação de rizobactérias nas raízes ou sementes leva a um aumento de resistência da planta hospedeira a algumas viroses e à doenças fúngicas e bacterianas, mas neste caso a redução da virose ocorreu devido à indução da síntese de compostos de defesa da planta, e não por competição por nutrientes.

A utilização prática destas bactérias endofíticas no controle biológico de patógenos depende de inúmeros fatores relacionados à interação bactérias endofíticas – patógenos – planta, pois, a competição existente entre os microrganismos neste habitat pode reduzir a eficiência do controle, inviabilizando a sua utilização. Segundo Raupach & Kloepper (1998), na maioria dos casos o controle biológico que ocorre naturalmente, é devido a uma mistura de microrganismos antagônicos, sendo, portanto, muito importante avaliar a interação de diferentes bactérias para o controle de patógenos. A bacterização de plantas provenientes de cultura de tecidos pode favorecer a sua aplicabilidade em espécies micropropagadas, pois, a muda sairia “vacinada” para o campo, onde a resistência aos patógenos seria expressa (Nowak,

1998), evitando a competição destas bactérias com outras que colonizam a planta no ambiente.

1.4. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal constitui um grupo complexo, normalmente associado à rizosfera do hospedeiro. Estudos recentes têm mostrado que bactérias endofíticas também podem aumentar o crescimento vegetativo de diversas culturas de interesse, entre elas batata (Frommel *et al.*, 1991; Sturz, 1995), milho (Hinton & Bacon, 1995), pepino (Raupach & Kloepper, 1998), arroz (Hurek *et al.*, 1994; Prayitno *et al.*, 1999) e melancia (Liu *et al.*, 1995c). Sharma & Nowak (1997) sugerem que a promoção de crescimento é um evento que precede a indução de resistência, e pode ser dependente da colonização e posterior sensibilização do hospedeiro. Neste aspecto, Shishido *et al.* (1999) verificaram que as bactérias promotoras de crescimento *B. polymyxa* e *P. fluorescens*, após 5 meses de inoculação na semente, colonizaram as raízes, células corticais e tecidos vasculares do caule de um híbrido de pinheiro (*Picea glauca* X *P. engelmannii*).

Foi observado que *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN) induz significativo aumento no número de raízes em batata, na formação de raízes secundárias, no peso seco da raiz e no tamanho do caule (Frommel *et al.*, 1991). Em melancia, esta bactéria também induziu o crescimento radicular (Liu *et al.*, 1995c). O aumento do peso seco da planta, geralmente está associado à fixação de nitrogênio atmosférico pela bactéria (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Entretanto, foi verificado que um mutante incapaz de fixar nitrogênio atmosférico (*nif*) do endófito *Azoarcus* sp. induziu um maior crescimento da planta hospedeira, mostrando que a fixação de N₂ não esteve

envolvida neste processo (Hurek *et al.*, 1994). Segundo Kloepper *et al.* (1991) a promoção de crescimento, por bactérias endofíticas e da rizosfera, pode ser também devido à redução da comunidade bacteriana deletéria à planta, a qual pode ser inibida pelos endófitos, favorecendo o desenvolvimento do hospedeiro.

Outro mecanismo pelo qual bactérias endofíticas podem estimular o crescimento da planta vem a ser a produção de ácido indol acético (AIA), compostos semelhantes a citocininas e pela redução dos níveis de etileno na planta (Buchenauer, 1998). Inúmeros estudos têm mostrado que diferentes espécies bacterianas associadas às plantas apresentam a capacidade de sintetizar compostos análogos aos fitorhormônios, entre elas *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* (Bastian *et al.*, 1998), *Azospirillum braziliense* (Bashan & Holguin, 1997), *Azorhizobium caulinodans* (Christiansen-Weniger, 1996), *B. polymyxa* (Srinivasan *et al.*, 1996) e *Methylobacterium* spp. (Holland & Pollaco, 1994). Em cultura de tecidos de *Ardisia crispa*, contaminada com uma bactéria metilotrófica, foi observado um efeito semelhante àquele constatado com a aplicação de citocinina (Holland & Pollaco, 1994), mostrando que a bactéria endofítica sintetizou *in planta* um composto com a mesma função.

A promoção de crescimento é um evento dependente da interação entre a bactéria promotora, a comunidade microbiana associada ao hospedeiro e o genótipo da planta. Foi verificado que a presença de uma rizobactéria, a qual não é deletéria para a planta, mascarou os efeitos benéficos da bactéria endofítica *B. polymyxa*, mas não afetou o tamanho populacional do endófito (Bent & Chanway, 1998). Em outro estudo, foi constatado que diferentes ecótipos de pinheiro (*Picea mariana*) tiveram uma maior acumulação de biomassa, quando inoculados com linhagens endofíticas de

Pseudomonas da mesma área geográfica, mostrando uma adaptação específica entre a bactéria endofítica e a planta hospedeira (Shishido & Chanway, 1999). Este estudo foi confirmado por outro, no qual foi verificado que a comunidade endofítica de raízes de canola difere entre diferentes cultivares, mostrando uma associação das bactérias endofíticas com o genótipo do hospedeiro (Siciliano & Germida, 1999).

Estudos têm sido realizados para se obter o máximo de promoção de crescimento aliado ao controle de doenças. Raupach & Kloepper (1998) verificaram que uma mistura composta de *B. pumilus*, *B. subtilis* e *Curtobacterium flaccumfaciens* aplicada nas sementes estimulou o crescimento de plântulas de pepino e reduziu os sintomas causados pelos patógenos *C. orbiculae*, *Erwinia tracheiphila* e *P. syringae* pv. *lachrymans*, em níveis estatisticamente semelhantes àqueles obtido com o ativador sintético de resistência (Actigard). Este resultado mostra não apenas a potencialidade da utilização destes microrganismos em culturas de interesse agrícola, mas também a necessidade de mais estudos a respeito da interação entre diferentes espécies endofíticas e a planta hospedeira.

1.5. MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

A utilização de microrganismos endofíticos é extremamente promissora no futuro, visto que o número de trabalhos a respeito tem aumentado consideravelmente, possibilitando um entendimento maior desta interação, e permitindo a utilização conjunta deste conhecimento e da tecnologia do DNA recombinante. A idéia de utilizar a interação simbiótica entre bactéria e plantas, aliada à engenharia genética foi avaliada em linhagens fixadoras de nitrogênio de *Bradyrhizobium* que colonizavam raízes de *Cajanus cajan*. De acordo com Nambiar *et al.* (1990), esta bactéria

carregando o gene da endotoxina de *Bacillus thuringiensis* foi capaz de fixar nitrogênio atmosférico nas raízes do hospedeiro e também tornar a planta resistente às larvas de *Rivellia angulata*. Entretanto, esta ideia foi inicialmente conduzida utilizando a bactéria endofítica *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, na qual foi introduzido este gene de *B. thuringiensis* (Fahey *et al.*, 1991; Tomasino *et al.*, 1995). Esta bactéria engenheirada foi comercializada com o nome comercial de “Incide”, o qual foi utilizado para o controle da broca do milho (*Ostrinia nubilalis*).

Foi verificado que a presença deste gene de *B. thuringiensis* em *C. xyli* subsp. *cynodontis* não alterou a capacidade desta bactéria endofítica em colonizar colmos de milho. Em relação ao hospedeiro, observou-se que este endófito causou um aumento na quantidade de nitrogênio na planta, independente da presença do gene exógeno, mas não alterou a composição química dos resíduos das plantas no solo. A bactéria alterada geneticamente induziu um acúmulo maior de água na planta hospedeira e não foi capaz de sobreviver no solo, aumentando a possibilidade de sua utilização no controle biológico, pois, esta característica reduz os riscos de problemas ambientais (Tester, 1992).

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar esta construção genética, utilizando outros vetores (Turner *et al.*, 1991; Lampell *et al.*, 1994; Uratani *et al.*, 1995). Foi verificado que um vetor integrativo com o gene de interesse causou instabilidade no sistema, tomando a sua utilização imprópria para esta finalidade (Turner *et al.*, 1991). Em outros casos, o gene instável foi perdido durante a multiplicação bacteriana (Lampell *et al.*, 1994), mas foi verificado que a construção de um vetor de secreção eficiente permitiu a utilização desta bactéria para o controle da broca do colmo do milho (Uratani *et al.*, 1995). Uma simples aplicação desta bactéria

contendo o vetor de secreção com o gene de interesse, em sementes ou plântulas de milho, resultou em plantas adultas exibindo proteção contra *O. nubilalis* (Tomasino *et al.*, 1995).

Foi descrita a construção de um vetor integrativo que pode carregar genes exógenos e se expressar em *C. xyli* subsp. *cynodontis*. Neste trabalho foi utilizado, como repórter, o gene que codifica a enzima endoglucanase, e verificou-se que os transformantes foram estáveis *in vitro* e no xilema de milho, mostrando a possibilidade da utilização desta bactéria e deste vetor para o controle biológico de doenças e/ou outras pragas do milho (Haapalainen *et al.*, 1998). Esta estratégia tem sido também, utilizada para uma maior compreensão da interação bactéria-planta e o controle de doenças. Neste contexto, foi introduzido o gene *lacZY* em linhagens de *P. fluorescens* e *P. putida*, as quais induzem resistência a *R. solani* em arroz. Utilizando este sistema, os autores monitoraram a migração e sobrevivência destas bactérias no interior dos tecidos do hospedeiro, e embora, nenhuma bactéria tenha sido observada epifiticamente, foi constatada a redução dos sintomas causados por *R. solani* em até 18% (Krishnamurthuy & Gnanamanickam, 1997). Em *Azoarcus* sp., foi obtido um isolado com uma fusão *gusA* e GFP ao gene *nifH*, o qual após inoculação em plântulas de arroz, mostrou em condições de laboratório alta expressão deste gene *nifH* em microcolônias localizadas no aerênquima do hospedeiro (Egener *et al.*, 1999).

A continuidade do desenvolvimento de estudos utilizando-se endófitos como agentes de controle biológico, e o emprego da Biologia Molecular, poderão fornecer respostas para inúmeras perguntas a respeito do impacto destes microrganismos alterados geneticamente no ambiente, e nas culturas onde serão utilizadas (Hallmann *et al.*, 1997).

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE DA POPULAÇÃO ENDOFÍTICA E INTERAÇÃO

COM *Xylella fastidiosa* EM CITROS

(Diversity of Endophytic Bacterial Population and Interaction
with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants)

W. L. Araújo¹, W. Maccheroni Jr¹, J. Marcon¹, J. D. van Elsas², J.

W. L. van Vuurde², J. L. Azevedo^{1,3}

Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil¹, Plant Research International, Wageningen University and Research Center, Wageningen, The Netherlands,² e Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil³

**DIVERSIDADE DA POPULAÇÃO ENDOFÍTICA E INTERAÇÃO
COM *Xylella fastidiosa* EM CITROS**

RESUMO

Xylella fastidiosa, agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC), coloniza o xilema do hospedeiro. Plantas escape têm sido observadas em diferentes regiões, mas esta ausência de sintomas ainda não foi associada à fatores bióticos ou abióticos. Com o objetivo de estudar a interação entre bactérias endofíticas e citros, a comunidade bacteriana endofítica associada às plantas com e sem sintomas de CVC foi avaliada em 5 locais, por isolamento e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Foi verificado que a comunidade endofítica presente no xilema dos ramos das plantas amostradas é composta principalmente por *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp., *Nocardia* sp., *Pantoea agglomerans* e *Xanthomonas campestris*. A presença de *C. flaccumfaciens* e *Methylobacterium* spp. foi associada à plantas escape e plantas doentes, respectivamente. Análise por DGGE combinada “nested” PCR para β -proteobactéria mostrou uma banda específica para plantas escape e maior diversidade em plantas doentes. *X. fastidiosa* foi detectada, por PCR, em menor concentração em plantas escape que em plantas doentes. Estes resultados, associados com maior diversidade genotípica de *Methylobacterium* spp. isolada de plantas doentes, sugere que a presença de *C. flaccumfaciens* e/ou a β - proteobactéria não cultivável poderia ativar uma resistência sistêmica nas plantas escape, levando à resistência contra *X. fastidiosa* e algumas espécies de *Methylobacterium*. O uso desta estratégia para o estudo da interação entre endófitos-fitopatógenos-plantas foi discutido neste trabalho.

DIVERSITY OF ENDOPHYTIC BACTERIAL POPULATION AND INTERACTION WITH *Xylella fastidiosa* IN CITRUS PLANTS

ABSTRACT

Xylella fastidiosa, the causal agent of Citrus Variegated Chlorosis (CVC), colonizes the xylem vessels of hosts. Escape plants have been observed in some affected orchards, but, edaphic or climatic factors have not been associated with the absence of symptoms in these plants. To examine this question, the endophytic bacterial community of citrus plants with CVC symptoms and escape plants were studied in five localities during two years, using cultivation and DGGE techniques. The species, present within the xylem vessels of citrus branches were detected by plating, included *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp., *Nocardia* sp., *Pantoea agglomerans* and *Xanthomonas campestris*. The presence of *C. flaccumfaciens* and *Methylobacterium* spp. was positively and negatively associated with escape plants, respectively. Analysis by DGGE showed a high homology among plants, but by nested PCR for β -proteobacteria combined with DGGE, a specific high GC-band in escape plants and a higher diversity in diseased plants were detected. *X. fastidiosa* was detected, by PCR, in lower number in escape than in diseased plants. These results, associated with a higher genotype diversity of *Methylobacterium* spp. isolated from diseased plants, suggest that the presence of *C. flaccumfaciens* and/or the unculturable β -proteobacteria could elicit a systemic resistance in escape plants, leading to a resistance against *X. fastidiosa* and some *Methylobacterium* genotypes. The use of this approach to study the interaction of endophytes-pathogens-host plants is discussed.

2.1. INTRODUÇÃO

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) ou amarelinho foi pela primeira vez observada no Brasil em 1987 (Rosetti *et al.*, 1990), é uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, a qual ataca principalmente laranja doce (*Citrus sinensis* L.) (Chang *et al.*, 1993). Esta bactéria coloniza os vasos xilemáticos da planta hospedeira (Rosetti *et al.*, 1990) e causa sintomas que incluem lesões cloróticas nas folhas e frutos, maturação precoce dos frutos com uma redução do tamanho dos mesmos, e enrijecimento da casca que pode causar danos às máquinas utilizadas na produção de suco (Lee *et al.*, 1991). Plantas escape têm sido observadas em pomares intensamente atacados pela CVC. Embora estas plantas estejam sujeitas à contaminação pelo vetor, elas não apresentam sintomas da doença. Entretanto, até o presente momento, não foi verificada correlação entre o genótipo destas plantas escape, fatores climáticos e edáficos com a ausência de sintomas, mostrando serem ainda necessários estudos adicionais para o entendimento deste processo de resistência e/ou tolerância ao patógeno. Para que o controle biológico de *X. fastidiosa* possa ser efetivo, os microrganismos antagonistas também devem colonizar o sistema vascular da planta hospedeira ou devem ter a capacidade de ativar uma resistência sistêmica induzida (ISR) contra *X. fastidiosa*. Dessa forma, o conhecimento de microrganismos endofíticos de citros que colonizam o xilema da planta hospedeira poderá contribuir no entendimento desta doença, bem como, permitir a seleção de endófitos que podem atuar direta ou indiretamente sobre *X. fastidiosa*, reduzindo os

sintomas causados por esta bactéria em *C. sinensis*.

Endófitos são microrganismos que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfectados superficialmente e que não causam, aparentemente, dano às plantas (Hallmann *et al.*, 1997). Bactérias endofíticas podem ser importantes candidatas para o controle biológico, visto que colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos (Hallmann *et al.*, 1997). Além disso, inúmeros trabalhos têm mostrado que microrganismos endofíticos exibem potencial como agente de controle biológico contra fitopatógenos (Azevedo *et al.*, 2000; Sturz & Matheson, 1996; M'Piga *et al.*, 1997; Sharma & Nowak, 1998; Duijff *et al.*, 1997; Sturz *et al.*, 1998), insetos (Azevedo *et al.*, 2000; Petrini *et al.*, 1989), e nematóides (Hallmann *et al.*, 1998; Hallmann *et al.*, 1999). Em outros casos, os endófitos podem aumentar a germinação de sementes e promover o estabelecimento da planta hospedeira em condições adversas (Chanway, 1997), bem como promover o crescimento da planta (Lazarovits & Nowak, 1997; Pillay & Nowak, 1997; Bent & Chanway, 1998).

O conhecimento da dinâmica da interação bactérias endofíticas-patógeno-planta e o desenvolvimento de estratégia de controle do patógeno, envolve o entendimento não só dos processos de patogenicidade, mas também de possíveis interações do patógeno alvo com microrganismos que naturalmente ocorrem na planta hospedeira, visto que um desequilíbrio na população de endófitos poderia permitir o estabelecimento do patógeno. Poucos estudos têm sido realizados para o conhecimento da comunidade endofítica de citros. O fungo *Physoderma citri* foi o primeiro microrganismo isolado endofiticamente de plantas de citros (*Citrus sinensis*) (Childs *et al.*, 1965). Mais recentemente, várias bactérias foram isoladas do xilema de

raiz de limão (*C. jambhin*), incluindo *Acromobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *A. iwoffii*, *Alcaligenes-Moraxella*, *Arthrobacter* spp.; *Bacillus* spp., *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter freundii*, *Corynebacterium* spp., *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gardner *et al.*, 1982), *Pseudomonas* spp. (Gardner *et al.*, 1985). Recentemente, *Pantoea agglomerans* e *Bacillus pumilus* foram isoladas endofiticamente de folhas de porta-enxertos de citros (Araújo, 1996).

