

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE EUCALIPTO E POTENCIAL USO NO
CONTROLE DE DOENÇAS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS
EM VIVEIROS FLORESTAIS

ISABEL CRISTINA PADULA PAZ
BIÓLOGA/UNISINOS
M.SC. BIOTECNOLOGIA/UCS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do grau de Doutor em Fitotecnia
Área de concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Setembro de 2009

FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO

À Marcia Eloisa da Silva

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, primeiramente e principalmente, por ter me dado oportunidades valiosas na vida, Obrigado, Pai.

Agradeço aos meus pais, Jurandi e Maria da Graça, por me guiarem nesse mundo, me ensinando desde cedo à importância do amor e da família, e pela desistência dos seus sonhos para a realização dos meus, espero retribuir cada centavo contado, cada lágrima chorada e cada sorriso de apoio de vocês. Amo vocês além da vida.

Agradeço a minha irmã Daiane, por todo o apoio, amor e paciência. Te amo, manoca.

Ao meu sobrinho Lucas, orgulho da minha vida, meu futuro colega de profissão, por me provar que não existe limites para amar.

Ao meu marido Cássio, uma pessoa que acreditou em mim, me apoiou sempre, até nas decisões que acabavam separando nossos corpos um pouco, mas os corações e mentes sempre estiveram unidos. Obrigado pela paciência, por emprestar o notebook, a máquina fotográfica, por fazer caixas plásticas comigo, tu é praticamente Dr. em Fitossanidade. Amor da minha vida, sem ti, eu sou metade.

A minha família enxertada querida, Dona Maria, Ruth, Duda, Adri e Osmar, por todo o apoio e carinho, principalmente ao meu “irmão” Osmar que acreditou não somente na Bel concunhada, mas também na Bel profissional.

Á minha orientadora, Aida T. Santos Matsumura, por ter me acolhido em seu laboratório como uma mãe, mesmo vindo com uma linha de pesquisa nova, obrigado por aceitar o desafio.

Ao meu co-orientador e pai científico, João Lúcio de Azevedo, por todos os ensinamentos, pelo apoio, grande amizade e por ser um exemplo de ser humano.

Á Márcia Eloisa da Silva, minha mãe científica, por ter me guiado e me apoiado nesse mundo da ciência.

Ao Prof. Valmir Duarte pelos seus conselhos e amizade.

A todos os professores do Departamento de Fitossanidade pelos ensinamentos;

Á Marisa, secretária do PPG, pelo auxílio e amizade;

À Rita de C. M. Santin, amiga e colega querida, que muito me ajudou a fechar e lavar placas, contar lesões de bactérias, ficar até meia noite na agronomia, e muuuuito mais.

Ao Alexandre M. Guimarães e sua família linda (Vane e Pedro), amigos mais que especiais, laços que passaram os limites da amizade e se transformaram em familiares.

A todos os amigos do Departamento de Fitossanidade, Precila, Priscila, Marcus, Joseane, Juliana Pandolfo, Duda Diehl, pessoal dos insetos, do lab. do Fábio, do Martinelli, do Emerson, do Marcelo, amigos da ESALQ, da UCS e da UNISINOS, e de todo esse mundão de meu Deus.

Á Tecnoplanta Florestal, nas pessoas de Eudes Marchetti e Osmar P. P. da Rosa, por todo o apoio financeiro, estrutural e pessoal que me deram. Além de toda a equipe que foram importantes no desenvolvimento dos experimentos in vivo, Josito, Jeson, Da Mata e principalmente, Eliane.

Á população brasileira, principalmente à aqueles que não poderão nem ler essas palavras por falta de alfabetização, mas que da mesma forma contribuíram com seus impostos, e ajudaram a financiar os meus estudos. Espero retribuir cada gota de suor.

Muito obrigado

Ante o futuro

Não adianta indagar do futuro, ociosamente, para satisfazer a curiosidade irrequieta ou inútil.

Vale construí-lo em bases que a lógica nos traça generosamente à visão.

Não desconhecemos que nosso amanhã será a invariável resposta do mundo ao nosso hoje.

E aos nossos pés a natureza sábia e simples nos convida a pensar.

O arado preguiçoso deve aguardar a ferrugem.

A leira abandonada receberá o assalto da planta daninha.

A casa relegada ao abandono será pasto dos vermes que lhe corroem a estrutura.

O pão desaproveitado repousará na sombra do mofo.

A fonte que se consagra ao movimento atingirá a paz do oceano.

A flor leal ao destino que lhe é próprio converter-se-á em fruto benfazejo.

A plantação amparada com segurança distribuirá bênçãos à mesa.

E o minério obediente aos golpes do malho transformar-se-á em peça de alto preço.

Sabemos, assim, que é possível edificar o futuro e recolher-lhe os dons de amor e vida.

Escolhe a bondade por lema de cada dia, não desistas de aprender, infatigavelmente e, com os braços no serviço incessante caminharás desde hoje, sob a luz da vitória, ao encontro de glorioso porvir.

Emmanuel (Psicografia Chico Xavier)

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE EUCALIPTO E POTENCIAL USO NO CONTROLE DE DOENÇAS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS EM VIVEIROS FLORESTAIS¹

Autora: Isabel Cristina Padula Paz
Orientadora: Aida Terezinha Santos Matsumura
Co-orientador: João Lúcio de Azevedo

RESUMO

O Rio Grande do Sul com a implantação de novas empresas da área florestal e aumento da produtividade das já estabelecidas tende a se tornar um importante pólo da produção de papel e celulose no Brasil. Como plantas de *Eucalyptus* spp. são a principal fonte para extração de celulose, o plantio de extensas áreas se faz necessário para suprimento de matéria-prima, portanto, a produção de mudas de qualidade é primaz. A produção de mudas de eucaliptos sofre perdas importantes devido ao ataque de microrganismos fitopatogênicos em condições de viveiro, sendo os mesmos controlados basicamente por meio de resistência genética e pelo uso de insumos químicos. Entretanto, não há produtos químicos registrados para a eucaliptocultura e, e alguns casos como o da bacteriose foliar causada por *Xanthomonas* sp., inexistem métodos efetivos de controle desta doença. Neste sentido, este trabalho visou o isolamento, a caracterização bioquímica e molecular, e a aplicação de bactérias endofíticas que atuem na redução de doenças nos viveiros de eucalipto e/ou estejam associados à promoção de crescimento vegetal, diminuindo assim os custos de produção e o impacto ambiental causado pelo uso de insumos químicos. Dos 28 isolados de bactérias endofíticas, oito mostraram-se promissores nos ensaios *in vitro*, e o isolado de *Bacillus subtilis* EUCEB10 foi o mais efetivo nos ensaios de controle de doenças e promoção de crescimento nos ensaios *in vivo*, tanto no verão quanto no inverno. Alguns isolados de bactérias endofíticas de eucalipto foram produtores de enzimas extracelulares, metabólitos voláteis, HCN e AIA, além de serem capazes de solubilizar fosfato e fixar nitrogênio, sendo possível relacionar a produção de alguns metabólitos avaliados com os índices de biocontrole e promoção de crescimento *in vivo*.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (114 p.) Setembro, 2009

