

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

FERNANDA DE SOUSA BERNARDES

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

Piracicaba

2010

FERNANDA DE SOUSA BERNARDES

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

Piracicaba

2010

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

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

Bernardes, Fernanda de Sousa

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

60 p.: fig.

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

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

CDU 632.35:634.31

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

AGRADECIMENTOS

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

A Deus, pela vida.

A minha família, pelo amor e apoio.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao CNPQ pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

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

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

(Alan Vaszatte)

\

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

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

SUMÁRIO

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