Embora ainda não tenha sido usado para o estudo de bactérias endofíticas, a análise da comunidade endofítica baseada em métodos moleculares, pode favorecer o entendimento da interação entre a planta hospedeira e as suas bactérias endofíticas. A técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), baseada na análise de perfis de 16S rDNA amplificados por primers universais para bactérias, pode ser uma importante ferramenta para o estudo de populações bacterianas endofíticas, pois, permite segundo Muyzer *et al.* (1993) e Ovreas *et al.* (1997) o estudo e a detecção de bactérias cultiváveis e não cultiváveis. Dessa forma, esta técnica pode favorecer estudos ecológicos ou associações entre fitopatógenos e bactérias endofíticas. Os fragmentos gerados por PCR são separados em um gradiente desnaturante de Uréia/Formamida, de acordo com o ponto de desnaturação nestas condições (concentração de GC na fita de DNA). O padrão de bandas obtido de uma amostra representa a estrutura populacional da planta analisada, onde cada banda do gel representa um grupo bacteriano com sequência do gene de rRNA 16S com um ponto de desnaturação semelhante (Kuske *et al.*, 1997). Esta estratégia é capaz de mostrar a estrutura populacional das amostras analisadas, revelando tanto bactérias cultiváveis como não cultiváveis.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram (i) determinar a diversidade

de bactérias cultiváveis endofíticas de plantas com sintomas de CVC e plantas escapes, e (ii) estudar a interação entre a comunidade endofítica de citros e *X. fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros, usando a técnica tradicional de isolamento, bem como a técnica de DGGE.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Amostras vegetais

A variabilidade existente com relação à bactérias endofíticas de citros foi determinada em laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck, var. Natal) e tangerina poncã (*C. reticulata* Blanco). Para laranja, foram utilizadas plantas saudáveis, com sintomas de CVC e escapes (provenientes de pomares intensamente afetados pela CVC). Dessa forma, os tratamentos considerados no presente trabalho foram as 4 categorias de plantas analisadas. As amostras foram coletadas em 4 localidades no Estado de São Paulo (Catanduva, Colina, Elisiário e Novais) e uma no Estado de Minas Gerais (Frutal), que representam importantes áreas citrícolas. Para cada tratamento, em cada local de coleta, foram amostradas 4 plantas, das quais foram retirados ramos de aproximadamente 1 cm de diâmetro. Para plantas escape, o número de plantas amostradas foi menor, variando de 1 a 3 plantas por local, visto que a presença destas plantas não é freqüente nos pomares analisados. As amostras foram coletadas de Março a Abril e de Outubro a Novembro de 1997. Para a região de Novais, foi realizado um acompanhamento da flutuação da população endofítica nos anos de 1997 e 1998.

2.2.2. Desinfecção superficial de ramos de citros

Ramos de citros foram lavados em água corrente e separados de acordo com a aparência. Àqueles ramos com lesões não relacionados à CVC ou ferimentos foram eliminados. Os tecidos vegetais foram lavados em álcool (70%) por 1 min, desinfetados em solução de hipoclorito de sódio (2% de Cl^- disponível) por 5 min, enxaguados em álcool (70%) e posteriormente em água esterilizada. Para confirmar a eficácia da desinfecção, foram utilizados dois procedimentos: 1) fragmentos de ramos foram pressionados sobre meio TSA; e 2) alíquotas da água da última lavagem foram semeadas sobre meio TSA e após incubação a 28°C por 48 horas, foram examinados para a verificação do crescimento de contaminantes.

2.2.3. Isolamento de bactérias endofíticas

Após a desinfecção, os ramos foram descascados para se evitar o isolamento de bactérias endofíticas desta parte da planta. Os ramos sem cascas foram cortados em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm e colocados sobre meio TSA suplementado com benomyl (50 $\mu\text{g/mL}$). De cada planta analisada foram utilizados 70 fragmentos de ramos, os quais foram colocados em 10 placas de Petri, contendo cada uma delas 7 fragmentos de ramos. As placas foram incubadas a 28°C por 12 dias, e posteriormente foi verificado o número de fragmentos infectados. Por planta, a Incidência de Endófitos (IE) foi calculada como a frequência de fragmentos com crescimento bacteriano.

Após a incubação, amostras de cada grupo bacteriano foram coletadas ao acaso, purificadas e agrupadas de acordo com características morfológicas (morfologia da cultura, cor, motilidade, forma da célula, taxa de crescimento) e

coloração de Gram. Isolados representativos de cada grupo foram identificados por meio da análise de ácidos graxos totais da célula bacteriana (FAME – fatty acid methyl esters) feita por cromatografia e pelo sistema MIDI (Microbial Identification System, Inc., Delaware, USA). Os isolados que não puderam ser identificados por meio do FAME foram ensaiados adicionalmente por BIOLOG (Biolog Inc., Califomia, USA) ou utilizando o perfil de índice analítico (API - AP 20E e AP50CHE. Bio Mérieux S.A., France).

2.2.4. Extração de DNA

2.2.4.1. Cultura bacteriana pura

Foi centrifugado 1,5 ml de cultura bacteriana por 2 min a 12000 g (centrífuga Eppendorf), o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de TE (10 mM de Tris-HCl; pH = 8,0) e centrifugado novamente. Este foi novamente ressuspensionado em 500 µL de TE e foram adicionadas pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro - Sigma) e 30 µL de SDS 10%. Esta suspensão foi agitada em agitador de pérolas de vidro ("Bead beating") por 30 s.

Ao lisado celular foram adicionados 500 µL de fenol e homogeneizados por inversão. A mistura foi centrifugada por 10 min (12000 g), e após a coleta da fase aquosa foram adicionados 400 µL de clorofane (25 fenol : 24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado (12000 g) por 5 min. A fase aquosa foi coletada e 400 µl de clorofil (24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico) foram adicionados, misturados e centrifugados (12000 g) por 5 minutos. A fase aquosa foi novamente coletada, adicionado 1/10 volume de 5M NaCl e 0,6 volume de isopropanol, incubado à temperatura ambiente por 5 min e centrifugado (12000 g) por 10 min.

O precipitado foi lavado com isopropanol 80% e secado a vácuo por 5 min. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de TE e a integridade do DNA foi verificada correndo 3 µL em gel de agarose (0,8%).

2.2.4.2. Tecidos Vegetais

Após desinfecção superficial dos ramos (item 2.4.1), 1 g do tecido vegetal foi cortado e colocado em 3 mL de tampão Fosfato de Sódio (120 mM, pH 8,0) e agitado (120 rpm) por 2 horas. Dois mL desta suspensão foram centrifugados (12000 g) por 2 min, o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de tampão TE, foram adicionadas pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro - Sigma) e 30 µL de SDS 10%. Esta suspensão foi agitada em agitador de pérolas por 30 s. Foram adicionados 500 µL de fenol e homogeneizados por inversão. A mistura foi centrifugada (12000 g) por 10 min, coletada a fase aquosa e adicionados 400 µL de clorofane (25 fenol : 24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado novamente (12000 g) 5 min. A fase aquosa foi coletada e 400 µL de clorofil (24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico) foram adicionados, misturados e centrifugado (12000 g) por 5 min. A fase aquosa foi novamente coletada, adicionado 1/10 volume de 5M NaCl e 0,6 volume de isopropanol, incubado à temperatura ambiente por 5 min e centrifugado (12000 g) por 10 min. O precipitado foi lavado com isopropanol 80% e secado à vácuo por 5 min. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de TE e purificado utilizando o sistema Wizard (Wizard DNA Cleanup System, Promega, Madison, WI, USA). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (0,8%) em 0,5X TBE (1mM EDTA; 45 mM Ácido Bórico; e 45 mM Tris-HCl).

TABELA 1. Primers usados para amplificação e sequenciamento de 16S rDNA.

Primer ^a	Alvo no 16S rDNA ^b	Sequência (5'→3')
F968┘GC	Bactéria; posição 968 a 984	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGG-AACGCGAAGAACCTTAC ^c
R1378	Bactéria; posição 1378 a 1401	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
Falpha-U	α Proteobacteria; posição 175 a 203	CCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTAT
FBeta-2	β Proteobacteria	CGCACAAGCGGTGGATGA

^a F, primer 5'; R, primer 3'

^b Posições de acordo com o anelamento no gene de 16S rRNA de *E. coli*.

^c 5' grampo de GC (sequência anterior ao hífen)

2.2.5. PCR

As reações de PCR para análise de DGGE foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 2 µL (0,5 a 10 ng) de DNA molde, 0,2 µM de cada primer, 200 µM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (Pharmacia); 3,75 mM de MgCl₂; 5,0 U de Amplitaq DNA polimerase - "Stoffel fragment" (Perkin-Elmer/Cetus Nieuwerkerk, The Netherlands), 0,25 µg T4 Gene 32 Protein e 1% de formamida em 50 mM KCl e 20 mM Tris - HCl, pH 8.4. Em todos os experimentos, foi realizada uma reação de controle negativo, onde o DNA foi omitido. Para analisar a diversidade da comunidade bacteriana endofítica de citros via DGGE, o gene 16S rRNA foi amplificado utilizando os primers R1378 e U968┘GC (tabela 1).

Foi utilizado o termociclador PTC-100 (Programable Thermal Controller; MJ Reserch, Inc. USA), o qual foi programado para gerar uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, 2 ciclos a 94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 59°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 20 ciclos a 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min e uma extensão final de 10 min a 72°C. Foram utilizados 5 µL da reação para a observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 450 pb.

A PCR específica para α e β -proteobacteria foi realizada, utilizando os primers Alpha-U e Beta-2 (Tabela 1), respectivamente, em associação com o primer R1378 (Tabela 1). Para α -proteobacteria, o termociclador foi programado para gerar uma desnaturação inicial de 7 min a 94°C seguido de 25 ciclos (94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 1 min) e uma extensão final de 10 min a 72°C.

Para β -proteobacteria, foi utilizado início à quente (primers e Taq DNA polimerase foram adicionados na reação à 80°C) em termociclador programado para gerar uma desnaturação inicial de 5 min a 94°C seguido de 25 ciclos (95°C, 1 min; 62°C, 1 min 30 s; 72°C, 2 min) e uma extensão final de 10 min a 72°C. Dois µL desta reação foram utilizados em reação com primers universais como descrito acima, para posterior análise de DGGE.

2.2.6. Análise por DGGE

A análise por DGGE, baseado no método citado por Muyzer *et al.* (1993), foi realizada no sistema Ingeny phorU2 (Ingeny, Leiden, The Netherlands). Os produtos

de PCR foram colocados em gel de poliacrilamida (6% acrilamida) vertical, com um gradiente desnaturante de uréia/formamida (40-60%), onde 100% de desnaturação contém 7M de uréia e 40% de formamida. Foi aplicada uma corrente elétrica (100 volts) por 15 horas. Após a eletroforese o gel foi corado com SYBR GreenI (diluído 1:10000; Gold Nucleic Acid Gel Stain; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) diluído em tampão TAE (40,0 mM Tris-Acetato; 1,0 mM EDTA) e observado sobre luz Ultra Violeta. Eventualmente, o gel foi corado com prata (Bio Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands).

2.2.7. Detecção de *Xylella fastidiosa*

A detecção de *X. fastidiosa* em plantas foi feita por PCR, utilizando os primers CVC1 e 279-int (Pooler & Hartung, 1995). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo 2 µL de DNA total extraído de ramos de citros, 5 µL de 10X tampão Stoffel (10 mM KCl e 10 mM Tris - HCl, pH 8.3), 0,4 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP (Pharmacia), 3,75 mM de MgCl₂; 5 U de Amplitaq DNA polimerase - "Stoffel fragment" (Perkin-Elmer/Cetus Nieuwerkerk, The Netherlands). Em todos os experimentos, foi adicionado um controle negativo, no qual o DNA foi omitido. Foi utilizado termociclador programado para uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C seguido de 30 ciclos a 94°C, 1 min; 62°C, 1 min; 72°C, 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. Foram utilizados 5 µL da reação para a observação em gel de agarose (1,2%) em 0,5X TBE.

2.2.8. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas com o programa SAS (Proc GLM no

SAS 6.12; SAS Institute, Cary, NC, USA). A ANOVA foi analisada com um delineamento inteiramente ao acaso, o qual testou as hipóteses a 5% de significância (Steel & Torrie, 1980). A incidência de microrganismos endofíticos (IE) foi transformada pela raiz quadrada de IE mais 0,5, antes da análise de variância. Foi utilizado o teste de Duncan para comparação entre as médias transformadas.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Determinação de bactérias cultiváveis endofíticas de ramos de citros

A presença de bactérias endofíticas da região central de ramos de citros foi determinada em duas épocas de 1997 e em 5 localidades. De acordo com a análise estatística, houve diferença significativa no número de bactérias endofíticas entre os tratamentos, épocas e localidades (Tabela 2). Em geral, *C. reticulata* (poncã) apresentou uma IE menor que *C. sinensis* (plantas doentes, sadias e escape) nas duas épocas e nas 5 localidades (Tabela 3 e Figura 1 A e B).

A população bacteriana endofítica total, isolada de ramos de citros incluiu principalmente *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp. (incluindo *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans*, *M. zatmanii*), *Nocardia* sp., *Pantoea agglomerans* e *Xanthomonas campestris*. A análise de variância das IE mostrou diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, a média das IE totais entre plantas escape e plantas doentes não foi diferente, mas *C. sinensis* (plantas doente, sadia e escape) foi diferente de *C. reticulata* (poncã). Muitas espécies ocorreram em baixa frequência nesta análise, independentemente do tratamento e da época da amostragem. Entre as espécies dominantes, foi verificada que somente *X. campestris*, *E. cloacae*, *C. flaccumfaciens* e

Methylobacterium spp. apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2), destas somente *C. flaccumfaciens* e *Methylobacterium* spp. mostraram correlação negativa e positiva, respectivamente, com plantas doentes. *Methylobacterium* spp. foi o grupo bacteriano mais intensamente isolado em plantas doentes e sadias, sendo também isoladas de plantas escape e poncã (Figura 2). Estas *Methylobacterium* spp. permaneceram dominantes durante as duas amostragens, bem como em todos os locais analisados. Por outro lado, *C. flaccumfaciens* foi significativamente mais isolado de plantas escape do que de plantas doentes, enquanto *P. agglomerans* foi intensamente isolada de poncã (Figura 2).

Com o objetivo de comparar a flutuação populacional das bactérias endofíticas durante dois anos (1997 e 1998), foi realizado um acompanhamento apenas em Novais/SP durante este período. A Figura 3 mostra a IE dos principais grupos cultiváveis durante este período. Foi verificada diferença significativa entre as amostragens (variação sazonal) (Tabela 2), mas neste estudo, *Methylobacterium* spp. foi também o grupo mais freqüente, exceto no final de 1998 quando *P. agglomerans* foi intensamente isolada nas condições utilizadas (Figura 4). Entretanto, utilizando meio ágar-água, o qual não é adequado para o isolamento de *P. agglomerans*, foi verificado um aumento na IE de *Methylobacterium* spp. Nesta localidade, *C. flaccumfaciens* e *Methylobacterium* spp. foram também significativamente mais freqüente em plantas escape e plantas doentes, respectivamente (Figura 3).

TABELA 2. ANOVA da Incidência de Endófitos (IE) total e das espécies com diferença significativa entre tratamentos, em ramos de citros. Os valores de IE foram transformados pela Raiz Quadrada de IE somado com 0,5. O isolamento foi realizado em 5 locais, com 4 tratamentos em duas épocas.

TESTE DE F (P>F)						
Componentes de Variância	Isolamento Total	<i>X. campestris</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>C. flaccumfaciens</i>	<i>Methylobacterium</i> spp.	
Repetição (locais X épocas)	0,9446 ^{ns}	0,3566 ^{ns}	0,3378 ^{ns}	0,9964 ^{ns}	0,8100 ^{ns}	
Épocas	0,0028 ^{**}	0,0001 ^{**}	0,0223 [*]	0,0001 ^{**}	0,0001 ^{**}	
Locais	0,0001 ^{**}	0,0001 ^{**}	0,0001 ^{**}	0,0001 ^{**}	0,0001 ^{**}	
Tratamentos	0,0001 ^{**}	0,0001 ^{**}	0,0168 [*]	0,0254 [*]	0,0017 ^{**}	
Locais X Tratamentos	0,0001 ^{**}	0,0001 ^{**}	0,1383 ^{ns}	0,0926 ^{ns}	0,0142 [*]	
Épocas X Tratamentos	0,1166 ^{ns}	0,0001 ^{**}	0,5285 ^{ns}	0,0156 [*]	0,0001 ^{**}	
Locais X Épocas	0,0001 ^{**}	0,0001 ^{**}	0,0607 ^{ns}	0,0047 ^{**}	0,0018 ^{**}	
Locais X Épocas X Tratamentos	0,0001 ^{**}	0,0001 ^{**}	0,1023 ^{ns}	0,0077 ^{**}	0,2407 ^{ns}	
C.V.	13,99979	9,062118	10,61484	9,591551	14,67065	

^{ns}, não significativo ; * significativo ao nível de 5%; ** significativo ao nível de 1%

TABELA 3. Média das Incidências dos Endófitos - IE (transformado pela Raiz Quadrada de IE mais 0,5) com diferença significativa entre tratamentos, em 5 locais, 4 tratamentos em duas épocas (2 estações).

Tratamentos	Isolamento Total	<i>X. campestris</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>C. flaccumfaciens</i>	<i>Methylobacterium</i> spp.
Plantas doentes	1,16291 A	0,77052 A	0,76127 AB	0,73565 CB	0,83482 A
Plantas escape	1,13373 A B	0,78022 A	0,78764 A	0,76053 A	0,78216 B
Plantas sadias	1,10178 B	0,73353 B	0,76222 A	0,74469 AB	0,80140 AB
Ponçá	1,00566 C	0,72478 B	0,74322 B	0,71657 C	0,76601 B

Nota: Médias com as mesmas letras não são significativamente diferentes ao nível de 5% usando o teste de

Duncan. Valores são comparados dentro de uma mesma coluna.

FIG. 1. Média da Incidência de Endófitos total em ramos de citrus coletados (A) em 5 locais, (B) em duas épocas. A primeira coleta foi realizada durante o ano de 1997. Foram utilizadas nesta análise 4 repetições para cada tratamento/locais/épocas de amostragem. As barras indicam o desvio padrão das médias.

FIG. 2. Média da Incidência das principais bactérias endofíticas em ramos de *C. sinensis* (plantas doentes, escape e sadias) e *C. reticulata* (poncã) de 5 locais e em duas épocas do ano (Mar-Abr e Set-Out/97). Foram utilizadas 4 repetições para cada tratamento/local/época. Barras indicam o desvio padrão da média.

FIG. 3. Média da Incidência das principais bactérias endofíticas em ramos de *C. sinensis* (plantas doentes, escape e sadias) e *C. reticulata* (poncã) em Novais/SP durante em dois ano (Mar-Abr e Set-Out/97; Mar-Abr e Set-Out/98). Foram utilizadas 4 repetições para cada tratamento/local/época. Barras indicam o desvio padrão da média.

FIG. 4. Média da Incidência das principais bactérias endofíticas em ramos de *C. sinensis* (plantas doentes, escape e sadias) e *C. reiculata* (poncã) em quatro épocas (Mar-Abr e Set-Out/97; Mar-Abr e Set-Out/98) em Novais/SP. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento/local/época.