ENDOPHYTIC BACTERIA FROM EUCALYPTUS AND POTENTIAL USE IN DISEASES CONTROL AND GROWTH PROMOTION OF PLANTLETS IN FORESTRY NURSERIES²

Author: Isabel Cristina Padula Paz
Adviser: Aida Terezinha Santos Matsumura
Co-adviser: João Lúcio de Azevedo

ABSTRACT

The state of Rio Grande do Sul with the implantation of new enterprises in the forest area and with the increase of the productivity of those already established tends to become an important production polo of paper and cellulose. Since plants such as the *Eucalyptus spp.* are the main source of extraction of cellulose, the plantation of extensive areas is necessary for the supply of raw material, therefore the production of quality seedlings is foremost. The production of eucalyptus seedlings undergoes serious losses due to the attack of pathogens in nursery conditions, controlled basically through genetic resistance and through the use of chemical insumes. However, there is no registered chemical product for eucalyptus farming and in some cases such as the foliar bacteriosis caused by *Xanthomonas sp.* there is no effective control method of the disease. In that sense this work aimed at the isolation, the biochemical and molecular characterization and the application of endophytic bacteria that act in the reduction of diseases in the eucalyptus plant nursery and/or that are associated to the promotion of vegetable growth, thus decreasing the production costs and the environmental impact caused by the use of chemical insumes. Of the twenty-eight endophytic bacterial isolates eight showed to be promising in the *in vitro* assays and the *Bacillus subtilis* EUCB10 isolate was the most effective in the control assays of diseases and the growth production in the *in vivo* assays, not only in summer as well as in winter. Some eucalyptus endophytic bacterial isolates were extracellular enzyme producers, volatile metabolites, HCN and AIA, in addition to being capable of solubilizing phosphate and fixing nitrogen, being therefore possible to relate the production of some metabolites evaluated to biocontrol indexes and to the promotion of growth *in vivo*.

² Doctoral Thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (114 p.) September, 2009

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Eucalyptus</i> spp. e sua importância econômica	4
2.1.1 Propagação clonal de <i>Eucalyptus</i> spp.	7
2.2 Doenças do eucalipto em fase de viveiro.....	9
2.2.1 Bacteriose foliar.....	11
2.2.2 Mofo cinzento	13
2.2.3 Manchas foliares e podridão de estacas causadas por <i>Cylindrocladium</i> sp.	14
2.3 Microrganismos endofíticos no controle biológico de doenças de plantas	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Isolamento de microrganismos endofíticos cultiváveis de amostras de <i>Eucalyptus</i> “urograndis”	22
3.1.1 Amostras vegetais	22
3.1.2 Isolamento de microrganismos endofíticos de plantas de eucalipto	22
3.1.3 Reisolamento de microrganismos endofíticos de plantas de eucalipto	24
3.2 Avaliação da variabilidade genética e identificação de bactérias endofíticas de eucalipto baseada em técnicas de biologia molecular	24
3.2.1 Identificação dos isolados bacterianos	24
3.2.2.1 Extração de DNA genômico das bactérias	24
3.2.2.2 Amplificação	25
3.3 Avaliação do potencial antagônico de bactérias endofíticas de eucalipto aos principais patógenos de mudas, em condições de casa de vegetação	26
3.3.1 Isolamento de microrganismos fitopatogênicos	26
3.3.1.1 Teste de patogenicidade	27
3.3.1.1.1 Teste de patogenicidade com bactérias	27
3.3.1.1.2 Teste de patogenicidade com fungos	27
3.4 Avaliação do antagonismo direto entre bactérias endofíticas e microrganismos fitopatogênicos	28
3.4.1 Bactérias endofíticas x Bactéria fitopatogênica	28
3.4.2 Bactérias endofíticas x Fungos fitopatogênicos	29
3.5 Avaliação de aspectos bioquímicos de microrganismos que podem estar associados ao biocontrole	30
3.5.1 Produção de metabólitos voláteis	30

3.5.1.1	Produção de metabólitos voláteis por bactérias endofíticas inibitórios a fungos fitopatogênicos	30
3.5.1.2	Produção de metabólitos voláteis por bactérias endofíticas inibitórios a bactérias fitopatogênicas	31
3.5.2	Produção de ácido hidrocianico (HCN) por bactérias endofíticas de eucalipto	31
3.6	Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas por bactérias endofíticas	32
3.6.1	Avaliação da atividade quitinásica e glucanásica em meio líquido	32
3.6.2	Avaliação da atividade proteásica em meio líquido	33
3.7	Deteção de sideróforos em culturas de bactérias endofíticas do eucalipto	35
3.8	Avaliação de aspectos bioquímicos de microrganismos que podem estar associados à promoção de crescimento vegetal	36
3.8.1	Produção de ácido indol acético (AIA)	36
3.8.2	Teste de fixação de nitrogênio por bactérias endofíticas de eucalipto	36
3.8.3	Teste de solubilização de fosfato por bactérias endofíticas	37
3.9	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> dos microrganismos endofíticos no controle de doenças e no desenvolvimento de plantas de eucalipto	37
3.9.1	Testes em mudas de eucalipto em casa de vegetação	37
3.9.1.1	Inoculação de microrganismos endofíticos em estacas de eucalipto	37
3.9.1.1.1	Avaliação da ação de bactérias endofíticas sobre o enraizamento e crescimento de mudas de <i>E. urograndis</i> clone 4622	38
3.9.1.1.2	Avaliação da ação de bactérias endofíticas sobre o controle de fitopatógenos em mudas de <i>E. urograndis</i> 4622	39
3.10	Análise Estatística	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Isolamento de microrganismos endofíticos cultiváveis de amostras de <i>Eucalyptus "urograndis"</i>	43
4.2	Isolamento de microrganismos fitopatogênicos de mudas de <i>E. urograndis</i> clone 4622	51
4.3	Avaliação do antagonismo direto entre bactérias endofíticas isoladas de eucalipto e microrganismos fitopatogênicos do eucalipto	51
4.3.1	Avaliação do potencial inibitório de bactérias endofíticas sobre o crescimento de <i>Xanthomonas</i> sp.	52
4.3.2	Avaliação da inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos quando desafiados com bactérias endofíticas isoladas de eucalipto	54
4.5	Seleção de bactérias endofíticas do eucalipto para ensaios de promoção de enraizamento, crescimento de plantas e controle de doenças <i>in vivo</i>	58
4.6	Ensaio <i>in vivo</i> para avaliação da ação das bactérias endofíticas sobre a propagação, promoção de crescimento e	