2.3.2. Detecção de *Xylella fastidiosa*

Utilizando os primers descritos por Pooler & Hartung (1995), a presença de *X. fastidiosa* foi diagnosticada em plantas escape e doentes. Entretanto, a intensidade das bandas foi diferente, visto que plantas com sintomas de CVC exibiram uma banda forte, enquanto plantas escape mostraram um sinal fraco. Nas condições utilizadas para diagnóstico desta doença, nenhuma banda foi observada em plantas sadia e poncã (Figura 5).

2.3.3. Análise de DGGE da região 968-1387 do rDNA dos isolados de *Methylobacterium* spp.

Quarenta e quatro isolados de *Methylobacterium* spp. foram identificados por meio de FAME (Fatty Acid Methyl Esters) e genotipados utilizando DGGE. Foram observadas 7 bandas com diferentes pontos de desnaturação na população avaliada (Figura 6). Estas bandas foram agrupadas em 8 genótipos, os quais não puderam ser associados com as espécies identificadas, i. e., o genótipo “A” foi observado nas espécies *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans* e *M. zatmanii*, enquanto o genótipo “B” foi observado em *M. mesophilicum* e *M. zatmanii*. Agrupando estes genótipos por tratamento, foi verificado que plantas escape tiveram menor diversidade que plantas doentes, sadias e poncã, pois, nestas plantas escape foi constatado somente a presença de isolados de *M. mesophilicum* com o genótipo A (Tabela 4).

2.3.4. Análise de DGGE da comunidade bacteriana endofítica de citros.

O padrão de DGGE, utilizando primers universais para a região 989-1387 do gene de rRNA, mostrou uma grande homogeneidade entre os tratamentos (Figura 7).

Resultado semelhante foi observado utilizando previamente primers específicos (nested PCR) para a subclasse α -proteobacteria (Figura 8A).

Em ambos, foram observados em média 4 bandas diferentes, as quais devem representar os grupos endofíticos dominantes em citros. Por outro lado, utilizando uma amplificação prévia, específica para β -proteobactérias, foram observadas diferenças significativas entre as plantas analisadas. Foi verificado que plantas doentes apresentaram um maior número de bandas, as quais devem representar uma diversidade maior da população endofítica neste hospedeiro.

FIG. 5. Detecção de *X. fastidiosa* em plantas de citrus com primers específicos, projetados por Pooler & Hartung (1995). 01) Plantas sadias; 02) Plantas Escape; 03) Plantas doentes; 04) Poncã e 05) Controle positivo com cultura pura de *X. fastidiosa*. M) Marcador.

Foi também consistentemente verificada uma banda de alta concentração de GC presente somente em plantas escape (Figura 8B), a qual não apresentou padrão semelhante com outros padrões de bactérias cultiváveis isoladas de citros (dados não mostrados). Infelizmente não foi possível a reamplificação e sequenciamento desta banda.

FIG. 6. Padrão de DGGE de *Methylobacterium* spp. isoladas de ramos de citros.

01)AR3/19 -*M. mesophilicum* (genótipo H); 02) AR1.6/4 – *Methylobacterium* sp. (genótipo G); 03)PR5/4 – *M. fujisawaense* (genótipo F); 04)PR5.1/1 - *M. fujisawaense* (genótipo F); 05)AR1.6/11 – *M. extorquens* (genótipo E); 06)AR1.6/8 - *M. extorquens* (genótipo E); 07)AR1.6/3 - *M. extorquens* (genótipo E); 08)AR1.6/2 - *M. extorquens* (genótipo E); 09)SR5/3 - *M. fujisawaense* (genótipo D); 10)SR5/4 - *M. extorquens* (genótipo D); 11)SR1.6/2 – *M. zatmanii* (genótipo C); 12)SR1.6/6 – *M. mesophilicum* (genótipo B); 13)SR1.6/13 - *M. mesophilicum* (genótipo A); 14)PR3/8 - *M. zatmanii* (genótipo B).

TABELA 4. Linhagens de *Methylobacterium* isoladas de plantas de citros, neste estudo.

A identificação foi feita com análise de FAME e genotipagem pela técnica de DGGE.

Hospedeiro	Espécies	Linhagens	Locais	Genótipos
Plantas doentes (<i>C. sinensis</i>)	<i>M. extorquens</i>	AR1.6/2; AR1.6/3; AR1.6/8; AR1.6/11	Novais/SP	E
	<i>M. mesophilicum</i>	APB/1	Bebedouro/SP	A
		AR1.6/1; AR1.6/6	Novais/SP	A
		AR3/15; AR3/20	Catanduva/SP	A
		AR3/19	Catanduva/SP	H
		AR4/19	Frutal/SP	A
		AR5/1; AR5.1/4; AR5.1/5; AR5.1/6	Colina/SP	A
	<i>Methylobacterium</i> sp.	AR1.6/4	Novais/SP	G
Plantas escape (<i>C. sinensis</i>)	<i>M. mesophilicum</i>	ER1/21; ER1.6/1; ER1.6/2; ER1.6/4; ER1.6/5	Novais/SP	A
		ER5/2	Colina/SP	A
Plantas sadias (<i>C. sinensis</i>)	<i>M. radiotolerans</i>	SR1.6/3	Novais/SP	A
	<i>M. zatmanii</i>	SR1.4/10; SR1.6/4	Novais/SP	B
		SR1.6/2	Novais/SP	C
		SR1.6/9	Novais/SP	A
	<i>M. fujisawaense</i>	SR5/3	Colina/SP	D
	<i>M. extorquens</i>	SR1.6/1; SR1.6/15	Novais/SP	E
		SR5/4	Colina/SP	D
	<i>M. mesophilicum</i>	SR1.6/6	Novais/SP	B
		SR1.6/13	Novais/SP	A
		SR3/27	Catanduva/SP	A
Plantas resistentes Tangerina poncã (<i>C. reticulata</i>)	<i>M. fujisawaense</i>	PR5/4; PR5.1/1	Colina/SP	F
	<i>M. mesophilicum</i>	PR1/3; PR1.4/10	Novais/SP	A
		PR2/2	Elisiário/SP	A
		PR3/5	Catanduva/SP	H
		PR3/11; PR3/15;	Catanduva/SP	A
	<i>M. zatmanii</i>	PR3/8; PR3/17	Catanduva/SP	B

FIG. 7. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de ramos de citros por DGGE da região 968-1401 do gene do rRNA 16S. 01) Plantas doentes; 02) Plantas escape; 03) Plantas sadias; 04) Poncã; M) Marcador obtido com a amplificação do fragmento 968-1401 do gene do rRNA 16S de cultura pura de *X. fastidiosa*, *C. flaccumfaciens* e *M. mesophilicum*.

FIG. 8. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de ramos de citros por DGGE da região 968-1401 do gene do rRNA 16S, previamente amplificado com primers específicos para A) α -proteobactéria e B) β -proteobactéria. 01) Plantas sadias; 02) Plantas doentes; 03) Plantas escape; 04) Poncã; M) Marcador obtido com a amplificação do fragmento 968-1401 do gene do rRNA 16S de cultura pura de *C. flaccumfaciens*, *M. mesophilicum* e *M. extorquens*. A seta indica a banda de β -proteobactéria rica em GC e específica para plantas escape.

2.4. DISCUSSÃO

O conhecimento da estrutura populacional de bactérias endofíticas ao longo de um período é fundamental para o entendimento de como elas são influenciadas pelo ambiente, e também de possíveis interações destas com o surgimento de sintomas de doenças como a CVC. O nicho ecológico ocupado por bactérias endofíticas é um ambiente dinâmico, no qual muitos fatores podem afetar a estrutura e a diversidade da população bacteriana que coloniza raiz, caules, ramos e folhas. Estudos anteriores têm mostrado que a comunidade endofítica varia espacialmente na planta (Fisher *et al.*, 1992) bem como depende da interação com outras bactérias (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997b), as quais podem ser endofíticas ou patogênicas.

O método utilizado neste estudo para isolar bactérias endofíticas pode ter sido tendencioso para certos grupos bacterianos de crescimento rápido, pois estes grupos poderiam inibir aqueles de crescimento mais lento. Entretanto, a alta biodiversidade bacteriana observada e associada ao isolamento de bactérias de crescimento lento como *Nocardia* sp., *Methylobacterium* spp. e *C. flaccumfaciens* mostram que possivelmente a maior parte da comunidade bacteriana cultivável de citros esteve representada neste estudo.

Segundo Sturz & Matheson (1996), algumas formas de resistência a doenças podem envolver uma predisposição da planta a ser colonizada por endófitos específicos, os quais poderiam conferir este caráter. Dessa forma, a resistência associada com a presença de microrganismos endofíticos, pode aumentar se a população de endófitos for capaz de se estabelecer na planta hospedeira. Neste contexto, pode-se inferir que a presença de uma banda específica em plantas escapes e o fato de *C. flaccumfaciens* ser mais freqüentemente isolada nestas plantas, poderia

estar relacionada à resistência à *X. fastidiosa*. De fato, utilizando primers descritos por Pooler & Hartung (1995), foi diagnosticada a presença de *X. fastidiosa* em plantas escape e doentes. Entretanto, se a intensidade da banda for diretamente correlacionada com a concentração de bactérias, pode ser especulado que a população de *X. fastidiosa* permanece baixa em plantas escape. Até o presente momento, não foi verificada correlação entre a ausência de sintomas nestas plantas escape com fatores bióticos, abióticos, ou com o genótipo da planta. Pode-se dessa forma, ser sugerido, que a presença de microrganismos endofíticos como *C. flaccumfaciens* estaria associada à resistência à CVC, mantendo a população de *X. fastidiosa* em níveis tolerados pela planta, sem causar sintomas na mesma. Se considerarmos que resistência vem a ser a redução do número de células do patógeno no tecido hospedeiro, podemos inferir que realmente houve indução de resistência nas plantas escape. Outros trabalhos têm mostrado que *C. flaccumfaciens* pode induzir resistência sistêmica (ISR) em pepino, resultando no controle de inúmeros patógenos (Raupach & Kloepper, 1998) ou controlar *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* em batata, por meio de antibiose (Sturz & Matheson, 1996).

A caracterização de comunidades bacterianas endofíticas por meio da separação de 16S rDNA por DGGE, nos dá a oportunidade de comparar a estrutura populacional de inúmeras amostras, independente do cultivo dos indivíduos. No presente estudo, foi verificada uma baixa divergência nos géis de DGGE, a qual sugere que a presença de *X. fastidiosa* nas plantas escape e plantas doentes tem um efeito reduzido sobre a população endofítica de citros. Entretanto, para a subclasse β -proteobactéria, foi observada uma banda rica em GC presente somente em plantas escape, e também uma maior quantidade de bandas em plantas doentes, as quais

devem representar diferentes grupos bacterianos presentes. Pode-se então sugerir que as plantas doentes são mais susceptíveis à colonização por bactérias que as plantas escape. Dessa forma, *X. fastidiosa* e outras bactérias presentes na planta poderiam se multiplicar e colonizar intensamente o hospedeiro, como observado com *Methylobacterium* spp., a qual colonizou preferencialmente plantas doentes.

Uma possível razão para esta maior diversidade em plantas com sintomas de CVC, poderia ser como já sugerido anteriormente, determinado por uma ISR, a qual seria ativada por *C. flaccumfaciens* e/ou pela β -proteobactéria representada pela banda rica em GC. Trabalhos recentes sugerem que a colonização por *P. fluorescens* e *P. putida* em arroz (Krishnamurthy & Gnanamanicham, 1997) e a penetração ativa de bactérias endofíticas em algodão com hidrólise de celulose, causando reação de hipersensibilidade no hospedeiro (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997a), levariam a ISR contra patógenos. A presença de *C. flaccumfaciens* e/ou a supostamente não cultivável β -proteobactéria, rica em GC no interior de ramos das plantas escape poderiam ativar uma ISR, aumentando a resistência destas ao estabelecimento de bactérias endofíticas ou de *X. fastidiosa*.

Esta hipótese pode também ser reforçada pelos resultados obtidos com a análise da diversidade de *Methylobacterium* spp. Embora este grupo tenha sido intensamente observado em todos os hospedeiros estudados, e principalmente de plantas doentes; em plantas escape foi observado apenas um genótipo de *M. mesophilicum*, o qual poderia ser capaz de colonizar a planta com ISR. Os outros genótipos de *Methylobacterium* que não foram capazes de colonizar estas plantas escape, pois devem ser sensíveis a esta possível resistência sistêmica induzida ou pela competição com as bactérias que melhor colonizam este hospedeiro, como *C.*

flaccumfaciens e a β -proteobacteria não cultivável rica em GC.

Os resultados apresentados mostram a importância da utilização de metodologias que permitam estudar comunidades microbianas cultiváveis e também àquelas não cultiváveis, que poderiam estar associadas a patógenos ou à resistência a estes. Estudos futuros deverão ser conduzidos na análise da natureza desta bactéria não cultivável presente em plantas escape, bem como no processo de resistência destas plantas a CVC e a sua associação com *C. flaccumfaciens*. Também deverá ser estudada a possibilidade da utilização destes microrganismos endofíticos para o controle biológico da CVC e de outras doenças de citros.

CAPÍTULO 3

**GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE) ASSOCIADO À
SONDA ESPECÍFICA PARA A REGIÃO HIPERVARIÁVEL 6 DO GENE DE rRNA 16S
PARA O ESTUDO DE POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BATATA**

**(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) associated to Probe
Target to Hypervariable 6 Region of 16S rRNA gene to Study
Endophytic Bacterial Population of Potato)**

W. L. Araújo¹, W. Maccheroni, Jr.¹, J. D. van Elsas², J. L. Azevedo³

*Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, Piracicaba, Brasil¹, Plant Research International, Wageningen University and
Research Center, Wageningen, The Netherlands,² e Núcleo Integrado de Biotecnologia,
Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil³*

**GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE) ASSOCIADO À
SONDA ESPECÍFICA PARA A REGIÃO HIPERVARIÁVEL 6 DO GENE DE rRNA 16S PARA
O ESTUDO DE POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS**

RESUMO

Investigações foram conduzidas para se determinar se a técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) associado a sondas específicas para a região hipervariável 6 (V6) do gene do rRNA 16S das bactérias alvo poderiam ser utilizadas para o estudo de microrganismos endofíticos. Plantas de batata (*Solanum tuberosum*) inoculadas com as bactérias *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Methylobacterium mesophilicum* e *M. extorquens*, isoladas endofiticamente de *Citrus sinensis* foram utilizadas como modelo. Após inoculação na raiz, as três espécies endofíticas foram isoladas principalmente deste órgão. Entretanto, *C. flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* também foram isoladas de caule, mostrando que colonizaram o hospedeiro de forma sistêmica. Utilizando a técnica de DGGE seguida de hibridização com sondas V6 foi possível verificar que estas bactérias exóticas colonizaram ativamente a raiz de batata, mas não afetaram a comunidade endofítica natural do hospedeiro, pois, não foi constatada alteração no padrão de bandas associadas à presença destas bactérias. Esta estratégia permitiu verificar que *Pseudomonas aureofaciens* colonizou todas as plantas analisadas, mas esta bactéria não foi isolada em meio de cultura. *Corynebacterium aquaticum* e *Enterobacter cloacae* foram verificados nos géis de DGGE, mas *E. cloacae* foi específica para amostras de raiz. Os resultados sugerem que a técnica de DGGE poderá ser uma poderosa ferramenta para o estudo de bactérias endofíticas, permitindo o estudo grupos bacterianos não cultiváveis associados às plantas.

**DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE) ASSOCIATED TO PROBE
TARGET TO HYPERVARIABLE 6 REGION OF 16S rRNA GENE TO STUDY ENDOPHYTIC
BACTERIAL POPULATION IN POTATO**

ABSTRACT

Investigations were conducted to determine if the DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) technique associated to specific probe target to hypervariable 6 (V6) region to 16S rRNA gene could be used to study of endophytic bacteria. Potato plants (*Solanum tuberosum*) inoculated with *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Methylobacterium mesophilicum* and *M. extorquens*, isolated as endophytes from *Citrus sinensis*, were used as model. Following root treatment the endophytes were isolated mainly from roots, but *C. flaccumfaciens* and *M. mesophilicum* also established an internal population in stems. *M. extorquens* was never detected in stems of these plants. Using DGGE technique followed by V6 probe hybridization, the introduced bacteria were detected mainly in roots. However, shifts in the band profile associated with the presence of these bacteria had not been observed. This result shown that these endophytes had not an effect upon the indigenous endophytic community of potato. Using this approach it was possible to show that *Pseudomonas aureofaciens*, which was not isolated in culture media, was the main bacterial endophyte in potato, using these conditions. *Corynebacterium aquaticum* and *Enterobacter cloacae* were identified in DGGE gels, but the last one was observed only in root samples. The results suggest that the DGGE technique could be a powerful tool to study of endophytic bacteria allowing the identification of new unculturable bacterial groups associated to this host.

3.1. INTRODUÇÃO

Endófitos são microrganismos que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfectados superficialmente e que não causam danos às plantas. Estes microrganismos estão presentes na maioria das espécies vegetais, habitando de forma latente ou colonizando ativamente os tecidos do hospedeiro (Hallmann *et al.*, 1997). Estes endófitos são estudados principalmente pelo isolamento de colônias em meio de cultura, utilizando-se diferentes metodologias de isolamento (Sturz, 1995; Quadts-Hallmann *et al.*, 1997a). Entretanto, esta técnica pode apresentar alguns problemas, pois, a presença de microrganismos de crescimento rápido pode dificultar a detecção de microrganismos de crescimento lento ou àqueles não capazes de crescer nos meios de cultura utilizados.

Em estudos de ecologia microbiana, tem sido observado que a maioria das bactérias presentes em um ecossistema não são cultivadas, incluindo bactérias associadas endofiticamente às plantas (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998) ou à sua rizosfera (Kluepfel, 1993). Dessa forma, os resultados obtidos somente com o isolamento de endófitos em meio de cultura, podem não refletir a comunidade endofítica, subestimando a diversidade bacteriana presente na planta estudada.

Várias técnicas têm sido utilizadas para o estudo de microrganismos endofíticos nativos ou introduzidos na planta hospedeira. Entre elas destaca-se a utilização de mutantes resistentes a antibióticos e outros inibidores (Azevedo *et al.*, 2000; Mahaffee *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 1999), coloração de células viáveis (Patriquin & Dobereiner, 1978; Bell *et al.*, 1995), microscopia eletrônica (Benhamou *et al.*, 1996; Mahaffee *et al.*, 1997; M'Piga *et al.*, 1997), detecção imunológica e

quantificação por ELISA (Quadt-Hallmann & Kloepper, 1996; Mahaffee *et al.*, 1997), autoradiografia (You *et al.*, 1995; Pleban *et al.*, 1995) e amplificação por PCR de genes específicos da bactéria alvo (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Entretanto, estas técnicas não permitem a análise de microrganismos não cultiváveis ou dificultam a análise de forma global da população endofítica da planta, restringindo o estudo a somente grupos endofíticos já conhecidos. Para se reduzir as dificuldades decorrentes de métodos dependentes de cultivo, ou àqueles que não permitem o estudo de diferentes populações endofíticas presente na planta hospedeira, o interesse tem sido focalizado no desenvolvimento de técnicas de biologia molecular capazes de permitir o estudo de endófitos em seu habitat natural. Neste contexto, a análise do gene de 16S rRNA tem sido largamente utilizada para o estudo de microrganismos do ambiente (Amann *et al.*, 1995). Das metodologias baseadas no 16S rDNA para o estudo de populações microbianas complexas, o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) tem recebido especial atenção por ter sido utilizado em diferentes habitats naturais com sucesso (Muyzer *et al.*, 1993; Brim *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 1998; Rosado *et al.*, 1998; Fantroussi *et al.*, 1999; Heuer *et al.*, 1999; Casamayor *et al.*, 2000; Yang & Crowley, 2000). O DGGE é baseado na eletroforese de fragmentos de DNA amplificados por PCR em géis de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante que aumenta linearmente. Nestes géis, os fragmentos de DNA de mesmo tamanho são separados de acordo com diferença na sequência de bases, a qual altera o ponto de desnaturação das fitas de DNA (Muyzer *et al.*, 1993).

No presente trabalho, foi descrita a colonização de plantas de batata (*Solanum tuberosum* cv. Désiré) pelas bactérias endofíticas de citros *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Methylobacterium extorquens* e *M. mesophilicum*. Foi utilizado o reisolamento em meio de cultura e estratégia independente de

cultivo, baseado na amplificação por PCR de 16S rDNA, seguido por DGGE em combinação com hibridização de sondas provenientes da região hipervariável 6 do gene de 16S rRNA das bactérias alvo.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Isolados bacterianos e condições de cultivo

As linhagens de *Curtobacterium flaccumfaciens* (ER1/6), *Methylobacterium extorquens* (AR1.6/2) e *M. mesophilicum* (SR1.6/6) isoladas de *Citrus sinensis* foram estocadas em meio TSB suplementado com 20% de glicerol à -80°C. Para produção de células durante o trabalho, os isolados foram crescidos em meio TSBA 5% (Difco).

3.2.2. Inoculação de bactérias endofíticas em plantas de batata.

Plantas de batata (*Solanum tuberosum* cv. Désiré), regeneradas em cultura de tecidos, foram colocadas em potes contendo solo e mantidas em câmaras para aclimação (umidade relativa de 80-90%, à 22°C) durante 7 dias. Após a aclimação, as plantas foram mantidas com umidade relativa (UR) de 65% a 25°C e fotoperíodo de 15 horas luz por 9 horas de escuro, por 10 dias. Após este período, as plantas foram lavadas para retirada do excesso de solo das raízes, aproximadamente 25% das raízes foi cortado dentro da suspensão bacteriana (10^6 UFC/mL) em tampão PBS (8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 Na₂HPO₄ e 0,24 g KH₂PO₄ - pH = 7,4) e mantido por 6 horas nesta suspensão. As plantas foram novamente colocadas em potes e mantidas nas mesmas condições (UR de 65% a 25°C e fotoperíodo de 15 horas luz por 9 horas de escuro).

Foram utilizados 4 tratamentos: 1) plantas inoculadas com o isolado SR1.6/6; 2) inoculado com o isolado AR1.6/2; 3) com o isolado ER1/6; 4) plantas

inoculadas com uma mistura dos três isolados, além do controle (plantas inoculadas com tampão PBS esterilizado). Foram realizadas 3 observações (10, 20 e 30 dias após a inoculação), com 5 plantas para cada tratamento em cada tempo de amostragem.

3.2.3. Desinfecção superficial de tecidos vegetais

As plantas foram lavadas em água corrente e cortadas para separação de raiz, base e ápice do caule. Os tecidos vegetais foram lavados em álcool (70%) por 1 min, e desinfetados em solução de hipoclorito de sódio (2% de Cl⁻ disponível), suplementada com Tween 20 (0,001%) por 5 min. As plantas foram enxaguadas em álcool (70%) e posteriormente em água esterilizada. Para confirmar a efetividade da desinfecção, fragmentos das plantas foram pressionados sobre meio TSBA 5% (Difco), bem como alíquotas de água da última lavagem foram também semeadas sobre meio TSBA 5% e estes, após incubação, foram examinadas para a presença de contaminantes.

3.2.4. Isolamento de bactérias endofíticas

Após desinfecção superficial dos fragmentos de plantas (item 3.2.3), 1 g dos tecidos vegetais foi cortado, macerado levemente, colocado em 3 mL de tampão Fosfato de Sódio (120 mM, pH 8,0) e agitado (120 rpm) por 1 hora. Após a agitação, alíquotas foram semeadas sobre meio TSBA 5% (Difco) suplementado com ciclohexamida (50 µg/mL). Foram utilizadas 6 repetições (placas de Petri) por planta/tratamento. As placas foram incubadas a 28°C por 6 dias. Após o crescimento bacteriano, colônias foram contadas e àquelas com morfologia semelhante aos isolados alvo, foram estocadas para confirmação da identidade.

3.2.5. Extração de DNA

3.2.5.1. Cultura bacteriana pura

Foi centrifugado 1,5 ml de cultura bacteriana por 2 min na velocidade máxima em centrífuga de tubos “eppendorf”, o precipitado foi ressuspensionado em 500 μ L de TE (10 mM de Tris-HCl; pH = 8,0) e centrifugado novamente. O precipitado foi novamente ressuspensionado em 500 μ L de TE e adicionado bolinhas de vidro (0,1 mm de diâmetro - Sigma) e 30 μ L de SDS 10%. Esta suspensão foi agitada no agitador de pérolas (“Bead beating”) por 30 s.

Foram adicionados 500 μ L de fenol e homogeneizados por inversão. A mistura foi centrifugada por 10 min (12000 g), coletada a fase aquosa e adicionados 400 μ L de clorofane (25 fenol : 24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado novamente (12000 g) por 5 min. A fase aquosa foi coletada e 400 μ L de clorofil (24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico) foram adicionados, misturados e centrifugado (12000 g) por 5 minutos. A fase aquosa foi novamente coletada, adicionado 1/10 volume de 5M NaCl e 0,6 volume de isopropanol, mantido à temperatura ambiente por 5 min e centrifugado (12000 g) por 10 min.

O precipitado foi lavado com isopropanol 80% e secado a vácuo por 5 min. O DNA foi ressuspensionado em 50 μ L de TE e a integridade do DNA foi verificada correndo 3 μ L em gel de agarose (0,8%).

3.2.5.2. Tecidos Vegetais

Após desinfecção superficial dos tecidos vegetais (item 4.2.3), 1 g foi cortado e colocado em 3 mL de tampão Fosfato de Sódio (120 mM, pH 8,0) e agitado (120 rpm) por 1 hora. Dois mL desta suspensão foram centrifugados em tubo “eppendorf”, o precipitado foi ressuspensionado em 500 μ L de tampão TE,

adicionou-se pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro - Sigma) e 30 μ L de SDS 10%. Esta suspensão foi agitada no agitador de pérolas por 30 s, adicionados 500 μ L de fenol e homogeneizados por inversão. A mistura foi centrifugada (12000 g) por 10 min, coletada a fase aquosa e adicionados 400 μ L de clorofane (25 fenol : 24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado (12000 g) por 5 min. A fase aquosa foi coletada e 400 μ L de clorofil (24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico) foram adicionados, homogeneizados e centrifugado (12000 g) por 5 min. A fase aquosa foi novamente coletada, adicionado 1/10 volume de 5M NaCl e 0,6 volume de isopropanol, incubado à temperatura ambiente por 5 min e centrifugado (12000 g) por 10 min. O precipitado foi lavado com isopropanol 80% e secado à vácuo por 5 min. O DNA foi ressuspendido em 50 μ L de TE e purificado utilizando sistema Wizard (Wizard DNA cleanup system, Promega, Madison, WI, USA). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (0,8%).

3.2.6. PCR

As reações de PCR para análise de DGGE foram realizadas num volume de 50 μ L, contendo 2 μ L (0,5 a 10 ng) de DNA molde, 0,2 μ M de cada primer, 200 μ M de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (Pharmacia); 3,75 mM de MgCl₂; 5,0 U de Amplitaq DNA polimerase - "Stoffel fragment" (Perkin-Elmer/Cetus Nieuwerkerk, The Netherlands), 0,25 μ g T4 Gene 32 Protein e 1% de formamida em 50 mM KCl e 20 mM Tris - HCl, pH 8.4. Em todos os experimentos foi adicionado um controle negativo. Para analisar a diversidade da comunidade bacteriana endofítica de citros via DGGE, o gene 16S rRNA foi amplificado utilizando os primers R1387 e U968-LGC (tabela 1). Foi utilizado o termociclador PTC-100 (Programable Thermal Controller; MJ Reserch, Inc. USA), o qual foi programado para gerar uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, 2 ciclos a 94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 2

min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 59°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 20 ciclos a 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min e uma extensão final de 10 min a 72°C. Foram utilizados 5 µL da reação para a observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 450 pb.

3.2.7. Análise por DGGE

A análise de DGGE, baseado no método citado por Muyzer *et al.* (1993) foi realizada no sistema Ingeny phorU2 (Ingeny, Leiden, The Netherlands). Os produtos de PCR foram colocados em gel de poliacrilamida (6% acrilamida) vertical, com um gradiente desnaturante de 40-60% de uréia/formamida, onde 100% de desnaturação contém 7M de Uréia e 40% de Formamida. Foi aplicada uma corrente elétrica (100 volts) por 15 horas, para que produtos de PCR de mesmo tamanho fossem separados de acordo com a concentração de CG nos fragmentos de 450 pb. Após a eletroforese o gel foi corado com SYBR GreenI (diluído 1:10000; Gold Nucleic Acid Gel Stain; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) diluído em tampão TAE (40,0 mM Tris-Acetato; 1,0 mM EDTA) e observado sobre Luz Ultra Violeta. Eventualmente, o gel foi corado com prata (Bio Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands).

3.2.8. Eletro-transferência dos géis de DGGE

Após observação, os géis foram transferidos eletricamente (400Ω e voltagem não excedendo 25V, por 1 hora) em membrana de Nylon (Boehringer-Mannheim, Germany). Após a transferência, o gel foi incubado por 15 min em solução desnaturante (400 mM NaOH; 600 mM NaCl), lavado duas vezes em 2,5 X

SSC (37,5 mM Citrato de Sódio; e 375 mM NaCl) e incubado em Luz U.V (302 nm) por 45 segundos. A membrana foi armazenada à -20°C e antes da primeira hibridização foi incubada a 120°C por 20 min.

3.2.9. Desenvolvimento da Sonda V6

A sonda a partir da região hipervariável 6 (V6) do gene que codifica a sub-unidade 16S do RNA ribossômico foi preparada de acordo com Heuer *et al.* (1999). O fragmento de gene 16S rRNA contendo a Região V6, foi amplificado utilizando os primers R1378 e F968 (Tabela 1), purificados (High Pure™ PCR Product Purification Kit, Boeringher Mannheim) e clonados no plasmídio pGEM-T, de acordo com as instruções do fabricante (pGEM®-T Easy Vector System II, Promega). Este plasmídio contendo o inserto foi utilizado para gerar a sonda V6.

O plasmídio contendo a região 968 - 1387 do gene 16S rRNA foi utilizado como molde para reação de amplificação da região V6 com os primers F985PTO X R1046PTO (Tabela 1), nas condições descritas por Smalla *et al.* (1998). A reação de PCR foi realizada com DIG-dUTP, o qual foi incorporado à sonda, com os seguintes ciclos: um ciclo de 5 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C; 30 s a 50°C; e 30 s a 72°C com uma extensão final de 10 min a 72°C. O produto de PCR foi purificado usando o Kit QIAEX II (Qiagen) e digerido por 15 min a 37° C com um 1U/μL de exonuclease T7 gene 6 no tampão da enzima (U.S. Biochemicals, Cleveland, Ohio) para remoção dos oligonucleotídeos dos primers até a ligação Phosphorotioate. Os fragmentos resultantes foram novamente purificados com o Kit QIAEX II (Qiagen) e as fitas simples de DNA remanescentes dos primers foram digeridas com nuclease especificada para fita simples (Mung Bean Nuclease, Amershan International, Little Chalfont, England).

TABELA 1. Primers usados para amplificação e sequenciamento do gene de 16S rRNA.

Primer ^a	Alvo no 16S rDNA ^b	Sequência (5'→3')
F968_LGC	Bactéria; posição 968 a 984	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGG-AACGCGAAGAACCTTAC ^c
R1378	Bactéria; posição 1378 a 1401	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
F985PTO	Bactéria; posição 968 a 985	AACGCGAAGAACCTTAC ^S C
R1046PTO	Maioria das bactérias; posição 1046 a 1062	ACAGCCATGCAGCACC ^S T
968F	Bactéria; posição 968 a 984	AACGCGAAGAACCTTAC

^a F, primer 5'; R, primer 3'; PTO, ligação phosphorothioate na posição da sequência marcada com "S" sobrescrito.

^b Posições de acordo com o anelamento no gene de rRNA 16S de *Escherichia coli*.

^c 5' grampo de GC (anterior ao hífen)

Os produtos foram novamente purificados com o Kit QIAEX II (Qiagen) e utilizados como sonda para a detecção deste fragmento, específico para as bactérias alvo, nos géis de DGGE.

3.2.10. Hibridização com a Sonda V6

A hibridização foi realizada em condição de alta severidade a 62°C por 18 horas. Após o anelamento à sonda, a membrana foi lavada e a detecção da sonda anelada ao DNA foi realizado como recomendado por Boehringer (Mannheim, Germany). A solução de hibridização continha 5% do reagente de bloqueio (Boehringer-Mannheim, Germany), 1X SSC (0,15M NaCl; 15 mM de Citrato de

Sódio), 0,1% *N*-laurilsarcosinato e 0,02% SDS.

Após a detecção as membranas foram lavadas em solução desnaturante como recomendado por Boehringer (Mannheim, Germany) e enxaguadas 2 vezes em 1X SSC por 15 min cada lavagem, para completa remoção das sondas, e mantidas à -20°C.

3.2.11. Condições para ERIC PCR

As reações de ERIC PCR foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo 1 µL (0,5 a 10 ng) de DNA molde (extraído de acordo com o item 3.2.6); 3,25 mM de MgCl₂; 0,75 mM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (Pharmacia); 0,5 µM do primer ERIC 1R (5' - ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C - 3'), 0,5 µM do primer ERIC 2 (5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G - 3'); 4,5 U de Expand Long Template PCR System (Roche) 3,7 ng/µL de T4 Gene 32 Protein (USB) e 1X o tampão da enzima (2,25 mM MgCl₂). O termociclador foi programado para gerar uma desnaturação inicial de 7 min a 95°C, 30 ciclos de 30 seg a 90°C; 1 min a 95°C; 1 min 52°C e 8 min 65°C. Após os 30 ciclos uma extensão final de 16 min a 68°C. Dez µL da reação foram observados em gel de agarose (1,5%).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Determinação de bactérias endofíticas cultiváveis de *Solanum tuberosum*

Foi verificado que a técnica de desinfecção superficial utilizada neste trabalho se mostrou eficiente, pois, nenhum crescimento foi verificado nas placas controle. Após maceração dos tecidos vegetais e semeadura das soluções resultantes, foi constatada uma intensa comunidade bacteriana endofítica nas plantas analisadas (tabela 2).

TABELA 2. Densidade total de bactérias endofíticas isoladas de plantas de batata após inoculação na raiz. Tratamento 1) plantas inoculadas com *Methylobacterium mesophilicum* (SR1.6/6); 2) *M. extorquens* (AR1.6/2); 3) *Curtobacterium flaccumfaciens* (ER1/6); e 4) mistura das três espécies. As plantas controle foram mantidas em tampão PBS. Foram utilizadas 5 plantas para cada tratamento.

Tratamentos	Raiz			Base do caule			Ápice do caule		
	10 dias	20 dias	40 dias	10 dias	20 dias	40 dias	10 dias	20 dias	40 dias
1	0,42 ± 0,16 ^a	0,24 ± 0,22	0,89 ± 0,12	0,46 ± 0,43	0,54 ± 0,42	0,33 ± 0,07	0,71 ± 0,3	0,18 ± 0,14	0,07 ± 0,07
2	0,46 ± 0,11	0,98 ± 0,08	0,86 ± 0,03	1,04 ± 0,0	0,46 ± 0,3	0,78 ± 0,06	1,12 ± 0,07	1,32 ± 0,04	0,33 ± 0,05
3	0,65 ± 0,35	0,92 ± 0,07	0,91 ± 0,03	1,046 ± 0,56	0,23 ± 0,13	0,78 ± 0,05	1,48 ± 0,34	2,11 ± 0,17	0,21 ± 0,12
4	0,24 ± 0,11	0,46 ± 0,39	0,74 ± 0,05	1,20 ± 0,2	0,69 ± 0,27	0,64 ± 0,06	1,18 ± 0,11	0,64 ± 0,31	0,36 ± 0,08
Controle	0,14 ± 0,08	1,08 ± 0,25	0,94 ± 0,04	0,65 ± 0,22	0,76 ± 0,2	0,67 ± 0,08	0,67 ± 0,24	1,02 ± 0,08	0,38 ± 0,1

^a Valores calculados a partir do Log10 UFC x 10⁵/g de tecido vegetal fresco ± desvio padrão da média

TABELA 3. Densidade de bactérias endofíticas reisoladas de plantas de batata após 10 dias de inoculação na raiz. Tratamento 1) inoculadas com *Methylobacterium mesophilicum* (SR1.6/6); 2) *M. extorquens* (AR1.6/2); 3) *Curtobacterium flaccumfaciens* (ER1/6); e 4) mistura das três espécies. As plantas controle foram mantidas em tampão PBS. Foram realizadas 5 plantas para cada tratamento.