biocontrole de alguns fitopatógenos de importância em viveiros florestais	61
4.6.1 Taxa de enraizamento e promoção de crescimento de plantas de <i>Eucalyptus "urograndis"</i> por bactérias endofíticas	61
4.7 Avaliação da ação antagonística de bactérias endofíticas sobre as doenças causados por <i>Xanthomonas</i> sp., <i>Cylindrocladium gracile</i> e <i>Botrytis cinerea</i> , em ensaios de casa de vegetação	68
4.7.1. Avaliação da ação de bactérias endofíticas do eucalipto sobre a bacteriose foliar do eucalipto	68
4.7.2 Avaliação da ação inibitória de bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Botrytis cinerea</i> em ensaios de casa de vegetação.....	71
4.7.3 Avaliação da ação inibitória de bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Cylindrocladium gracile</i>	75
4.8. Reisolamento de bactérias endofíticas de plantas de eucalipto pré-inoculadas	79
4.9 Avaliação da atividade da bactéria endofítica <i>Bacillus subtilis</i> EUCB 10 em casa de vegetação, durante o período de inverno no Rio Grande do Sul	81
4.9.1 Avaliação de mecanismos bioquímicos usados por bactérias endofíticas de eucalipto relacionados a inibição de fitopatógenos	85
4.9.1.1 Avaliação da produção de enzimas relacionadas ao micoparasitismo e sideróforos por bactérias endofíticas de eucalipto	85
4.9.1.2 Produção de metabólitos voláteis por bactérias endofíticas de eucalipto inibitórios a microrganismos fitopatogênicos de eucalipto	92
5 CONCLUSÕES	96
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
Anexo I	113
Anexo II	114

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Bactérias endofíticas de eucalipto, separadas com base em características morfológicas da colônia. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007	46
2. Identificação e frequência de isolamento dos isolados bacterianos endofíticos oriundos de <i>Eucalyptus</i> “urophylla”. Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ/USP), 2009	48
3. Quadro comparativo da atividade inibitória sobre fitopatógenos e da produção de AIA dos diferentes isolados de bactérias endofíticas do eucalipto. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007	60
4. Peso seco (g) de plantas de eucalipto tratadas com bactérias endofíticas após 30 e 80 dias após a inoculação. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	65
5. Avaliação qualitativa da capacidade de solubilização de fosfatos e da fixação biológica de nitrogênio por bactérias endofíticas de eucalipto. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009	68
6. Parâmetros relacionados a qualidade de mudas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis” quando tratado com <i>Bacillus subtilis</i> EUCB 10. Tecnoplanta Florestal, 2008	84
7. Atividade enzimática (U) de quitinases, glucanases e proteases e produção de sideróforos em culturas de bactérias endofíticas de eucalipto. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2008	87
8. Inibição de <i>Xanthomonas</i> sp. e produção de ácido cianídrico (HCN) por bactérias endofíticas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis”. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2009	96

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Freqüência geral de isolamento (%) de bactérias endofíticas em folhas e ramos de <i>Eucalyptus</i> “urograndis”. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.....	44
2. Freqüência de isolamento de bactérias endofíticas separadas por grupos morfológicos. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007	45
3. Árvore filogenética baseada na homologia da sequência parcial do rDNA 16S. Números em parênteses representam o número de acesso de cada espécie referência no GenBank. O número em cada ramo indica os valores de bootstrap (1000 replicatas). Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ/USP), 2009	49
4. Índice de antibiose de <i>Xanthomonas</i> sp. quando desafiadas com bactérias endofíticas. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007	52
5. Inibição de <i>Xanthomonas</i> sp., por isolado de bactéria endofítica de eucalipto. A. Controle, B. Bacillus sp. EUCB 28. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007...	53
6. Índice de antibiose de <i>Xanthomonas</i> sp. quando desafiadas com bactérias endofíticas, expressas pelo índice de antibiose. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007	54
7. Inibição in vitro de <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Cylindrocladium gracile</i> por isolados de bactérias endofíticas de eucalipto. Controles (esquerda), Bactérias endofíticas (direita). Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007	55
8. Porcentual de inibição de <i>Botrytis cinerea</i> quando desafiadas com bactérias endofíticas. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007 ..	57
9. Porcentual de inibição de <i>Cylindrocladium gracile</i> quando desafiado com bactérias endofíticas. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007	58
10. Produção de ácido indol acético (µg/ml) por bactérias endofíticas de eucalipto. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007	60

11. Porcentual de enraizamento de plantas de eucalipto tratadas com bactérias endofíticas de eucalipto, após 30 dias de inoculação. Barras seguidas de números iguais de asteriscos não diferiram do controle, pelo teste binominal 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008	63
12. Tamanho médio de sistema radicular e parte aérea de plantas tratadas com bactérias endofíticas de eucalipto, após 30 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008	64
13. Número médio de folhas por plantas tratadas com bactérias endofíticas de eucalipto, após 80 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008	65
14. Tamanho médio de parte aérea de plantas tratadas com bactérias endofíticas de eucalipto, após 80 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008.....	66
15. Produção de ácido indol acético ($\mu\text{g/ml}$) por bactérias endofíticas de eucalipto. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Duncan 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	67
16. Incidência de bacteriose foliar (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação de <i>Xanthomonas</i> sp. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	70
17. Severidade da bacteriose foliar (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação de <i>Xanthomonas</i> sp. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	71
18. Número médio de folhas com sintomas de bacteriose foliar em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação de <i>Xanthomonas</i> sp. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008 ..	72
19. Incidência de sintomas de <i>Botrytis cinerea</i> (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 21 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knot 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	73
20. Severidade de mofo cinzento (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 21 dias de inoculação de <i>Botrytis cinerea</i> . Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	74
21. Número médio de folhas por plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 21 dias de inoculação de <i>Botrytis cinerea</i> .	

	Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	75
22.	Comprimento médio de parte aérea (cm) de plantas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis” tratadas com bactérias endofíticas e desafiadas com <i>Botrytis cinerea</i> . Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008 ..	76
23.	Incidência de sintomas de <i>Cylindrocladium gracile</i> (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	77
24.	Severidade de sintomas de <i>Cylindrocladium gracile</i> (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	78
25.	Número médio de folhas por plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação de <i>Cylindrocladium gracile</i> . Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	79
26.	Número médio de folhas com sintomas de manchas de <i>Cylindrocladium</i> em plantas tratadas com bactérias endofíticas, 15 dias após inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008 ..	79
27.	Freqüência de reisolamento de bactérias endofíticas de plantas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis”, após 80 dias de inoculação. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008	81
28.	Dinâmica temporal do enraizamento (%) de estacas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis” tratado com <i>Bacillus subtilis</i> EUCB 10. Linhas seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knot 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008	83
29.	Mortalidade absoluta de estacas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis” quando tratadas com <i>Bacillus subtilis</i> EUCB 10. Tecnoplanta Florestal, 2008	84
30.	Índice de Qualidade de mudas de Dickson em mudas tratadas com a bactéria endofítica <i>Bacillus subtilis</i> EUCB 10. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008	85
31.	Incidência e severidade (%) de bacteriose foliar em plantas tratadas com <i>Bacillus subtilis</i> EUCB 10. Barras de mesma cor, seguidas de letras diferentes não diferiram significativamente pelo teste de Tukey 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008	86
32.	Relação entre a produção de enzimas extracelulares com incidência e severidade da bacteriose foliar do eucalipto em	