Tratamentos	Raiz			Base do caule			Ápice do caule		
	SR1.6/6	AR1.6/2	ER1/6	SR1.6/6	AR1.6/2	ER1/6	SR1.6/6	AR1.6/2	ER1/6
1	1,05±0,08 ^a	0,0	0,0	1,54±0,07	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	1,91±0,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,17±0,29	0,0	0,0	1,42±0,04
4	1,22±0,16	0,79±0,16	0,38±0,13	0,0	0,0	0,95±0,34	0,0	0,0	0,0
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

^a Valores foram calculados a partir do Log10 UFC x 10³/g de tecido vegetal fresco ± o desvio padrão da média.

FIG. 1. Perfil de DGGE de raízes de plantas de batata após 10 dias de inoculação com (01) com *M. mesophilicum*; (02) com *C. flaccumfaciens*; (03) com *M. extorquens*; (04) com a mistura das três espécies e (05) com tampão PBS. Bandas clonadas e seqüenciadas indicam presença de (C1) *Enterobacter cloacae*, (C2) *Corynebacterium aquaticum* e (C3) *Pseudomonas aureofaciens*, (C4) DNA plastidial. Gel hibridizado com sonda V6 proveniente de (A) *M. mesophilicum* e (B) *C. flaccumfaciens*. O marcador (M) foi feito com uma mistura do fragmento 968-1401 do rRNA 16S dos isolados inoculados.

FIG. 2. Perfil de DGGE de plantas de batata após 20 dias de inoculação na raiz com (1) *M. mesophilicum*; (2) *C. flaccumfaciens*; (3) *M. extorquens*; (4) com uma mistura das três espécies e (4) com tampão PBS. Bandas clonadas e seqüenciadas indicam presença de (a) *E. cloacae*, (b) *C. aquaticum* e (c) *P. aureofaciens*. Seta indica posição de bactérias inoculadas nos tecidos vegetais. (M) Marcador foi obtido com uma mistura do fragmento 968-1401 do gene de rRNA 16S, amplificado de cultura pura das espécies inoculadas nas plantas.

FIG. 3. Perfil de DGGE de de raízes de plantas de batata após 40 dias de inoculação com (01) *M. mesophilicum*; (02) *C. flaccumfaciens*; (3) *M. extorquens*; (04) com a mistura das três espécies e com (05) tampão PBS. O marcador foi obtido com uma mistura do fragmento 968-1401 do gene de rRNA 16S de cultura pura dos isolados inoculados nas plantas estudadas. As setas indicam a presença de rDNA das bactérias alvo no gel.

Foi observada diferença após 10 e 20 dias na densidade de bactérias endofíticas entre as plantas inoculadas. Entretanto, após 40 dias a densidade bacteriana estabilizou-se, não sendo mais verificada diferenças entre os tratamentos.

Os endófitos introduzidos nas plantas hospedeiras foram reisolados somente após 10 dias da inoculação, não sendo mais observados nas amostragens após 20 e 40 dias. Cada espécie utilizada neste trabalho apresentou um padrão de colonização diferente para cada parte da planta. *M. extorquens* colonizou somente a raiz, enquanto que *M. mesophilicum* (SR1.6/6) foi observada tanto na raiz como na base do caule. *C. flaccumfaciens* (ER1/6) colonizou a raiz quando inoculada com as demais e o ápice do caule quando inoculada sozinha (tabela 3). A concentração média do isolado SR1.6/6 em plantas de batata após inoculação na raiz chegou a $1,54 \times 10^3$ UFC/g tecido fresco do caule e $1,05 \times 10^3$ UFC/g tecido fresco da raiz, enquanto que o isolado ER1/6 foi observado das três regiões da planta, mas principalmente do caule, onde alcançou a densidade de $1,42 \times 10^3$ UFC/g tecido fresco do ápice do caule. O isolado AR1.6/2 não foi observado do caule das plantas analisadas. As colônias com morfologia semelhante aos isolados inoculados nas plantas de batata foram coletadas aleatoriamente das placas de Petri e comparadas por ERIC PCR com o padrão das bactérias de interesse. Todos os suspeitos foram identificados como sendo as bactérias inoculadas.

Os isolados de *M. mesophilicum*, *M. extorquens* e *C. flaccumfaciens*, não foram observados em plantas controle. Entretanto, populações de *Bacillus* sp., *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas* sp. e *Stenotrophomonas maltophilia* foram isoladas destas plantas e dos tratamentos.

3.3.2. Determinação do perfil de DGGE das plantas de *Solanum tuberosum* e identificação dos isolados bacterianos inoculados por meio de sondas V6

Juntamente com o isolamento das bactérias endofíticas de batata em meio de cultura, foi realizada a análise por DGGE destas plantas com o objetivo de se estudar a colonização destas bactérias e o seu efeito sobre a comunidade endofítica deste hospedeiro. Esta análise foi feita após amplificação do fragmento 968-1387 (posição equivalente ao genoma de *E. coli*) do gene do rDNA 16S diretamente do DNA total extraído dos tecidos vegetais, utilizando os primers para esta região (tabela 1).

Se for considerado que as bandas de DNA obtidas de géis de DGGE representam as populações bacterianas mais importantes das amostras analisados, pode ser sugerido por meio da comparação visual do perfil de bandas dos tecidos vegetais amostrados que a comunidade endofítica de batata foi constituída de poucos grupos bacterianos dominantes (bandas intensas), sendo a maior parte da comunidade composta por grupos menos dominantes (bandas fracas). Uma destas bandas predominantes, rica em GC, presente em todas as amostras estudadas foi identificada como pertencente ao DNA plastidial da planta, o qual foi amplificado do DNA extraído dos tecidos vegetais. Esta banda foi muito mais intensa em tecidos dos caules (Fig. 1).

Utilizando a técnica de DGGE foi verificada a presença das bactérias inoculadas principalmente nas raízes das plantas (Fig. 1 e 2). De acordo com a intensidade das bandas, pode ser inferido que os isolados ER1/6 (*C. flaccumfaciens*) e SR1.6/6 (*M. mesophilicum*) foram as espécies dominantes nas plantas inoculadas com os mesmos, nas condições utilizadas. Entretanto, contrariando os dados de isolamento, o isolado AR1.6/2 de *M. extorquens* raramente foi encontrado nas plantas inoculadas. A análise de DGGE também possibilitou a verificação de que *M.*

mesophilicum, *M. extorquens* e *C. flaccumfaciens* tiveram pouco efeito sobre a comunidade bacteriana endofítica de batata, visto que não foi observada diferença entre a comunidade bacteriana presente nos tratamentos e nos controles, utilizando esta metodologia de DGGE.

Utilizando as sondas V6 foi possível confirmar a identidade das bandas originadas dos isolados alvos, bem como constatar a presença dos isolados no caule de plantas após 10 dias de inoculação (Fig. 1).

O padrão de DGGE das amostras teve, além das bandas das bactérias inoculadas, pelo menos mais 13 bandas, as quais não foram correlacionadas com os tratamentos analisados. Foram verificados perfis eletroforéticos semelhantes para as amostras de 10 e 20 dias. Entretanto, após 40 dias o perfil foi diferente, apresentando um número maior de bandas. Em alguns casos, bandas individuais não estavam presentes em todas as repetições de um mesmo tratamento, sugerindo que a colonização de certos grupos bacterianos foi aleatória.

A identidade das espécies bacterianas, associadas às bandas mais intensas nas amostras, foi determinada cortando a banda do gel, reamplificando, clonando e sequenciando. Foi verificada a presença de duas bandas na maioria das plantas amostradas nos 3 tempos. Estas duas bandas (denominadas de banda C) foram similares, de acordo com a análise no BLAST (Altschul *et al.*, 1997), à sequência de *Pseudomonas aureofaciens* (sin.: *P. fluorescens* biótipo E). Uma segunda banda (banda A) presente somente em raiz foi similar a *Enterobacter cloacae*. Esta bactéria foi intensamente isolada deste órgão nas plantas amostradas. Também foi verificada a presença de uma banda (banda B) com similaridade a *Corynebacterium aquaticum* (Fig. 3).

3.4. DISCUSSÃO

O nicho ocupado pelas bactérias endofíticas é muito dinâmico. As características deste ambiente são dependentes das condições nutricionais das plantas hospedeiras e também da capacidade de bactérias presentes no ambiente em colonizar este nicho. Até o presente momento, o estudo de populações endofíticas foi realizado por meio de métodos dependentes de cultivo que mostram a população dominante ou àquela que apresenta maior capacidade de crescimento em meio de cultura artificial, dificultando a análise de populações de crescimento lento e de bactérias não cultiváveis. Outras formas de estudo que incluem hibridização *in situ* de DNA ou RNAs específicos e auto-radiografia têm sido utilizadas (Hallmann *et al.*, 1997). Contudo, estas técnicas são extremamente laboriosas e de alto custo, dificultando a sua utilização.

Neste trabalho, a intensidade da banda proveniente de DNA plastidial, associada com o baixo número de bandas presentes em amostras de caule sugerem que as amplificações podem ter sido tendenciosas para este DNA. Neste caso, seria necessária a utilização de primers específicos para bactérias, ou para diferentes grupos bacterianos, evitando a amplificação do DNA originado da planta. Este problema associado a amplificação do gene de rDNA 16S tem sido discutido por diversos autores (Suzuki *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 1998), os quais afirmam que alguns primers podem ser tendenciosos a DNAs específicos. Os autores sugerem que este problema poderia ser minimizado pela utilização de mais de um conjunto de primers.

No presente estudo foi verificado que *C. flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* originalmente isoladas de citros foram capazes de colonizar intensamente plantas de

batata, sendo observadas por meio de isolamento em placa de Petri e também por meio de DGGE, nas raízes e no caule das plantas tratadas. *M. extorquens* foi isolada apenas da raiz das plantas estudadas, mas a sua detecção por DGGE somente foi possível utilizando a sonda V6 para amplificação do sinal. Estas sondas desenvolvidas de acordo com Heuer *et al.* (1999) foram específicas para as bactérias alvo (dados não mostrados), permitindo confirmar a identidade das bandas suspeitas, bem como amplificar os sinais que, devido à baixa concentração do produto da PCR, não puderam ser visualizados diretamente no gel de DGGE. Esta estratégia também pode ser utilizada para o estudo de bactérias não cultiváveis, pois, pode permitir o desenvolvimento de sondas específicas para estas bactérias que poderiam ser utilizadas para hibridização em géis de DGGE ou para hibridização *in situ*.

O fato das bactérias alvo não terem sido isoladas de raízes após 20 e 40 dias, mas terem sido detectadas por DGGE mostra que o isolamento destas bactérias endofíticas não foi possível quando a população natural de batata já estava estabelecida, pois, espécies como *E. cloacae*, *P. agglomerans* e *Bacillus* spp. isoladas nestes tempos, apresentam crescimento rápido, mascarando a presença de bactérias de crescimento lento como *M. mesophilicum*, *M. extorquens* e *C. flaccumfaciens*. Entretanto, a utilização do DGGE associado à sonda V6 permitiu a constatação da presença destas bactérias nas plantas de interesse, mesmo não sendo detectadas por semeadura.

Neste trabalho, foi observado que *C. flaccumfaciens* foi isolada de tecidos da raiz do hospedeiro somente quando coinoculada com *Methylobacterium*, sugerindo uma interação entre elas durante o processo de colonização da planta. Todavia, a coinoculação das bactérias, não resultou em diferença significativa na concentração

destas no hospedeiro, mostrando que não deve haver sinergismo ou competição entre estas bactérias. De acordo com Quadts-Hallmann *et al.* (1997b), este resultado se deve provavelmente ao fato destas bactérias ocupar diferentes nichos no interior da planta. Outros experimentos devem ser conduzidos para elucidar esta questão.

Se for considerado que as bandas de DNA obtidas de géis de DGGE representam as populações bacterianas mais importantes das amostras analisadas, pode ser sugerido que a população natural de batata não foi afetada pela presença das bactérias endofíticas de citros, pois, não foi constada presença ou ausência de bandas correlacionadas aos tratamentos.

Dos fragmentos seqüenciados, as bandas "c" foram as mais interessantes, pois, apresentaram seqüências similares a *P. aureofaciens* e também foram sempre observadas associadas no gel, mostrando que devem pertencer ao mesmo isolado. Este fato pode ser verdade, pois, segundo Yang & Crowley (2000) certas bactérias podem apresentar mais que uma banda, mostrando polimorfismo para este gene dentro de um mesmo indivíduo. As demais bandas identificadas mostraram a similaridade com *E. cloacae*, a qual foi específica para raiz e *C. aquaticum* observada em raízes e caules das plantas analisadas. Destas três espécies, somente *E. cloacae* foi isolada em meio de cultura, mostrando a importância da associação dos dois métodos.

Dessa forma, o uso da caracterização da comunidade bacteriana endofítica por meio de DGGE pode ser um importante método para a verificação de variações estruturais nesta comunidade, independente da capacidade de crescimento em meio de cultura das bactérias presentes. Entretanto, deve ser levada em consideração a presença de DNA plastidial nas amostras utilizadas na PCR; este DNA poderia, por

competição, inibir a amplificação de DNA de bactérias de importância para a planta, dificultando a análise. Neste contexto, o emprego de primers que não apresentam homologia com o DNA destas organelas poderá ser importante para a utilização desta metodologia para o estudo de bactérias endofíticas.

Os dados apresentados mostram que as espécies *C. flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* colonizam raízes e caules de batata, não causando danos às mesmas. Também foi observado que a análise de DGGE associada à sondas provenientes da região hipervariável 6 do gene de rRNA 16S podem ser utilizadas eficientemente para os estudos de comunidades endofíticas. Além disso, o sequenciamento de bandas do DGGE permitiu a identificação das espécies bacterianas endofíticas associadas a estas plantas, independente do cultivo das mesmas.

CAPÍTULO 4

COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Methylobacterium extorquens* E *M. mesophilicum* EM PLÂNTULAS DE CITROS

**(Endophytic Colonization by *Curtobacterium flaccumfaciens*,
Methylobacterium extorquens and *M. mesophilicum*
in Citrus Seedlings)**

**W. L. Araujo¹, W. Maccheroni, Jr.¹, J. D. van Elsas², J. W. L. van Vuurde², J.
L. Azevedo^{1,3}**

*Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de
São Paulo, Piracicaba, Brasil¹, Plant Research International, Wageningen University and
Research Center, Wageningen, The Netherlands,² e Núcleo Integrado de Biotecnologia,
Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil³*

**COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Curtobacterium flaccumfaciens*,
Methylobacterium extorquens E *M. mesophilicum*
EM PLÂNTULAS DE CITROS**

RESUMO

As bactérias endofíticas *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Methylobacterium extorquens* e *M. mesophilicum* foram inoculadas em raízes e sementes de limão cravo (*Citrus limonia*), o efeito destas bactérias sobre a população endofítica natural e o crescimento destas plântulas foram analisados. Foi utilizado neste estudo a técnica de isolamento dos microrganismos em meio de cultura e também o DGGE (Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante) baseado na amplificação por PCR do gene rDNA 16S da comunidade endofítica. O DGGE associado à sonda para à região hipervariável 6 do gene rDNA 16S auxiliou na identificação das bactérias endofíticas nos DGGE. Nas condições de casa de vegetação, os endófitos inoculados tiveram um efeito qualitativo e quantitativo sobre a população endofítica de citros. No caule de plântulas inoculadas com *C. flaccumfaciens*, a população bacteriana natural foi menor que nos demais tratamentos. Ao contrário, em raízes de plântulas inoculadas com *M. extorquens* a população natural foi maior que nos demais tratamentos. Em condições axênicas, a inoculação de *C. flaccumfaciens* em sementes, resultou em um aumento do desenvolvimento da planta, enquanto que *M. extorquens* teve, nas mesmas condições, efeito deletério, reduzindo o desenvolvimento das plantas. A análise por microscopia óptica de plântulas tratadas com tetrazólio mostrou que *C. flaccumfaciens* e *M. mesophilicum* colonizam principalmente a região central do caule, próxima aos vasos condutores, enquanto que *M. extorquens* colonizou as regiões sub epidérmicas.

**ENDOPHYTIC COLONIZATION BY *Curtobacterium flaccumfaciens*,
Methylobacterium extorquens AND *M. mesophilicum*
 IN CITRUS SEEDLINGS**

ABSTRACT

Roots and seeds of *Citrus limonia* were inoculated with endophytic bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Methylobacterium extorquens* and *M. mesophilicum* to analyze seedling growth and developing endophytic colonization. These endophytic bacteria were isolated from sweet orange (*C. sinensis*), and the association with phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa* has been studied. This study was performed by culturable dependent method as well as culturable independent method, based in PCR of 16S rDNA gene. The DGGE associated to hybridization of probe target to hypervariable 6 region of 16S rRNA gene detected the endophytic bacteria mainly in seedlings roots, growing in greenhouse conditions. In these conditions, the inoculated endophytes had a qualitative and quantitative effect upon this population. In stems of *C. flaccumfaciens* inoculated seedling, the natural population of bacteria was lower, while in roots of seedlings with *M. extorquens* the natural population was higher. Following the seed treatment in axenic conditions, *C. flaccumfaciens* shown a plant growth promotion, while *M. extorquens* had a deleterious effect upon seedlings. By light microscopy, *C. flaccumfaciens* and *M. mesophilicum* colonized mainly the inner part of seedlings and *M. extorquens* was observed in sub epidermic space. The endophytic bacteria introduced in seedlings were able to colonize them and altered the plant growth and the bacterial community in these plants.

4.1. INTRODUÇÃO

Endófitos são microrganismos que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfectados superficialmente e que não causam danos às plantas (Hallmann *et al.*, 1997). Bactérias endofíticas podem ser importantes candidatas para o controle biológico, pois, colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos (Hallmann *et al.*, 1997). Dentro deste contexto, inúmeros trabalhos têm mostrado que microrganismos endofíticos exibem potencial como agente de controle biológico contra fitopatógenos (Sturz & Matheson, 1996; Duijff *et al.*, 1997; M'Piga *et al.*, 1997; Sharma & Nowak, 1998; Sturz *et al.*, 1998), insetos (Petrini *et al.*, 1989; Azevedo *et al.*, 2000), e nematóides (Hallmann *et al.*, 1998; Hallmann *et al.*, 1999). Em outros casos, os endófitos podem aumentar a síntese de compostos pela planta (Zabetakis, 1997) ou promover o crescimento do hospedeiro (Hallmann *et al.*, 1997; Lazarovits & Nowak, 1997; Pillay & Nowak, 1997; Bent & Chanway, 1998). Bactérias que apresentam a capacidade de estimular o crescimento da planta são denominadas de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Estas bactérias ocorrem naturalmente no solo e colonizam a rizosfera da planta hospedeira (Kloepper & Schroth, 1978). Entretanto, sabe-se que parte destas bactérias promotoras de crescimento habita o interior dos hospedeiros, sendo o termo PGPE (Plant Growth Promoting Endophyte) também sugerido para estes endófitos (Hallmann *et al.*, 1997).