	<i>Eucalyptus</i> “urograndis”. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2008	89
33.	Relação entre a produção de enzimas extracelulares com incidência e severidade de mofo cinzento em <i>Eucalyptus</i> “urograndis”. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2008	91
34.	Relação entre a produção de enzimas extracelulares com incidência e severidade de <i>Cylindrocladium gracile</i> em <i>Eucalyptus</i> “urograndis”. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2008	92
35.	Crescimento micelial médio de <i>Botrytis cinerea</i> quando exposto à metabólitos voláteis de bactérias endofíticas de eucalipto. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2009	93
36.	Crescimento micelial médio de <i>Cylindrocladium gracile</i> quando exposto á metabólitos voláteis de bactérias endofíticas de eucalipto. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009	94

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos habitam o interior de plantas saudáveis sem causar alterações morfológicas aparentes, e a sua descoberta mudou o rumo das pesquisas que buscam agentes de controle biológico. Uma vez que os endófitos protegem os vegetais contra agressões externas, tais como herbivoria, ataque de fitopatógenos e estresses ambientais, são considerados de grande importância na sanidade vegetal. Além disso, os endófitos são importantes produtores de metabólitos com comprovada atividade biológica na planta hospedeira, como os antibióticos, enzimas hidrolíticas, sideróforos e fitohormônios. Estes compostos são produtos do metabolismo secundário secretados durante a fase estacionária e não são diretamente essenciais à sobrevivência do organismo, mas podem atuar de diferentes formas, sendo geralmente a interface entre o microrganismo e o ambiente.

A interação endófito-planta pode ser classificada como mutualística, já que o microrganismo recebe nutriente e proteção da planta e em contrapartida produz compostos químicos que em condições de estresse do hospedeiro, podem protegê-lo. Microrganismos endofíticos exibem potencial biotecnológico como agentes de promoção de crescimento, principalmente por disponibilizar compostos para a planta. A promoção de crescimento é um evento dependente da interação entre o microrganismo promotor do crescimento, a comunidade

microbiana associada ao hospedeiro e o genótipo da planta. Microrganismos endofíticos podem promover o crescimento de duas formas: disponibilizando nutrientes para a planta ou inibindo microrganismos fitopatogênicos. Estudos têm sido realizados com o objetivo de se obter o máximo de promoção de crescimento aliado ao controle de doenças.

Plantas do gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, são de ocorrência natural na Austrália, Indonésia e ilhas próximas, mas está disperso em todo mundo, crescendo nas mais diferentes condições ambientais. *Eucalyptus* possui cerca de 600 espécies e subespécies, sendo cultivada para as mais diversas finalidades, tais como a produção de papel, celulose, lenha, carvão, aglomerado, serraria, óleos para indústria farmacêutica, mel, ornamentação, quebra-vento, entre outros.

O Brasil é o país com a maior área plantada com eucalipto do mundo, e este setor é responsável por 4% do produto interno bruto (PIB), com a geração de setecentos mil empregos diretos e dois milhões de empregos indiretos.

Atualmente, a propagação de genótipos superiores de eucalipto é feita basicamente pela miniestaquia. Este tipo de procedimento requer condições ambientais para o enraizamento das plantas muito similares às condições ótimas ao desenvolvimento de patógenos.

O eucalipto é atacado por vários patógenos, principalmente fungos, desde o viveiro até a fase adulta. A fase em que as plantas estão no viveiro é a mais suscetível, pois apresenta uma série de condições ambientais associadas à fisiologia do hospedeiro que favorecem o estabelecimento de pragas e doenças.

O controle das doenças de mudas de eucalipto em viveiros é feito basicamente pelo uso de controle químico, manejo cultural e utilização de material genético resistente. Entretanto, como a produção de plantas em viveiros oferece um nicho único ao controle biológico, devido ao ambiente controlado das casas de vegetação, o alto valor de seus cultivos e o número limitado ou inexistente de produtos registrados para o controle de doenças este trabalho hipotetiza que existem associadas a plantas de eucalipto plantados no sul do Brasil, bactérias endofíticas capazes de atuar como agente de biocontrole de doenças e promotor de crescimento de plantas de eucaliptos.

Para comprovar tal hipótese, foram propostos os seguintes objetivos:

- Isolar bactérias endofíticas de *Eucalyptus* “urograndis” e avaliar o potencial *in vitro* dos isolados de bactérias endofíticas sobre importantes patógenos de viveiros;
- Avaliar o potencial de biocontrole *in vivo* de isolados selecionados de bactérias endofíticas sobre *Botrytis cinerea*, *Cylindrocladium gracile* e *Xanthomonas* sp., em mudas de *Eucalyptus* “urograndis”;
- Avaliar o potencial como promotor de enraizamento e crescimento de isolados bacterianos endofíticos, em mudas de *Eucalyptus* “urograndis”;
- Avaliar os mecanismos de antagonismo usados pelas bactérias endofíticas no controle dos fitopatógenos;
- Avaliar os mecanismos bioquímicos usados por bactérias endofíticas envolvidos na promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus* “urograndis”;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Eucalyptus* spp. e sua importância econômica

O gênero *Eucalyptus* pertence à família vegetal Mirtaceae, e ocorre naturalmente na Austrália, Indonésia, além de algumas ilhas próximas, como Flores, Alor e Wetar. Este gênero compreende cerca de 600 espécies e subespécies, apresenta grande capacidade adaptativa, podendo crescer nos mais diferentes habitat. Apesar da grande diversidade dentro do gênero, menos de 1% das espécies são utilizadas na indústria, e estas são representadas basicamente por *E. globulus*, *E. grandis* e seus híbridos com *E. urophylla*, *E. viminalis* e *E. dunnii* (Santos *et al.*, 2001).

O plantio de *Eucalyptus* sp. foi introduzido no Brasil em 1904 por Edmundo Navarro de Andrade, junto à Companhia Paulista de Estradas de Ferro, em São Paulo. Mas as plantações em larga escala tiveram impulso a partir da década de 1960, e se intensificaram na década de 1970, com o advento do programa de incentivo fiscal aos plantios florestais associado aos investimentos das indústrias de celulose e papel e siderurgia, além do desenvolvimento de programas de melhoramento genético e da tecnologia de propagação clonal de eucalipto, responsável pela elevada produtividade florestal alcançada pelo gênero (ABRAF, 2007).

De acordo com Santos *et al.* (2001), plantas de eucalipto são utilizadas para os mais diversos fins, como a produção de celulose, papel, lenha, carvão, serraria, aglomerado, óleos para indústria farmacêutica, mel, ornamentação e quebra vento, entre outros.

O Brasil possui a maior área mundial reflorestada com espécies de *Eucalyptus* do mundo (Mafia *et al.*, 2003), o que corresponde a cerca de 2,9 milhões de hectares (Santos *et al.*, 2001). O Rio Grande do Sul em 2005 figurava em 5º lugar na área de plantio de eucalipto no Brasil, com quase 184.245 ha, o que representa 7% da área total brasileira, mas com a chegada de novas empresas ao estado, associado ao aumento da produtividade das já instaladas haverá um aumento significativo no plantio, provavelmente mudando o ranking brasileiro, visto que somente entre o ano de 2005 e 2006 foi estabelecido 55000 ha de áreas novas de plantio, no RS. Portanto, em 2007 o estado do Rio Grande do Sul passou para 4º lugar no ranking nacional, com 222.245ha plantados com eucalipto (ABRAF, 2008).