O conhecimento da dinâmica da interação planta/bactérias endofíticas e o

desenvolvimento de estratégia para a utilização destes microrganismos com fins biotecnológicos, envolve o entendimento não só dos processos de colonização, mas também de mecanismos na planta induzidos pelas bactérias endofíticas. Poucos estudos têm sido realizados para o entendimento da interação entre plantas de citros e a comunidade bacteriana endofítica. Inúmeras bactérias endofíticas foram isoladas do xilema de raiz de limão (*C. jambhin*), incluindo *Acromobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *A. iwoffii*, *Alcaligenes-Moraxella*, *Arthrobacteri* spp.; *Bacillus* spp., *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter freundii*, *Corynebacterium* spp., *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gardner *et al.*, 1982), *Pseudomonas* spp. (Gardner *et al.*, 1985), e de folhas de porta-enxertos foram isoladas *Pantoea agglomerans*, *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* entre outros (Araújo, 1996). Entretanto, nenhum trabalho tem estudado a interação entre estas bactérias e o seu hospedeiro.

A técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), baseada na análise de perfis do gene de rDNA 16S amplificados por PCR, pode ser uma importante ferramenta para o estudo de populações bacteriana endofíticas, pois, permite o estudo e a detecção de bactérias cultiváveis e não cultiváveis (Muyzer *et al.*, 1993; Ovreas *et al.*, 1997). Os fragmentos gerados por PCR são separados em um gradiente desnaturante de Uréia/Formamida, de acordo com o ponto de desnaturação no gel (concentração de GC na fita de DNA). O padrão de bandas obtido de uma amostra representa a estrutura populacional da planta analisada, onde cada banda do gel representa um grupo bacteriano com seqüência do rDNA com um ponto de desnaturação semelhante (Kuske *et al.*, 1997). Esta estratégia tem a habilidade de mostrar a estrutura populacional das amostras analisadas, revelando tanto bactérias

cultiváveis como não cultiváveis. O DGGE tem recebido especial atenção por ter sido utilizado em diferentes habitats naturais com sucesso (Muyzer *et al.*, 1993; Brim *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 1998; Rosado *et al.*, 1998; Fantroussi *et al.*, 1999; Heuer *et al.*, 1999; Casamayor *et al.*, 2000; Yang & Crowley, 2000). Embora ainda não tenha sido usado para o estudo de bactérias endofíticas, esta técnica baseada no gene de rRNA 16S pode auxiliar na análise da comunidade endofítica, favorecendo o entendimento da interação entre a planta hospedeira e bactérias endofíticas, bem como a dinâmica de colonização de bactérias introduzidas na planta hospedeira.

Este estudo teve por objetivos (i) avaliar a resposta de plântulas de limão cravo (*Citrus limonia*) a inoculação de três bactérias endofíticas, (ii) estudar a capacidade destas bactérias em colonizar endofiticamente estas plântulas, após inoculação na semente, e (iii) analisar a interação entre a comunidade endofítica natural de plântulas de limão cravo com bactérias endofíticas introduzidas pela raiz.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Isolados bacterianos e condições de cultivo

Foram utilizadas linhagens de *Curtobacterium flaccumfaciens* (ER1/6), *Methylobacterium extorquens* (AR1.6/2) e *M. mesophilicum* (SR1.6/6) isoladas de laranja doce (*Citrus sinensis*). As bactérias foram estocadas em meio TSB (Difco) contendo 20% de glicerol à -80°C. Para produção de células durante o trabalho, os isolados foram crescidos em meio TSB.

4.2.2. Experimentos em casa de vegetação

Sementes de limão cravo (*Citrus limonia*) foram desinfectadas em solução de

hipoclorito de sódio (2% de Cl^- disponível) suplementado com 0,01% de Tween 20 por 10 min, enxaguadas em álcool (70%), e água esterilizada e colocadas em potes de solo e mantidas com umidade relativa (UR) de 65% a 25°C e fotoperíodo de 15 horas luz por 9 horas de escuro, para germinação. Após a germinação, as plântulas com aproximadamente 10 cm foram lavadas para retirada do excesso de solo das raízes, e aproximadamente 25% das raízes foi cortado na suspensão bacteriana (10^6 UFC/mL) em tampão PBS (Sambrook *et al.*, 1989) e deixado por 6 horas nesta suspensão. Após este período as plântulas foram novamente colocadas em potes e mantidas nas mesmas condições (UR de 65% a 25°C e fotoperíodo de 15 horas luz por 9 horas de escuro).

Foram utilizadas 150 plantas: 4 tratamentos (inóculo com isolado SR1.6/6, isolado AR1.6/2, isolado ER1/6 e com a mistura destes três isolados) e um controle (plantas inoculadas com tampão PBS), com 2 épocas (10 e 30 dias após a inoculação), 5 plântulas por amostragem e 3 repetições do experimento.

4.2.3. Inoculação de bactérias endofíticas em sementes de citros

As sementes foram lavadas em álcool (70%) por 1 min, desinfetados em solução de hipoclorito de sódio (2% de Cl^- disponível) suplementado com 0,01% de Tween 20 por 10 min, enxaguadas novamente em álcool (70%) e posteriormente em água esterilizada. Após a desinfecção superficial, as sementes foram colocadas em câmara úmida por 3 dias e posteriormente colocadas na solução bacteriana (10^6 UFC/mL) em tampão PBS e agitadas (120 rpm) por 18 horas. Foram utilizados os mesmos tratamentos realizados em casa de vegetação (item 3.2.2). Após esta inoculação, as sementes foram enxaguadas em água esterilizada e recolocadas em

câmara úmida por 10 dias, quando foi verificada a taxa de germinação das sementes e realizada a transferência para frascos com meio MS (Murashigue & Skoog, 1962), onde, após o crescimento foram avaliadas a taxa de ganho de massa vegetal e a presença de bactérias no interior das mesmas. Neste experimento foram avaliadas 150 plântulas (30 plântulas por tratamento).

4.2.4. Desinfecção superficial de tecidos vegetais

As plântulas foram lavadas em água corrente e cortadas para separação de raiz, e caule. Os tecidos vegetais foram lavados em álcool (70%) por 1 min, e desinfectados em solução de hipoclorito de sódio (2% de Cl^- disponível) suplementado com 0,01% de Tween 20 por 2 min. As plântulas foram enxaguadas em álcool (70%) e posteriormente em água esterilizada. Para confirmar a eficiência da desinfecção, fragmentos dos tecidos vegetais desinfectados foram pressionados sobre meio TSBA 5% (Difco) e alíquotas de água da última lavagem foram também semeadas sobre meio TSBA 5%, o qual foi examinado para o crescimento de contaminantes.

4.2.5. Isolamento de bactérias endofíticas

Após desinfecção superficial dos fragmentos de plantas (item 3.2.4), como descrito acima, os tecidos vegetais foram cortados, macerados levemente, colocados em 2 mL de tampão Fosfato de Sódio (120 mM, pH 8,0) e agitados (120 rpm) por 1 hora. Após este período, alíquotas foram semeadas sobre meio TSBA 5% (Difco) suplementado com ciclohexamida (50 $\mu\text{g/mL}$). Foram utilizadas 5 repetições (placas de Petri) por planta/tratamento. As placas foram incubadas a 28°C por 6 dias e após o crescimento bacteriano, as colônias foram contadas e selecionadas aleatoriamente

para identificação por meio do perfil de ácidos graxos celulares (FAME – Fatty Acid Methyl Ester).

4.2.6. Detecção de bactérias endofíticas na planta por Microscopia Óptica

Esta técnica foi desenvolvida por Patriquin & Döbereiner (1978) e modificada por Van Vuurde (comunicação pessoal). Após a desinfecção superficial das plântulas (inoculadas apenas com os isolados de interesse) foram mantidas em solução do herbicida Glifosato (0,1%) por 18 horas e então colocado em meio de cultura para bactéria contendo 50 ppm de Cloridrato de Tetrazólio (TTC; Sigma) e mantido por 24 a 48 horas. Após este período, as amostras foram cortadas e observadas em microscópio óptico. A presença da bactéria pode ser visualizada pela formação de pigmentação vermelha.

4.2.7. Extração de DNA

4.2.7.1. Cultura bacteriana pura

Foi centrifugado 1,5 ml de cultura bacteriana por 2 min a 12000 g (centrífuga para tubos Eppendorf), o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de TE (10 mM de Tris-HCl; pH = 8,0) e centrifugado novamente. O precipitado foi novamente ressuspendido em 500 µL de TE, adicionadas pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro - Sigma) e 30 µL de SDS 10% e a mistura foi agitada no agitador de pérolas por 30 s.

Foram adicionados 500 µL de fenol e homogeneizados por inversão. A mistura foi centrifugada por 10 min a 12000 g, coletada a fase aquosa e adicionados 400 µL de clorofane (25 fenol : 24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado novamente por 5 min a 12000 g. A fase aquosa foi coletada e 400 µl de

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

O precipitado foi lavado com isopropanol 80% e secado a vácuo por 5 min. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de TE e a sua integridade foi verificada correndo 3 µL em gel de agarose (0,8%).

4.2.7.2. Tecidos Vegetais

Após desinfecção superficial, os tecidos vegetais foram cortados, macerados levemente, colocados em 3 mL de tampão Fosfato de Sódio (120 mM, pH 8,0) e agitados (120 rpm) por 1 hora. Dois mL desta suspensão foram centrifugados, o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de tampão TE, adicionadas pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro - Sigma) e 30 µL de SDS 10%. Esta suspensão foi agitada no agitador de pérolas por 30 s, 500 µL de fenol foram adicionados e homogeneizados por inversão. A mistura foi centrifugada por 10 min a 12000 g, coletada a fase aquosa e adicionados 400 µL de clorofane (25 fenol : 24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado novamente por 5 min a 12000 g. A fase aquosa foi coletada e 400 µL de clorofil (24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico) foram adicionados, misturados e centrifugados por 5 min a 12000 g. A fase aquosa foi novamente coletada, e nesta adicionou-se 1/10 volume de 5M NaCl e 0,6 volumes de isopropanol. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente por 5 min e centrifugada nas condições anteriores. O precipitado foi lavado com isopropanol 80% e secado a vácuo por 5 min. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de TE e purificado utilizando sistema

Wizard (Wizard DNA Cleanup System, Promega, Madison, WI, USA). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (0,8%).

4.2.8. PCR

As reações de PCR para análise de DGGE foram realizadas em um volume final de 50 μ L, contendo 2 μ L (0,5 a 10 ng) de DNA molde, 0,2 μ M de cada primer, 200 μ M de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (Pharmacia); 3,75 mM de MgCl₂; 5,0 U de Amplitaq DNA polimerase - "Stoffel fragment" (Perkin-Elmer/Cetus Nieuwerkerk, The Netherlands), 0,25 μ g T4 Gene 32 Protein e 1% de formamida em 50 mM KCl e 20 mM Tris - HCl, pH 8.4. Em todas os experimentos, foi adicionado um controle negativo. Para analisar a diversidade da comunidade bacteriana endofítica de citros via DGGE, o gene 16S rRNA foi amplificado utilizando os primers R1387 e U968₁G (tabela 1). Foi utilizado o termociclador PTC-100 (Programable Thermal Controller; MJ Reserch, Inc. USA), o qual foi programado para uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, 2 ciclos a 94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 59°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 20 ciclos a 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min e uma extensão final de 10 min a 72°C. Foram utilizados 5 μ L da reação para a observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 450 pb.

TABELA 1. Primers usados para amplificação e sequenciamento de 16S rDNA.

Primer ^a	Alvo no 16S rDNA ^b	Sequência (5'→3')
F968 _⊥ GC	Bactéria; posição 968 a 984	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGGG-AACGCGAAGAACCTTAC ^c
R1378	Bactéria; posição 1378 a 1401	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
F985PTO	Bactéria; posição 968 a 985	AACGCGAAGAACCTTAC ^S C
R1046PTO	Maioria das Bactérias; posição 1046 a 1062	ACAGCCATGCAGCACC ^S T
968F	Bactéria; posição 968 a 984	AACGCGAAGAACC ^S TAC

^a F, primer 5'; R, primer 3'; PTO, ligação phosphorothioate na posição da sequência marcada com "S" sobrescrito.

^b Posições de acordo com o anelamento no gene do rRNA 16S de *E. coli*.

^c 5' grampo de GC (sequência anterior ao hífen)

4.2.9. Análise por DGGE

A análise de DGGE, baseado no método citado por Muyzer *et al.* (1993) foi realizada no sistema Ingeny phorU2 (Ingeny, Leiden, The Netherlands). Os produtos de PCR foram colocados em gel de poliacrilamida (6% acrilamida) vertical, com um gradiente desnaturante de uréia/formamida (40-60%), onde 100% de desnaturação contém 7M de Ureia e 40% de Formamida. Foi aplicada uma corrente elétrica (100 volts) por 15 horas, para que produtos de PCR de mesmo tamanho fossem separados de acordo com a concentração de CG nos fragmentos de 450 pb. Após a eletroforese o gel foi corado com SYBR GreenI (diluído 1:10000; Gold Nucleic Acid Gel Stain;

Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) diluído em tampão TAE (40,0 mM Tris-Acetato; 1,0 mM EDTA) e observado sobre Luz Ultra Violeta. Eventualmente, o gel foi corado com prata (Bio Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands).

4.2.10. Desenvolvimento da Sonda V6

A sonda a partir da Região Hipervariável 6 (V6) do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico foi preparada de acordo com Heuer *et al.* (1999). O fragmento de gene 16S rRNA contendo a Região V6, foi amplificado utilizando os primers R1387 e F968 (Tabela 1), purificados (High Pure™ PCR Product Purification Kit, Boeringher Mannheim) e clonados no plasmídio pGEM-T, de acordo com as instruções do fabricante (pGEM®-T Easy Vector System II, Promega). Este plasmídio contendo o inserto foi utilizado para gerar a sonda V6.

O plasmídio contendo a região 968 - 1401 do gene rRNA 16S foi utilizado como molde para reação de amplificação da região V6 com os primers F985PTO X R1046PTO (Tabela 1), nas condições descritas por Smalla *et al.* (1998). A reação de PCR foi realizada com DIG-dUTP, o qual foi incorporado à sonda, com os seguintes ciclos: um ciclo de 5 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C; 30 s a 50°C; e 30 s a 72°C com uma extensão final de 10 min a 72°C. O produto de PCR foi purificado usando o Kit QIAEX II (Qiagen) e digerido por 15 min a 37° C com um 1U/μL de exonuclease T7 gene 6 no tampão da enzima (U.S. Biochemicals, Cleveland, Ohio) para remoção dos oligonucleotídeos dos primers até a ligação Phosphorotioate. Os produtos foram novamente purificados com o Kit QIAEX II (Qiagen) e as fitas simples de DNA remanescentes dos primers foram digeridas com nuclease especificada para

fita simples (Mung Bean Nuclease, Amershan International, Little Chalfont, England). Os produtos foram novamente purificados com o Kit QIAEX II (Qiagen) e utilizados como sonda para a detecção deste fragmento, específico para as bactérias alvo, nos géis de DGGE.

4.2.11. Hibridização com a Sonda V6

A hibridização foi realizada em condição de alta severidade a 62°C por 18 horas. Após a hibridização, a membrana foi lavada e a detecção da sonda anelada ao DNA foi realizado como recomendado por Boehringer (Mannheim, Germany). A solução de hibridização continha 5% do reagente de bloqueio (Boehringer-Mannheim, Germany), 1X SSC (0,15M NaCl; 15 mM de Citrato de Sódio), 0,1% *N*-laurilsarcosinato e 0,02% SDS.

Após cada hibridização as membranas foram lavadas como recomendado por Boehringer (Mannheim, Germany). e enxaguadas 2 vezes em 1X SSC por 15 min para completa remoção das sondas.

4.2.12. Condições para ERIC PCR

As reações de ERIC PCR foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo 1 µL (0,5 a 10 ng) de DNA molde (extraído de acordo com o item 3.2.6); 3,25 mM de MgCl₂; 0,75 mM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (Pharmacia); 0,5 µM do primer ERIC 1R (5' - ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C - 3'), 0,5 µM do primer ERIC 2 (5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G - 3'); 4,5 U de Expand Long Template PCR System (Roche) 3,7 ng/µL de T4 Gene 32 Protein (USB) e 1X o tampão da enzima (2,25 mM MgCl₂). Foi utilizado termociclador Perkin-Elmer, o qual foi programado para gerar uma

desnaturação inicial de 7 min a 95°C, 30 ciclos de 30 seg a 90°C; 1 min a 95°C; 1 min 52°C e 8 min 65°C. Após os 30 ciclos uma extensão final de 16 min a 68°C. Dez µL da reação foram observados em gel de agarose (1,5%).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Determinação de bactérias cultiváveis endofíticas de citros

A metodologia utilizada para a desinfecção superficial dos tecidos vegetais foi eficiente, pois, não foi verificado crescimento bacteriano nas placas de Petri controle.

Nas condições utilizadas e independente do tratamento, foram isolados de caule e raiz desinfetados superficialmente as espécies *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium* sp., *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *P. corrugata* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Não foi observada diferença entre 10 e 30 dias na densidade de bactérias endofíticas nas plantas inoculadas. Entretanto, foi verificado que raiz de plantas inoculadas com os isolados AR1.6/2 e SR1.6/6 foram mais intensamente colonizadas por bactérias endofíticas (Fig. 1). Nos caules, esta relação não foi verificada, mas observou-se que plantas inoculadas com o isolado ER1/6 apresentaram densidade bacteriana menor que os demais tratamentos na primeira amostragem (10 dias) (Fig. 1).

As bactérias introduzidas foram reisoladas das plantas inoculadas e identificadas por ERIC PCR. Não foi verificada diferença na densidade das bactérias alvo entre as amostragens e quando inoculadas sozinhas ou coinoculadas com os outros endófitos (Fig. 2). A densidade média das bactérias introduzidas em plântulas de limão cravo foi de $1,44 \times 10^4$ UFC/g, $0,44 \times 10^4$ UFC/g e $0,17 \times 10^4$ g raiz para os isolados SR1.6/6, ER1/6 e AR1.6/2, respectivamente.