A eucaliptocultura no Brasil é responsável por 4% do produto interno bruto (PIB) do país, além da geração de cerca de 4,3 milhões empregos diretos e indiretos, o que representa 10,5 % da população economicamente ativa (ABRAF, 2007), e a exportação de produtos gera US\$ 2 bilhões/ano (Silva, 1997).

A produção brasileira de celulose vem crescendo a uma taxa de 5,6% ao ano desde 1996. No ano de 2005, a produção nacional alcançou 10,1 milhões de toneladas e o consumo, representando cerca de metade da produção, foi de 4,9 milhões de toneladas. No *ranking* mundial de produção de celulose, o Brasil

ocupa a 7^o posição, porém como fabricante de celulose fibra curta, o Brasil é o principal produtor mundial, ocupando a 1^o posição (ABRAF, 2006).

Em 2005, o setor florestal exportou US\$ 7,716 bilhões, correspondendo a 5,6% do total exportado pelo país. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em sua análise da Balança Comercial do Agronegócio, as exportações do grupo de produtos florestais como celulose e papel e madeira e suas obras foram o terceiro complexo em exportação, superado apenas pelos complexos soja e carnes (ABRAF, 2006). O setor de florestas plantadas foi responsável por exportar um total de US\$ 5,158 bilhões, perfazendo 63,5% do total exportado pelo setor florestal. As importações de produtos florestais são insignificantes, relativamente às exportações, restringindo-se a alguns produtos específicos, como é o caso de celulose e fibra longa e alguns tipos de papéis (ABRAF, 2007).

O setor florestal tem apresentado peso significativo no superávit da balança comercial brasileira ao longo dos últimos anos. A participação do setor de florestas plantadas no superávit da balança comercial do país foi de 8,5% em 2005 (ABRAF, 2006).

Nos últimos anos, o setor florestal brasileiro tem anunciado e realizado investimentos significativos frente a outros países.

Até 2012, o setor florestal-industrial pretende investir cerca de US\$ 20 bilhões (sendo cerca de US\$ 14 bilhões no segmento de celulose e papel e US\$ 6 bilhões no segmento de produtos de madeira sólida). Este montante representa aproximadamente 80% a mais que países como o Chile ou Uruguai, que têm investimentos programados da ordem de US\$ 4 bilhões e US\$ 2 bilhões, respectivamente (ABRAF, 2006).

Devido a todo esse promissor panorama econômico do setor florestal, é premente a obtenção de mudas de qualidade, para suprimento da base da produção florestal.

2.1.1 Propagação clonal de *Eucalyptus* spp.

A silvicultura intensiva clonal proporcionou a maximização da produção, mantendo as características favoráveis das plantas, evitando a variabilidade encontrada em árvores obtidas a partir de sementes. No entanto, estes ganhos só foram possíveis a partir de um programa de melhoramento sexuado e pela adoção de técnicas silviculturais adequadas, dentre elas a propagação clonal (Higashi *et al.*, 2000).

A propagação vegetativa, pelo processo convencional de estaquia ou pela técnica da micropropagação, facilita a multiplicação de genótipos desejados. O processo da propagação vegetativa não inclui meiose, portanto, os rametes (brotações originárias da planta matriz) são geneticamente idênticos aos ortetes (planta matriz). Variações fenotípicas entre os rametes dentro de um clone, todavia, existem. As causas das variações são, provavelmente, ambientais e causadas por fatores relacionados ao propágulo, isto é, tamanho da estaca, período que as estacas são coletadas e as condições em viveiro (ou seja, vigor do propágulo ou a qualidade do sistema radicular) (Higashi *et al.*, 2000).

O uso de propagação clonal para produção de mudas de eucalipto começou em 1975, na República Popular do Congo, sendo introduzido no Brasil no final dos anos 70 do século passado (Ferreira *et al.*, 2004). O processo de propagação clonal de genótipos superiores de eucalipto utilizados

atualmente nos viveiros comerciais brasileiros é realizado, em grande parte através de miniestaquia, foi desenvolvida em 1996 por um grupo de pesquisadores do IPEF/USP, a qual consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo método de estaquia convencional como fontes de propágulos vegetativos, que são manejadas em áreas denominadas minijardins clonais (IPEF, 1996).

O processo de clonagem de eucalipto via miniestaquia, segundo Alfenas *et al.* (2004), pode ser dividida em cinco fases, sendo estas a produção de brotos, onde se realizam os tratamentos culturais na minicepa, como irrigação, fertilização, toaletes, ponto de coleta, controle de pragas e doenças, controle de irradiação luminosa e temperatura, as outras fases correspondem ao enraizamento, aclimatação à sombra, crescimento e rustificação das mudas. As fases de produção de brotos no minijardim clonal e enraizamento são as fases mais críticas, onde os maiores ganhos em produtividade são alcançados quando otimizado o manejo das plantas nessas fases (Mafia *et al.*, 2005).

De acordo com Hartmann *et al.* (1997), a formação de raízes adventícias a partir de estacas e miniestacas caulinares é um processo complexo, precedido de diversas fases, como o agrupamento de células meristemáticas, a diferenciação desses grupos celulares em primórdios de raízes, crescimento e emergência dessas raízes, incluindo a ruptura de tecidos de caule e formação de conexões com os tecidos condutores.

Os principais problemas relacionados à clonagem de eucalipto se referem aos índices de enraizamento das mudas que podem ser muito variáveis entre espécies e clones diferentes, bem como as doenças que ocorrem durante a formação dessas mudas (Alfenas *et al.*, 2004).

Em relação à taxa de enraizamento, vários fatores bióticos e abióticos podem influenciar neste parâmetro, como o genótipo da planta, a idade, localização na minicepa e a sanidade da estaca, além de umidade, temperatura e ataque de fitopatógenos, entre outros aspectos. Em geral, não é necessário o uso hormônios vegetais para indução de enraizamento de eucalipto, mas isso depende grandemente do genótipo a ser propagado (Alfenas *et al.*, 2004).

Atualmente, existem trabalhos relacionando a atividade de microrganismos, principalmente bactérias, ao aumento nos índices de enraizamento, aumento da biomassa da parte aérea de mudas de eucalipto, além de também atuarem no aumento da resistência das plantas desafiadas com diferentes patógenos de viveiro (Alfenas *et al.*, 2004; Procópio, 2004, Mafia *et al.*, 2005).

2.2 Doenças do eucalipto em fase de viveiro

O eucalipto, após sua introdução para fins comerciais manteve-se praticamente livre de doenças até o início de 1970 (Teixeira *et al.*, 2004). Contudo, devido à alta demanda e a alta variabilidade genética de *Eucalyptus* spp. para plantio, em meados dos anos 80 começou a ser utilizada a técnica de propagação clonal visando a formação de talhões mais homogêneos, formados por genótipos superiores. No entanto, as condições ambientais necessárias nas fases iniciais deste tipo de processo, como o enraizamento, são extremamente favoráveis ao desenvolvimento de patógenos vegetais, principalmente fungos (Mafia *et al.*, 2003), como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, diferentes espécies de *Cylindrocladium* sp., entre outros (Alfenas *et al.*, 2004).