FIG. 1. Efeito dos isolados SR1.6/6, ER1/6 e AR1.6/2 sobre a comunidade endofítica A) de caule e B) de raiz de limão cravo, 10 e 30 dias após inoculação na raiz. Tratamentos: 1) plantas inoculadas com o isolado SR1.6/6; 2) plantas inoculadas com o isolado ER1/6; 3) plantas inoculadas com o isolado AR1.6/2; 4) plantas inoculadas com os três isolados; plantas controle foram inoculadas com tampão PBS. Barras indicam desvio padrão da média de 15 plantas por amostra.

FIG. 2. Colonização endofítica em (A) raízes e (B) caule de limão cravo por *M. mesophilicum* (SR1.6/6), *M. extorquens* (AR1.6/2) e *C. flaccumfaciens* (ER1/6), 10 e 30 dias após inoculação na raiz. Tratamento 1) plantas inoculadas com o isolado SR1.6/6; 2) plantas inoculadas com o isolado ER1/6; 3) plantas inoculadas com o isolado AR1.6/2; 4) plantas inoculadas com os três isolados; plantas controle foram inoculadas somente com tampão PBS. Densidade total inclui bactérias inoculadas e populações naturais destas plantas. Barras indicam desvio padrão das médias.

FIG. 3. Caracterização da comunidade endofítica bacteriana de plântulas de *Citrus limonia* por DGGE. A separação dos fragmentos amplificados de rDNA 16S foi realizada em um gradiente desnaturante de de Uréia/Formamida (40-60%). Foram analisadas amostras de (A) raiz e (B) caule de plântulas após 10 dias de inoculação com (1) *M. mesophilicum* (SR1.6/6); (2) *C. flaccumfaciens* (ER1/6); *M. extorquens* (AR1.6/2); (3) com os três isolados; e (4) plantas controle. Bandas indicadas foram clonadas e identificadas por sequenciamento: banda C1: *Enterobacter cloacae* ou *E. asburiae*; banda C2: *Pseudomonas* sp. ou *P. putida*; banda C3: *Pseudomonas* sp. ou *P. taetrolens*; banda C4: DNA plastidial. As setas indicam as bandas das bactérias inoculadas, de acordo com a posição dos marcadores. M) marcador obtido com a mistura dos produtos de PCR do rDNA 16S dos três isolados.

FIG. 4. Hibridização da sonda V6, originada do rDNA 16S dos isolados (A) SR1.6/6 e (B) ER1/6, no DGGE de amostras de plântulas de *C. limonia* após 10 dias de inoculação nas raízes com (1) a mistura dos isolados SR1.6/6, AR1.6/2 e ER1/6; (2) isolado AR1.6/2; (3) isolado SR1.6/6; (4) isolado ER1/6; e (5) plântulas controle. M) marcador obtido com a mistura dos produtos de PCR do rDNA 16S dos três isolados. Setas indicam a presença das bactérias alvo no caule das plantas hospedeiras.

4.3.2. Determinação do perfil de DGGE de plântulas de *Citrus limonia* e identificação dos isolados bacterianos inoculados por meio da sonda V6

A análise por DGGE de plântulas de limão cravo (*Citrus limonia*) foi utilizada para o estudo da comunidade endofítica natural após a introdução de *C. faccumfaciens*, *M. extorquens* e *M. mesophilicum*. Esta análise foi feita após PCR da região 968-1378 do gene do rDNA 16S diretamente do DNA total, extraído dos tecidos vegetais, utilizando primers universais (tabela 1). Por meio da comparação visual do perfil de bandas de DNA obtido por DGGE dos tecidos vegetais, foi verificada diferença entre as amostras de raiz e de caule. Foi observado que a comunidade endofítica natural das plântulas foi constituída de poucos grupos bacterianos dominantes (bandas intensas), sendo a maior parte da comunidade composta por grupos menos dominantes (bandas fracas). Como verificado para *Solanum tuberosum*, foi identificada uma banda de DNA plastidial (banda C4), observada em todas as amostras estudadas (Fig. 3).

No presente estudo, com exceção do isolado AR1.6/2, os isolados colonizaram sistemicamente a planta hospedeira. Entretanto, os isolados ER1/6 e SR1.6/6 não foram as espécies dominantes nestas plantas, pois, foram detectadas no DGGE somente como bandas fracas nas raízes e foram visualizados no DGGE de amostras de caule somente com auxílio da sonda V6 (Fig. 4). Estas sondas anelam na região hipervariável 6 do gene rRNA 16S, a qual é utilizada na análise de DGGE, amplificando os sinais.

O padrão de DGGE das amostras teve, além das bandas das bactérias inoculadas, pelo menos mais 13 bandas. Em alguns casos, bandas individuais não estavam presentes em todas as repetições de um mesmo tratamento, como observado

para a banda C3 (Fig. 3), a qual apresentou 99% de similaridade com *Pseudomonas* sp. (linhagem SV4) e *P. putida* (linhagens MTB5 e MTB6), sugerindo que a colonização de certos grupos bacterianos foi aleatória. Não foi observado no isolamento, qualquer bactéria com o mesmo padrão de migração no DGGE que a banda C3.

Nas plântulas estudadas foi observada uma banda intensa (C2), presente em todas as raízes e caules das plantas analisadas (Fig. 3). Após clonagem, sequenciamento e análise da sequência (Altschul *et al.*, 1997), verificou-se 100% de homologia com *Pseudomonas* sp. (linhagem 'FSL D1-022'), *P. taetrolens* e *P. lundensis*. Foi verificada uma colônia bacteriana, identificada como *P. putida* (análise por FAME), com o mesmo padrão de migração que esta banda C2 e 95% de similaridade a *Pseudomonas taetrolens*, *P. lundensis* e *P. putida*. Utilizando esta estratégia, foi também verificada que a banda C1 (Fig. 3), presente somente em raízes, apresentou 99% de similaridade com *Enterobacter cloacae*, *E. asburiae*, *Pantoea agglomerans* e uma bactéria de raiz de milho (linhagem Zmrls1AY). No isolamento em meio de cultura, foram observados colônias com padrão de migração no DGGE semelhante à C1. Esta bactéria, isolada na placa de Petri, foi identificada como *E. cloacae* (por FAME) e apresentou 92% de similaridade com *E. cloacae* (linhagem TRC-322).

4.3.3. Estudo de reinoculação de bactérias endofíticas em plântulas axênicas

4.3.3.1. Efeito de bactérias endofíticas inoculadas em limão cravo.

Após tratamento das sementes com as bactérias de interesse, não foi verificada diferença significativa na taxa de germinação entre tratamentos. Aproximadamente 60% das sementes germinaram após 10 dias, as quais foram

transferidas para tubos em condições axênicas. Entretanto, foi verificado, após 30 dias da transferência que o isolado ER1/6 estimulou o crescimento das plântulas, enquanto que o isolado AR1.6/2 inibiu o crescimento destas (Fig. 5). O isolado SR1.6/6 não teve efeito sobre as plântulas inoculadas. Este resultado foi observado tanto nas raízes como no caule das plantas estudadas. A presença dos isolados ER1/6 e SR1.6/6 não reduziu o efeito inibitório do isolado AR1.6/2 no caule, mas quando inoculados juntos, observou-se uma menor inibição na raiz por parte do isolado AR1.6/2.

FIG. 5. Avaliação do efeito de bactérias endofíticas em *C. limonia* após 20 dias de germinação. Os isolados SR1.6/6 (*Methylobacterium mesophilicum*), AR1.6/2 (*M. extorquens*) e ER1/6 (*Curtobacterium flaccumfaciens*) foram inoculados em sementes. Barras indicam desvio padrão da média obtida com 30 plântulas/tratamento.

4.3.3.2. Localização dos endófitos na planta hospedeira

A análise por microscopia das plantas inoculadas não mostrou degeneração dos tecidos amostrados. Não foi detectado crescimento bacteriano nos tecidos foliares das plântulas. Entretanto, foi verificado que as bactérias colonizaram principalmente a câmara sub estomática dos caules, a qual tornou-se vermelha nas plantas tratadas (Fig. 6). No caule, foi observado que os isolados ER1/6 e SR1.6/6 colonizaram ativamente os vasos condutores e parênquima das plântulas, enquanto que o isolado AR1.6/2 colonizou preferencialmente regiões sub-epidérmicas (Fig. 7). Na raiz, pouco crescimento bacteriano foi observado internamente, sendo, quando presente, limitado às regiões sub-epidérmicas, principalmente para o isolado AR1.6/2.

4.4. DISCUSSÃO

As bactérias endofíticas têm recebido especial atenção pelo seu potencial biotecnológico, pois, a sua aplicação para o controle biológico (Lemanceau & Alabouvette, 1993; M'Piga *et al.*, 1997; Hallmann *et al.*, 1997; Pleban *et al.*, 1997; Benhamou *et al.*, 1998, Raupach & Kloepper, 1998), estimulação do crescimento vegetal (Christiansen-Weniger, 1996; Srinivasan *et al.*, 1996; Bent & Chanway, 1997; Hallmann *et al.*, 1997; Raupach & Kloepper, 1998; Shishido & Chanway, 1999) e para o aumento de fragrância em frutos (Zabetakis, 1997), tem sido intensamente avaliado e resultados promissores têm sido obtidos.

FIG. 6. Microscopia óptica da superfície de caules inoculados com bactérias endofíticas (B, D, E, F) e planta controle (A e C). Plântulas, com 30 dias, provenientes de sementes inoculadas com (B e E) *C. flaccumfaciens*; (E) *M. extorquens*; (F) *M. mesophilicum*. Setas indicam cavidade sub-estomática de caule de plântulas de C, limonia. Presença de colônias bacterianas no interior da cavidade sub-estomática é visualizada pela coloração vermelha (B, E, F). Quadro D: presença de colônias bacterianas no espaço sub-epidérmico do caule.

Entretanto, a alta taxa de variação observada entre os resultados experimentais e os resultados de campo, tem mostrado a necessidade de maiores estudos de interação das bactérias de interesse com fatores edáficos, climáticos e bióticos envolvidos nesta associação (Bent & Chanway, 1998; Raupach & Kloepper, 1998). No presente estudo, quando as bactérias foram coinoculadas, nenhuma diferença na concentração destas no hospedeiro foi verificada mostrando que não deve haver competição entre estas bactérias, pois, a densidade populacional destes endófitos não foi afetada quando coinoculados (Fig. 2). Este resultado, como mostrado pela observação do padrão de colonização (Figs. 6 e 7), se deve ao fato destas bactérias ocuparem diferentes nichos no interior da planta.

Foi observado que os isolados SR1.6/6 e AR1.6/2 induziram uma maior susceptibilidade das plântulas à presença de endófitos, qual foi constatada pela maior densidade de bactérias na raiz destas plântulas (Fig. 1). A análise de DGGE mostrou que *E. cloacae* (banda C1) esteve presente somente em raízes de plantas inoculadas com os isolados de *Methylobacterium* (Fig. 3). Foi também verificado em condições axênicas, que o isolado AR1.6/2 inibiu o crescimento da raiz e do caule de plantas tratadas (Fig. 5). Estes resultados mostram que, nas condições utilizadas, este isolado deve competir com a planta por nutrientes, reduzindo o crescimento e a capacidade de resistir a entrada de bactérias em seus tecidos. Em condições de campo, esta inibição poderia ser menor, mas foi verificado que o isolado AR1.6/2 foi observado preferencialmente em plantas afetadas pela Clorose Variegada dos Citros - CVC (causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*), sendo jamais observado em plantas escape a esta doença (capítulo 2 deste trabalho), mostrando uma possível interação desta espécie bacteriana com o surgimento dos sintomas da CVC. Em alguns casos,

bactérias endofíticas podem induzir resistência sistêmica (Krishnamurthy & Gnanamanicham, 1997, Raupach & Kloepper, 1998), a qual pode estar relacionada à penetração ativa de bactérias endofíticas com hidrólise de celulose (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997a). Dessa forma, se um isolado endofítico apresentar a capacidade de hidrolisar a parede celular do hospedeiro sem disparar uma resistência induzida, poderia favorecer a entrada e o estabelecimento de outras bactérias, bem como a de patógenos. Foi verificado que o isolado AR1.6/2 colonizou principalmente regiões sub epidérmicas (Fig. 7), as quais podem servir de entrada para outras bactérias.

A análise de DGGE mostrou que os isolados inoculados não se tornaram dominantes nas plântulas, sendo ausentes no caule ou visualizados apenas como bandas fracas nas raízes. Entretanto, o uso das sondas V6 (Heuer *et al.*, 1999) auxiliou na identificação dos isolados no DGGE e possibilitou a observação dos isolados SR1.6/6 e ER1/6 não só no caule mas também nas raízes (Fig. 4), mostrando que ocorreu colonização sistêmica destes isolados. A sonda V6 tem a capacidade de se anelar a região Hipervariável 6 do gene rRNA 16S, a qual é utilizada na análise de DGGE, e amplificar o sinal da bactéria alvo, mesmo o endófito estando em baixa concentração na planta hospedeira. Este resultado mostra a potencialidade desta técnica, mas expõe a necessidade de se adequá-la ao estudo de bactérias endofíticas, pois, a presença de DNA plastidial reduz a sensibilidade da técnica, dificultando a visualização de grupos com populações reduzidas na planta hospedeira.

FIG. 7. Microscopia óptica de caules de plântulas após 30 dias de germinação. (A) planta controle; (B) Plântula inoculada com *C. flaccumfaciens*; (C) *M. extorquens*; (D) *M. mesophilicum*. Setas indicam presença de colônias bacterianas no interior dos tecidos vegetais. Inoculação foi realizada na semente.

Tem sido mostrado que a colonização da planta por bactérias pode induzir a síntese de compostos secundários específicos, os quais ativam uma resposta de defesa, aumentando a atividade de enzimas importantes do metabolismo secundário da planta hospedeira (Lindsey & Jones, 1989). Alternativamente, alguns microrganismos podem produzir precursores necessários para a produção de compostos secundários envolvidos nesta resposta (Dourtoglou, 1986; Zabetakis, 1997).

C. flaccumfaciens é uma espécie normalmente estudada como patógeno (Maringoni & Rosa, 1997; McDonald & Wong, 2000), mas também tem sido descrita como promotora de crescimento (Bent & Chanway, 1998; Raupach & Kloepper, 1998) e no controle de patógenos (Sturz & Matheson, 1996; Raupach & Kloepper, 1998; Sturz *et al.*, 1998), mostrando que a capacidade de colonizar a planta hospedeira pode também estar associada a uma interação simbiótica com a planta. No presente trabalho, foi observada a presença de *C. flaccumfaciens* (isolado ER1/6) nas cavidades sub estomáticas e principalmente na região central do caule, próximo aos vasos condutores. Este endófito que foi isolado principalmente de plantas escape a CVC, não causou sintomas deletérios nas plântulas; ao contrário, aumentou a taxa de crescimento do hospedeiro e induziu uma possível resistência sistêmica nas plantas inoculadas, pois, foi verificado que plântulas inoculadas com ER1/6 apresentaram menor densidade bacteriana no caule após 10 dias (Fig. 1), e um maior crescimento de raiz e caule (Fig. 4). Este resultado sugere que o isolado ER1/6 tem a capacidade de induzir o crescimento vegetal e também resistência a outras bactérias neste hospedeiro.

A utilização prática deste isolado na citricultura depende de maiores estudos de interação com outras espécies de citros e em associação com outras bactérias, visto

que a presença do isolado AR1.6/2 inibiu esta promoção de crescimento. Entretanto, este resultado aponta para a direção que deve ser focalizado o estudo de bactérias endofíticas de citros visando uma finalidade aplicada para estes microrganismos.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Com relação aos objetivos propostos e resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

- i) A biodiversidade da comunidade endofítica de citros está associada à CVC, sendo observado, por DGGE, uma variação maior em plantas doentes.
- ii) A frequência das bactérias endofíticas foi dependente do tratamento, do local e da época, mostrando uma variação geográfica e temporal dos diferentes grupos isolados.
- iii) *Methylobacterium* spp. e *Curtobacterium flaccumfaciens* são as bactérias endofíticas mais importantes em citros.
- iv) A resistência à CVC observada em plantas escape pode estar associada à presença de *C. flaccumfaciens* e/ou a uma β -proteobactéria não cultivável, as quais podem estar induzindo uma resistência sistêmica na planta hospedeira ou inibindo o seu desenvolvimento por antibiose.
- v) Bactérias isoladas de ramos desinfectados superficialmente foram capazes de recolonizar internamente plântulas de *C. limonia*.
- vi) *Curtobacterium flaccumfaciens* foi específica para tecidos próximos aos vasos condutores, de onde estimularam o crescimento vegetal de plântulas inoculadas.
- vii) *Methylobacterium mesophilicum* apresentou um padrão de colonização semelhante à *C. flaccumfaciens*, mas não teve efeito sobre as plântulas, enquanto que *M.*

extorquens colonizou tecidos corticais e regiões sub-epidérmicas e reduziu o crescimento vegetal da planta hospedeira.

viii) *Methylobacterium* sp., quando introduzida pela raiz na planta hospedeira, estimulou a colonização da planta por outras bactérias endofíticas.

ix) Os resultados evidenciaram a viabilidade da técnica de DGGE aliada a hibridização com sondas V6 para o estudo de bactérias endofíticas. Entretanto, deve-se adequar as condições de extração de DNA e a utilização de diferentes primers, para se evitar os problemas causados pelo DNA plastidial.

x) O estudo de bactérias endofíticas é uma importante estratégia para o entendimento da CVC e mostra a possibilidade do seu controle biológico com a utilização destes microrganismos.

6. REFERÊNCIAS

1. AMANN, R. L., W. LUDWIG, K. H. SCHLEIFER. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v.59, p.143-169, 1995.
2. ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER, D. J. LIPMAN. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997. [cited 23 June 2000]. On the Web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
3. ARAÚJO, W. L. Isolamento e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros. Piracicaba, São Paulo, 1996. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 99p.
4. ASSIS, S. M. P., E. B. SILVEIRA, R. L. R. MARIANO, D. MENEZES. Bactérias endofíticas – Método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.216-220, 1998.
5. AZEVEDO, J.L., W. MACCHERONI JR., J.O. PEREIRA, W.L. ARAÚJO. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology [online]**, 15 April 2000, 3:

[cited 05 May 2000]. Available on the Web:
<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4>. ISSN: 0717-3458.

6. BASHAN, Y. & G. HOLGUIN. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-101, 1997.
7. BASTIAN, F., A. COHEN, P. PICCOLI, V. LUNA, R. BARALDI, R. BOTTINI. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.
8. BELL, C. R., G. A. DICKIE, W. L. G. HARVEY, J. W. Y. F. CHAN. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.46-53, 1995.
9. BENT, E. & C. P. CHANWAY. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.980-988, 1998.
10. BENHAMOU, N., R. R. BÉLANGER, T. PAULITZ. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and Ri T-DNA transformed pea roots: host response to colonization by *Pythium ultimum* Trow. **Planta**, v.199, p.105-117, 1996.
11. BENHAMOU, N., J. W. KLOEPPER, S. TUZUN. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, v.204, p.153-168, 1998.

12. BRIM, H., H. HEUER, E. KRÖGERRECKLENFORT, M. MERGEAY, K. SMALLA.
Characterization of bacterial community of a zinc-polluted soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p.326-338, 1999.
13. BROOKS, D.S., C. F. GONZALEZ, D. N. APPEL, T. H. FILER. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. **Biological Control**, v4, p.373-381, 1994.
14. BUCHENAUER, H. Biological control of soil borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.105, p.329-348, 1998.
15. CASAMAYOR, E.O., H. SCHÄFER, L. BAÑERAS, C. PEDRÓS-ALIÓ, G. MUYZER.
Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.499-508, 2000.
16. CHANG, C.J., M. GARNIER, L. ZREIK, V. ROSSETTI, J.M. BOVE. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v.27, p.137-142, 1993.
17. CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. **Forest Science**, v.43, p.99-112, 1997.
18. CHEN, C., E. M. BAUSKE, G. MUSSON, R. RODRÍGUES-KÁBANA, J. W. KLOEPPER.
Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v.5, p.83-91, 1995.

19. CHILDS, J.F.L., L.E KOPP, R.E. JOHNSON. A species of *Physoderma* present in citrus and related species. **Phytopathology**, v.55, p.681-687, 1965.
20. CHRISTIANSEN-WENIGER, C. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* through auxin-induced root tumours of rice (*Oryza sativa* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.21, p.293-302, 1996.
21. DOURTOGLOU, V. Production of natural flavourings, perfumes and other fine chemicals by infected plants. **Symbiosis**, v.2, p.189-200, 1986.
22. DUIJFF, B.J., V. GIANINAZZI-PEARSON, P. LEMANCEAU. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist**, v.135, p.325-334, 1997.
23. EGENER, T., T. HUREK, B. REINHOLD-HUREK. Endophytic expression of nif genes of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in rice roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.813-819, 1999.
24. ERSKINE, J.M., & L.E. LOPATECKI In vitro and in vivo interactions between *Erwinia amylovora* and related saprophytic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.21, p.35-41, 1975.
25. FAHEY, J. W., M. B. DIMOCK, S. F. TOMASINO, J. M. TAYLOR, P.S. CARLSON. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: A case study in industry. In: **Microbial Ecology of Leaves**, p.401-411, Springer – Verlag, New York. 1991.

26. FANTROUSSI, S. EL, L. VERSCHUERE, W. VERSTRAETE, E. M. TOP. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.982-988, 1999.
27. FELDMANN, A. W., R. W. HANKS, G. E. GOOD, G. E. BROWN. Occurrence of a bacterium in YTD-affected as well as healthy citrus trees. **Plant Disease Report**, v.61, p.546-550, 1977.
28. FISHER, P.J., O. PETRINI, H.M.L. SCOTT. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.122, p.299-305, 1992.
29. FROMMEL, M. I., J. NOWAK, G. LAZAROVITS. Growth enhancement and development modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, v.96, p.928-936, 1991.
30. GARDNER, J.M., A. W FELDMAN, M. ZABLOTOWICZ. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. **Applied Environmental Microbiology**, v.43, p.1335-1342, 1982.
31. GARDNER, J. M., J. A CHANDLER, A. W FELDMAN. Growth response and vascular plugging of citrus inoculated with rhizobacteria and xylem-resident bacteria. **Plant Soil**, v.86, p.996-1000, 1985.
32. GLIENKE, C. Variabilidade genética do fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely, detectada por RAPD. Curitiba, Paraná, 1995. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. 115p.

33. GLIENKE-BLANCO, C. *Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Piracicaba, São Paulo, 1999. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 200p.
34. HAAPALAINEN, M. L., N. KOBETS, E. PIRUZIAN, M. C. METZLER. Integrative vetor for stable transformation and expression of a beta-1,3-glucanase gene in *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.162, p.1-7, 1998.
35. HALL, T. J., L. R. SCHREIBER, C. LEBEN. Effects of xylem-colonizing *Bacillus* spp. on Verticillium wilt in maples. **Plant Disease**, v.70, p.521-524, 1986.
36. HALLMANN, J., A. QUADT-HALLMANN, R. RODRÍGUEZ-KÁBANA, J.W. KLOEPPER. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.925-937, 1998.
37. HALLMANN, J., A. QUADT-HALLMANN, W. F MAHAFFEE, J. W. KLOEPPER. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.
38. HALLMANN, J., R. RODRÍGUEZ-KÁBANA, J. W. KLOEPPER. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.551-560, 1999.
39. HANSEN, M. C., T. T. NIELSEN, M. GIVSKOV, S. MOLIN. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.141-149, 1998.

40. HEUER, H.; K. HARTUNG; G. WIELAND; I. KRAMER; K. SMALLA. Polynucleotide probe target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1045-1049, 1999.
41. HINTON, D. M. & C. W. BACON. *Enterobacter cloacae* is an endophytic simbiote of corn. **Mycopathologia**, v.129, p.117-125, 1995.
42. HOLLAND, M. A. & J. C. POLACCO. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p.197-209, 1994.
43. HUREK T., B. REINHOLD-HUREK, M. VAN MONTAGU, E. KELLEMBERGER. Root colonizing and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.1913-1923, 1994.
44. JAMES, E. K. & F. L. OLIVARES. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Science**, v.17, p.77-119, 1998.
45. JAMES, E. K., V. M. REIS, F. L. OLIVARES, J. I. BALDANI, J. DÖBEREINER. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v.45, p.757-766, 1994.
46. JENSEN, S., L. OVREAS, F. L. DAASE, AND V. TORSVIK. Diversity in methane enrichments from an agricultural soil revealed by DGGE separation of PCR amplified 16S rDNA fragments. **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.17-26, 1998.

47. KEMPE, J., & L. SEQUIERA. Biological control of bacterial wilt of potatoes: demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Plant Disease**, v.67, p.499-503, 1983.
48. KHMEL, I. A., T. A. SOROKINA, N. B. LEMANOVA, V. A. LIPASOVA, O. Z. METLITSKI, T. V. BURDEINAYA, L. S. CHERMIN. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic 49. Kluepfel, D. A. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.441-472, 1998.
49. KLOEPPER, J. W., R. RODRIGUEZ-KABANA, G. W. ZEHNDER, J. F. MURPHY, E. SIKORA, C. Fernandez. Plant root bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, v.28, p.21-26, 1999.
50. KLOEPPER, J. W., R. M. ZABLOTOWIZ, E. M. TIPPING, R. LIFSHITZ. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: D. L. KEISTER, & P. B. CREGAN. **The rhizosphere and plant growth**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 315-326. 1991.
51. KLUEPFEL, D. A. The behaviour and tracking of bacteria in the rhizosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v31, p.441-472. 1993.
52. KRISHNAMURTHY, K. & S.S. GNANAMANICKAM. Biological control of sheath blight of rice: induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp. **Current Science**, v.72, p.331-334. 1997.
53. KUSKE, C.R., S.M. BARNS, J.D. BUSCH. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid Southwestern United States that are present in many

geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3614-3621. 1997.

54. LAMPELL, J. S., G. L. CANTER, M. B. DIMOCK, J. L. KELLY, J. J. ANDERSON, B. B. URATANI, J. S. FOULKE JR., J. T. TURNER. Integrative cloning expression and stability of the *CryIA (c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.501-506, 1994.
55. LAZAROVITS, G. & J. NOWAK. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **Horticulture Science**, v.32, p.188-192, 1997.
56. LEE, R.F., K.S. KERRICK, M.J.G. BERETTA, C.M. CHAGAS, V. ROSSETTI. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. **Citrus Industry**, v.72, p.12-13, 15, 1991.
57. LEEMAN, M., J. A. VAN PELT, F. M. DEN OUDEN, M. HEINSBROEK, P. A. H. M. Bakker, B. Schippers. Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopatology**, v.85, p.1021-1027, 1995.
58. LEMANCEAU, P., & C. ALABOUVETTE. Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent Pseudomonads: mechanisms and applications. **Biocontrol Sciences and Technology**, v.3, p.219-234, 1993.
59. LIMA, G., A. IPPOLITO, F. NIGRO, M. SALERNO. Attempts in the biological control of citrus mal secco (*Phoma tracheiphila*) using endophytic bacteria. **Difesa Delle Piante**, v.17, p.43-49, 1994.

60. LINDSEY, K. & M. G. K. JONES. Manipulation of resistance. In: **Plant Biotechnology in Agriculture**. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 1989.
61. LIU, L. J. W. KLOEPPER, S. TUZUN. Induction of systemic resistance in cumcumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.695-698, 1995a.
62. LIU, L. J. W. KLOEPPER, S. TUZUN. Induction of systemic resistance in cumcumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.843-847, 1995b.
63. LIU, Z., V. PILLAY, J. NOWAK, ZHY-DE WEI. In vitro culture of watermelon and cataloupe with and without beneficial bacterium. **Acta Horticulturae**, nº. 402, p.58-60, 1995c.
64. MAHAFFEE, W. F., J. W. KLOEPPER, J. W. L. VAN VUURDE, J. M. VAN DER WOLF, AND M. VAN DEN BRINK. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89b-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22. In: **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria**. M. H. Ryder, P. M. Stephens, & G. D. Bowen (Eds.). CSIRO, Melbourne, Australia, p.180. 1997.
65. MARI, M., M. GUIZZARDI, G. C. PRATELLA. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. **Biological Control**, v.7, p.30-37. 1996.
66. MARINGONI, A.C. & E. F. ROSA. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.160-162. 1997.

67. McDONALD, J.G. & E. WONG. High diversity in *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens* characterized by serology and rep-PCR genomic fingerprinting. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, p.17-22, 2000.
68. M'PIGA, P., R. R. BÉLANGER, T. C. PAULITZ, N. BENHAMOU. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, p.301-320, 1997.
69. MUKHOPADHYAY, K., N. K. GARRISON, D. M. HINTON, C. W. BACON, G. S. KHUSH, H. D. PECK, N. DATTA. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, v.134, p.151-159, 1996.
70. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
71. MUYZER, G., E.C. DE WAAL, A. UITTERLINDEN. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, p.695-700, 1993.
72. NAMBIAR, P. T. C., S. W. MA, V. N. IYER. Limiting and insect infestation of nitrogen-fixing root nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.2866-2869, 1990.
73. NEMEC, S. Microorganisms associated with healthy and sand hill declined citrus roots. **Plant Disease Reports**, v.59, p.210-213, 1975.

74. NOWAK, J. Benefits of in vitro "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.34, p.122-130, 1998.
75. NOWAK, J., S. K. ASIEDU, S. BENSALIM, J. RICHARDS, A. STEWART, C. SMITH, D. STEVENS, A. V. STURZ. From laboratory to applications: challenges and progress with *in vitro* dual cultures of potato and beneficial bacteria. In: **A. Cassels. Pathogen and microbial contamination mangement in micropropagation.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 312-330. 1997.
76. OVREAS, L., L. FORNEY, F. L. DAAE, V. TORSVIK. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3367-3373, 1997.
77. PAN, M. J., S. RADEMAN, K. KUNERT, J. W. HASTINGS. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* race 4 by endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **Journal of Phytopathology**, v.145, p.479-486, 1997.
78. PATRIQUIN, D.G., & J. DÖBEREINER. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of mayze and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p.734-742, 1978.
79. PEREIRA, J. O., M. L. CARNEIRO VIEIRA, J. L. AZEVEDO. Endophytic Fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15, p.37-40, 1999.

80. PEROTTI, R. On the limits of biological enquiry in soil science. **Proceedings of International Society Soil Science**, v.2, p.146-162, 1926.
81. PETRINI, L.E., O. PETRINI, G. LAFLAMME. Recovery of endophytes of *Abies balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. **Phytoprotection**, v.70, p.97-103, 1989.
82. PILLAY, V.J. & J. NOWAK. Inoculum density, temperature and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonads bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.354-361, 1997.
83. PLEBAN, S., F. INGEL, & I. CHET. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v.101, p.665-672, 1995.
84. PLEBAN. S., L. CHERNIN, & I. CHET. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.284-288, 1997.
85. POOLER, M.R. & J.S. HARTUNG. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381, 1995.
86. PRAYITNO, J., J. STEFANIAK, J. MCIVER, J. J. WEINMAN, F. B. DAZZO, J. K. LADHA, W. BARRAQUIO, Y. G. YANNI, B. G. ROLFE. Interactions of rice seedlings with bacteria isolated from rice. **Australasian Journal of Plant Physiology**, v.26, p.521-88, 1999.

87. QUADT-HALLMANN, A., N. BENHAMOU, & J. W. KLOEPPER. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.577-582, 1997a.
88. QUADT-HALLMANN, A., J. HALLMANN, & J. W. KLOEPPER. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.254-259, 1997b.
89. QUADT-HALLMANN, A. & J. W. KLOEPPER. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1144-1154, 1996.
90. RAUPACH, G.S., & J.W. KLOEPPER. Mixtures of plant growth-Promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p.1158-1164, 1998.
91. REDDY, M. S., S. E. CAMPBELL, S. E. YOUNG, G. BROWN. Greenhouse evaluation of rhizobacteria for the suppression of crown and root rot of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. In: **Plant growth promoting rhizobacteria: progress and prospects**. C. KEEL, B. KOLLER, & G. DEFAGO. IOBC/WPRS, XIV/9. Interlaken, Switzerland. pp. 39-44. 1991.
92. REINHOLD-HUREK, B., & T. HUREK. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v.6, p.139-144, 1998.
93. ROSADO A. S.; G. F. DUARTE; L. SELDIN; J. D. VAN ELSAS. Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in *Paenibacillus azotofixans* Strains and Soil Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2770-2779. 1998.

94. ROSETTI, V., M. GARNIER, J.M. BOVE, M.J. BERETTA, A.R.R. TEIXEIRA, J.A. QUAGGIO, J.D. DENEGRI. Presence de bacteries dan le xylem d'orangers atteint de chlorose variegee une nouvelle maladie des agrumes au Brazil. **C.R. Acad. Sci. III**, v.310, p.345-349, 1990.
95. RUPPEL, S.; C. HECHT-BUCHHOLZ; R. REMUS; U. ORTMANN; R. SCMELZER. Settlement of diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Pant and Soil**, v.145, p.261-273, 1992.
96. SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, T. MANIATIS. **Molecular cloning. A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
97. SHARMA, V.K. & J. NOWAK. 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**, v.44, p.528-536, 1998.
98. SHISHIDO, M. & C. P. CHANWAY. Espruce growth response specificity after treatment with plant growth-promoting pseudomonads. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.22-31, 1999.
99. SHISHIDO, M., C. BREUIL, C. P. CHANWAY. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.29, p.191-196, 1999.
100. SICILIANO, S. D. & J. J. GERMIDA. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the

- non transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.29, p.263-272, 1999.
101. SMALLA, K.; U. WACHTENDORF; H. HEUER; W.-T. LIU; L. FORNEY. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, p.1220-1225, 1998.
 102. SMITH, E. F. Bacteria in relation of plant diseases. Vol. 2. Carnegie Institution of Washington, Washington D. C. 1911.
 103. SRINIVASAN, M., D. J. PETERSEN, F. B. HOLL. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1006-1014, 1996.
 104. STEEL, R.G.D. & J.H. TORRIE. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. McGraw-Hill, Toronto. 1980.
 105. STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, v.175, p.257-263, 1995.
 106. STURZ, A.V., B. R. CHRISTIE, B. G. MATHESON. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.162-167, 1998.
 107. STURZ, A. V., B. R. CHRISTIE, B. G. MATHESON, W. J. ARSENAULT, N. A. BUCHANAN. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, v.48, p.360-369, 1999.

108. STURZ, A.V. & B. G. MATHESON. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant and Soil**, v.184, p.265-271, 1996.
109. SUZUKI, M. T. & S. J. GIOVANNONI. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.625-630, 1996.
110. TESTER, C. F. Influence of genetically modified endophytic bacterium on composition and decompositions of com residue. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.1107-1112, 1992.
111. TOMASINO, S. F., R. T. LEISTER, M. B. DIMOCK, R. M. BEACH, J. L. KELLY. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene *cryIA (c)* of *Bacillus thuringiensis* against European com borer in field com. **Biological control**, v.5, p.442-448, 1995.
112. TURNER, J. T., J. S. LAMPELL, R. S. SREARMEN, G. W. SUNDIN, U. P. GUNYUZLU, J. J. ANDERSON. Stability of alfa endotoxyn gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinat strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.3522-3528, 1991.
113. URATANI, B. B., S. C. ALCORNS, B. H. TSANG, J. L. KELLY. Construction of secretion vectors and use of heterologous signal sequences for protein secretion in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, p.892-898, 1995.
114. WILHELM, E., W. ARTHOFER, R. SCHAFLEITNER, B. KREBS, A. C. CASSELLS. *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against

- chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.52, p.105-108, 1998.
115. WRIGHT, J. G., G. I. JOHNSON, K. D. HYDE, Studies on the endophytic mycota of *Citrus* sp. In: **Disease Resistance in fruit. Proceedings of an international workshop**. G. I. Johnson, E. Highley, & D. C. Joyce. Proceedings Series, Chiang Mia, Thailand, pp. 167-173. 1998.
116. VAN PEER, R. & B. SCHIPPERS. Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in camation to *Fusarium* wilt. Netherlands **Journal of Plant Pathology**, v.98, p.129-139, 1992.
117. VAN VUURDE, J. W. L. 2000. Comunicação Pessoal. Plant Research International, Wageningen-UR, Wageningen, The Netherlands.
118. YANG, C.-H. & D. E. CROWLEY. Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.345-351, 2000.
119. YOU, C. B., M. LIN, X. J. FANG, W. SONG. Attachment of *Alcaligenes* to rice roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.463-466, 1995.
120. ZABETAKIS, I. Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.50, p.179-183, 1997.