As perdas na produção de mudas de *Eucalyptus* sp. causadas pelo ataque de patógenos giram em torno de 1% ao mês, quando não ocorrem surtos epidêmicos que podem levar a perdas de até 100% do material propagativo (Alfenas *et al.*, 2004).

O controle dos fitopatógenos em viveiro é realizado basicamente por meio de métodos químicos, culturais e genéticos, mas estes não têm mostrado controle eficiente. Além disso, para algumas doenças emergentes em viveiros florestais, como a bacteriose foliar causada por *Xanthomonas* sp., atualmente não há qualquer recomendação de controle, o que oportuniza a busca por agentes de biocontrole (Gonçalves, 2003).

O uso de insumos químicos, devido aos altos custos, a baixa eficiência e aos impactos ambientais negativos, deve ser realizado de forma racional, e, neste sentido devem ser desenvolvidas pesquisas que buscam inimigos naturais, à semelhança do que foi feito por Mafia *et al.* (2003) e Procopio (2004).

O uso de programas de controle biológico na área florestal é possível, principalmente quando as mudas se encontram na fase de viveiro, onde as condições ambientais podem ser controladas (Grigoletti Júnior *et al.*, 2007).

Existem estudos mostrando que microrganismos podem reduzir as doenças em eucalipto, como a avaliação da indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias à ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii* realizado por Teixeira *et al.* (2004) que indicam que o emprego de microrganismos pode reduzir o uso de fungicidas. Procopio (2004) obteve isolados de bactérias endofíticas que reduziram drasticamente o crescimento micelial de *R. solani*, *Cylindrocladium scoparium* e *B. cinerea*, e sugere que a

propagação clonal de eucalipto facilita a inoculação dos antagonistas endofíticos, o que permitiria que as mudas fossem previamente inoculadas para o campo, o que aumentaria a sua resistência/tolerância a patógenos.

Um viveiro de produção de mudas possui um ambiente bastante característico, com diferentes fatores ambientais controlados, como temperatura e umidade. É importante ressaltar que os valores ideais de alguns parâmetros para a produção de mudas, também se aproximam dos níveis ótimos para o desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos. Por este motivo, plantas em fase de viveiro são alvos de diferentes patógenos.

No caso da produção de mudas de eucalipto no sul do Brasil, principalmente pelo sistema de propagação clonal via estaquia, os patógenos de maior impacto são a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti*, agente causal da bacteriose foliar, e os fungos *Cylindrocladium* sp., *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Quambalaria eucalypti*, entre outros (Alfenas *et al.*, 2004).

No presente trabalho foi selecionado para avaliação da capacidade de biocontrole de bactérias endofíticas, a bactéria *Xanthomonas* sp., e os fungos *Cylindrocladium gracile* e *Botrytis cinerea*, por serem agentes causais das doenças mais importante em viveiro no Rio Grande do Sul.

2.2.1 Bacteriose foliar

Entre as doenças foliares de eucalipto, as doenças causadas por bactérias surgem como as mais agressivas. Somente em 2003/04, estima-se que 4 milhões de mudas foram descartadas devido a desfolha causadas por bactérias patogênicas (Cunha *et al.*, 2006). Apesar de vários gêneros de

bactérias fitopatogênicas terem sido associados à bacteriose foliar do eucalipto (Coutinho & Preisig, 2002), um trabalho realizado em 2003, concluiu que *Xanthomonas axonopodis* é a espécie predominante nos viveiros florestais brasileiros (Gonçalves, 2003).

Os sintomas típicos de *X. axonopodis* em eucalipto são as lesões encharcadas do tipo anasarca, internervurais, angulares, concentradas ao longo da nervura central, nas margens da folha ou distribuídas sobre todo o limbo. Com o progresso da doença, as lesões tornam-se ressecadas e escurecidas, podendo haver perfurações no centro da lesão, devido ao abortamento da área necrosada (Gonçalves, 2003).

Os principais danos desta doença se devem a diminuição da área fotossintética, pelas manchas foliares e desfolha, o que leva a redução de crescimento das plantas, que em condições de viveiro, tornam as mudas inaptas para o plantio (Alfenas *et al.*, 2004).

A bacteriose foliar é mais importante em viveiros onde a irrigação é feita por aspersão, devido à necessidade de água livre para que a bactéria penetre na planta. No sul do Brasil, a doença é a mais importante no período de novembro a março, pelas condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença, como temperaturas mais elevadas e alta umidade (Alfenas *et al.*, 2004).

Não existe nenhuma recomendação para o controle deste patógeno, além do manejo cultural, como o uso do sistema de subirrigação, retirada de plantas doentes, e limpeza de folhas caídas (Gonçalves, 2003; Alfenas *et al.* 2004).

2.2.2 Mofo cinzento

Botrytis cinerea é um fungo necrotrófico generalista, associado com agente causal de doença em mais de 200 espécies de plantas cultivadas em todo o mundo (Williamson *et al.*, 2007). No eucalipto, é o agente causal do mofo cinzento, uma das doenças mais importantes no sul do Brasil. Este fungo é capaz de atacar a maioria das espécies e clones de *Eucalyptus* sp. (Alfenas *et al.*, 2004; Krugner & Auer, 2005).

Este fungo ataca principalmente tecidos jovens, se caracterizando pela abundante esporulação acinzentada sobre as estacas, miniestacas ou microestacas mortas, folhas e brotações infectadas, levando a morte de mudas em reboleiras ou com distribuição aleatória nos canteiros. Este patógeno penetra direta ou indiretamente pelos tecidos, não havendo necessidade de ferimentos, mas as epidemias são mais severas em mudas debilitadas ou com ferimentos. Os sintomas iniciam-se por manchas necróticas, enrolamento, secamento e conseqüente, queda das folhas (Alfenas *et al.*, 2004; Grigoletti Júnior *et al.*, 2007).

A disseminação deste patógeno se dá principalmente pelo transporte de conídio pelo vento ou insetos, além deste fungo poder viver saprofiticamente no solo e sobreviver na forma de escleródios ou micélio dormente (Krugner & Auer, 2005).

No Rio Grande do Sul, esta doença é mais importante em viveiros no período de inverno, com temperaturas entre 15 e 25 °C, dias curtos e nublados com alta umidade (>90%) e baixa luminosidade (Alfenas *et al.*, 2004). Em estudo realizado por Mafia *et al.* (2006) foi verificado que temperatura máxima

é a variável que deve ser monitorada para fins de previsão dessa doença, havendo alto risco de incidência quando os registros de temperatura máxima forem inferiores a 27°C.

O controle deste patógeno é realizado basicamente pelo uso de fungicidas sintéticos (Chen *et al.*, 2008), entretanto, além do impacto ambiental dessa estratégia de controle, na eucaliptocultura brasileira a mesma é ilegal, visto que não existe nenhum produto químico registrado para a mesma (Alfenas *et al.*, 2004).

2.2.3 Manchas foliares e podridão de estacas causadas por *Cylindrocladium* sp.

Existem várias espécies de *Cylindrocladium* associadas a sintomas de doença em mudas de eucalipto, com destaque para *C. candelabrum*, *C. gracile*, *C. ovatum*, *C. parasiticum*, *C. pteridis* e *C. scoparium* (Alfenas *et al.*, 2004), sendo *C. candelabrum* a mais comum.

Mudas infectadas com *Cylindrocladium* sp. podem apresentar manchas foliares com diferentes padrões de cor, forma e tamanho, dependendo da espécie de eucalipto, da espécie de *Cylindrocladium* e das condições do ambiente. Simultaneamente, pode haver lesões necróticas escuras no caule das mudas, recobertas com frequência pelo micélio branco-brilhante do patógeno, provocando murcha, seca e morte de brotações (Krugner & Auer, 2005).

O principal dano do ataque deste patógeno se refere à desfolha, o que leva a debilitação das plantas infectadas, e morte das mesmas.

As principais fontes de inóculo são brotações doentes, substrato e água contaminada, bem como bandejas e tubetes. Assim como *B. cinerea*, são patógenos que se desenvolvem bem em dias nublados, com temperatura alta e umidade elevada, característico do inverno (Alfenas *et al.*, 2004).

2.3 Microrganismos endofíticos no controle biológico de doenças de plantas

Os microrganismos endofíticos foram descritos pela primeira vez pelo fitopatologista Anton DeBary em 1866, que os descreveu como sendo aqueles microrganismos que colonizam assintomaticamente o interior de tecidos vegetais (DeBary, 1866), já Petrini (1991) os define como sendo aqueles microrganismos que habitam, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, o interior de plantas sem causar danos ao hospedeiro, sendo representados basicamente por fungos e bactérias.

Atualmente, o conceito de microrganismo endofítico se refere a aqueles microrganismos cultiváveis ou não, que vivem no interior de plantas sem causar danos ao hospedeiro, nem desenvolver estruturas externas (Azevedo & Araújo, 2006). Realmente, ao se considerar o termo “endófito”, temos como todos aqueles que habitam o interior de plantas, entretanto, devido ao maior conhecimento acumulado com os endófitos capazes de produzir alterações morfológicas na planta hospedeira e pelos mesmos já possuírem uma nomenclatura diferenciadora própria, como as micorrizas e os rizóbios, o termo “microrganismo endofítico” tem sido utilizado, de uma forma didática, para designar aqueles que não produzem tais alterações (Neto *et al.*, 2002; Azevedo & Araújo, 2006).

O isolamento de endófitos pode ser feito de forma direta, pelo uso de meios de cultura ou indireta, via técnicas moleculares visando o isolamento dos microrganismos endofíticos não cultiváveis, o que dá uma visão mais realista da comunidade endofítica do hospedeiro (Lacava *et al.*, 2006). A definição de microrganismo endofítico é bastante variável, sendo a mesma geralmente dependente da perspectiva pelas quais os endófitos estão sendo isolados e subsequentemente avaliados (Araújo *et al.*, 2008).

Apesar da ampla distribuição taxonômica de hospedeiros de endófitos, admite-se que todas as plantas possuam uma ou mais espécies de endófitos em seu interior (Strobel *et al.*, 2004). Estes seres foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas somente em 1866 foi delineada uma distinção entre endófitos e patógenos de plantas. Como os endófitos não eram relacionados com sintomatologias de doenças, ficaram esquecidos até meados de 1970, quando então por uma série de motivos, começaram a chamar atenção pelas propriedades que apresentavam, tais como proteção do hospedeiro contra insetos-praga, patógenos e inclusive contra herbívoros (Neto *et al.*, 2002).

De acordo com Strobel (2002), parece que todas as plantas superiores possuem microrganismos endofíticos em seu interior, apesar da relação física exata entre estes ainda permanecer um tanto obscura. Provavelmente, os endófitos evoluíram de patógenos de plantas (Carrol, 1988; Rubini *et al.*, 2005).

Provavelmente, a relação endófito-planta ocorre há muito tempo, desde o surgimento das plantas superiores (Krings *et al.*, 2007). Esta associação de longo tempo deve ter permitido transferências genéticas entre endófitos e hospedeiros e vice-versa. Isto, obviamente, permite um mecanismo mais rápido

e seguro do endófito minimizar os estresses ambientais e permite maior compatibilidade com a planta hospedeira. Deve ser por estas razões que microrganismos associados a plantas evoluíram mecanismos bioquímicos, que resultaram na produção de hormônios de crescimento vegetal (Strobel, 2002). Inclusive, o melhoramento tradicional de plantas pode, na verdade, estar selecionando plantas com uma melhor capacidade de manutenção de microrganismos endofíticos, como observado em trigo, onde as cultivares modernas possuem uma comunidade endofítica mais diversa e mais agressivamente colonizada por *Pseudomonas* spp. endofíticas produtoras de metabólitos bioativos, do que as raças ancestrais (Germida & Siciliano, 2001; Berg & Hallmann, 2006).

A penetração dos endófitos nas plantas se dá basicamente através de aberturas naturais ou ferimentos, sendo as raízes a principal porta de entrada (Neto *et al.*, 2002), podendo ainda o hospedeiro produzir substâncias atrativas aos microrganismos, tais como os flavonóides (Broughton *et al.*, 2000).

De acordo com Carroll (1988), o mutualismo endofítico possui algumas generalidades que permitem que seja caracterizada esta relação, tais como a especificidade ao hospedeiro, o não desenvolvimento de sintomas de doenças, a transmissão vertical ou na falta desta, a transmissão horizontal, a colonização do interior do hospedeiro, a relação taxonômica entre o simbiote e conhecidos antagonistas de patógenos ou herbívoros, e a produção de compostos secundários pelo simbiote.

A interação entre endófito e hospedeiro pode ser ainda mutualística facultativa dependendo da relação custo-benefício resultante da infecção e a diminuição das pragas e doenças. Os endófitos possuem grandes vantagens

em relação aos microrganismos epifíticos, devido à ocupação de um nicho praticamente vago, maior acesso aos nutrientes, proteção contra dessecação e contra pragas, doenças e parasitas (Lewis *et al.*, 2001; Strobel, 2002). Cabe ressaltar que a relação endófito-planta em condições de estresse do hospedeiro pode ser negativa, podendo microrganismos endofíticos desencadear sintomas de doença (Maes *et al.*, 2009) ou ainda trazerem desvantagens para o hospedeiro, como por exemplo, a redução na capacidade fotossintética (Pinto *et al.* 2000).

De acordo com Azevedo *et al.* (1998), várias mudanças fisiológicas em plantas são relacionadas à presença de microrganismos endofíticos, e o equilíbrio entre hospedeiro e simbiote parece ser controlado por substâncias químicas (Huang *et al.*, 2001). Muitos endofíticos evoluíram rotas bioquímicas, em que seus produtos resultam em benefícios a seus hospedeiros, tais como a produção de hormônios vegetais. A produção de auxinas, abscisinas, etileno, giberelinas e cinetinas já foram relatadas como sendo produzidas por microrganismos endofíticos (Strobel, 2002; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004).

Este tipo de estratégia tem despontado como uma alternativa ecologicamente correta, levando a mitigação dos impactos causados pelos agrotóxicos. Estratégias diferenciadas de controle de doenças são de extrema importância, principalmente na eucaliptocultura, onde não existem produtos registrados no Ministério da Agricultura e, portanto não poderiam ser utilizados (Grigoletti Júnior *et al.*, 2007).

Os microrganismos endofíticos, pelas características intrínsecas de sua relação com a planta, são candidatos promissores a agente de controle biológico, como discutido no Simpósio sobre Endófitos, realizado em julho de

2005, em Austin, Texas, e organizado e publicado por Backman & Sikora (2008). Ao menos sete produtos a base de endófitos foram aprovados para uso em plantas de uso alimentar ou não, principalmente em sistemas onde o uso pesado de produtos químicos é restrito devido ao acúmulo de resíduos ou devido à restrição de produtos contaminados por países importadores (Elad & Stewart, 2004).

O controle biológico por definição, “consiste na redução do inóculo ou das atividades determinantes da doença provocados por um patógeno ou parasita, nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizados naturalmente ou pela manipulação do hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (Baker & Cook, 1974)”.

Os mecanismos pelos quais os endófitos podem atuar como agentes de biocontrole incluem a produção de substâncias antifúngicas e antibacterianas (Castillo *et al.*, 2006), enzimas hidrolíticas, competição por nutrientes, produção de sideróforos, exclusão de nicho e indução de resistência sistêmica adquirida (Sturz *et al.*, 2000; Backman & Sikora, 2008).

No Brasil, a busca por agentes de biocontrole de doenças de plantas na microbiota endofítica de planta já é uma realidade, como os trabalhos realizados por Rubini *et al.* (2005), Paz (2005) e Maki (2006), a partir de plantas de cacaueteiro visando o controle de *Moniliophthora (Crimipellis) perniciosa*. O trabalho de Lacava *et al.* (2004) que isolou bactérias endofíticas de citros, buscando antagonistas a *Xylella fastidiosa* e o isolamento e seleção de agentes de biocontrole de doenças pós-colheita em maçãs, realizado por Sartori (2003), entre outros. Além disso, a produção de plantas em viveiros oferece um nicho

único ao controle biológico, devido ao ambiente controlado das casas de vegetação, o alto valor de seus cultivos e o número limitado ou inexistente de produtos registrados para o controle de doenças (Paulitz & Bélanger, 2001), o que abre um novo campo para isolamento e seleção de agentes de biocontrole endófitos, como no trabalho realizado por Procópio (2004), que isolou bactérias endofíticas de eucalipto para esse fim. Além dessas vantagens, a forma de produção de mudas clonais de eucalipto via estaquia facilita a inoculação de endófitos, visto que na produção da muda é feito um corte, que pode servir como porta de entrada para o agente de biocontrole, além de também já ter sido detectado a presença de bactérias endofíticas em sementes de *E. brassiana*, *E. citriodora*, *E. globulus* x *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. camaldulensis* (Ferreira *et al.*, 2008).

Os microrganismos endofíticos podem ser produtores de substâncias bioativas que devem estar envolvidas nas relações com o hospedeiro. Como resultado dos papéis que estes metabólitos secundários desempenhem no ambiente, eles podem ter aplicação na medicina, agricultura e indústria. Desta maneira, os esforços para o isolamento de microrganismos endofíticos e extração de seus compostos têm aumentado substancialmente nos últimos anos (Strobel, 2002).

Estudos realizados demonstraram que 51% das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endofíticos eram desconhecidas para a ciência, em relação aos 38% de novas substâncias isoladas da microbiota do solo (Schutz, 2001). Ainda, sabe-se que os endófitos produzem diferentes substâncias como hormônios, antibióticos, antitumorais, entre outros (Azevedo *et al.*, 1998; Metz *et al.*, 2000; Neto *et al.*, 2002).

Devido a todas essas propriedades apresentadas por estes microrganismos, são de suma importância que sejam realizadas pesquisas visando à aplicação desses microrganismos nas mais diferentes áreas, como médica, industrial e agrícola.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento de microrganismos endofíticos cultiváveis de amostras de *Eucalyptus* “urograndis”

3.1.1 Amostras Vegetais

O material vegetal utilizado no presente trabalho foi obtido de plantio de um clone comercial (4622) do híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, utilizado no Rio Grande do Sul. Este material foi cedido pela Tecnoplanta Florestal Ltda.

3.1.2 Isolamento de microrganismos endofíticos de plantas de eucalipto

Após a coleta de ramos e folhas de plantas com cerca de três metros de altura, o material vegetal foi levado para o Laboratório de Microbiologia Fitopatológica da UFRGS/RS, onde foram realizados os isolamentos, como descrito por Procópio (2004). A coleta foi feita em janeiro de 2007, onde foram amostradas 10 plantas de eucalipto sem sintomas visíveis de doença, retirando-se 10 fragmentos de ramos com folhas por planta. Essas folhas foram misturadas, e então 20 folhas retiradas aleatoriamente para isolamento de bactérias. Cinco fragmentos de folha contendo a nervura central foram

colocados por placa de Petri, sendo utilizadas 15 placas para cada tipo de tecido, totalizando 75 fragmentos/tipo de tecido. Os isolados bacterianos obtidos foram identificados primeiramente por numeração arábica precedida da sigla EUCB (eucalipto/bactéria).

Os ramos e folhas foram lavados em água corrente e desinfestados por meio da imersão em álcool 70% por 1 min, em hipoclorito de sódio 2% por 3 min, em álcool 70% por 1 min, seguido de lavagem em água esterilizada por três vezes, sendo 1 min cada lavagem. Os ramos foram descascados e fragmentados e transferidos para placas com meio TSA (triptona, 1,5%; peptona de soja 0,5%; NaCl 0,5%; ágar 1,5%; pH 7,0) suplementado com 2 g de polivinilpirrolidona (PVP) e incubadas a 28 ± 1 °C. Para avaliar a eficiência da desinfestação, uma alíquota da última água de lavagem foi semeada sobre o meio TSA para isolamento de bactérias contaminantes.

Para isolamento de microrganismos endofíticos de crescimento mais lento, após desinfestação os fragmentos foram colocados sobre meio de folhas (peptona 5 g, glicose 15 g, Agar 15 g, extrato de folhas de eucalipto 400 mL, água destilada até completar volume de 1 L, pH 7,9). O extrato de folhas foi obtido pela trituração de 100 g de folhas de eucalipto em 400 mL de água destilada, filtrada em gaze.

A frequência de isolamento em porcentagem (FI) de bactérias endofíticas foi obtida por meio da fórmula $FI = (B / F) \times 100$ onde: F = número de fragmentos inoculados e B o número de fragmentos infectados.

3.1.3 Reisolamento de microrganismos endofíticos de plantas de eucalipto

O reisolamento das bactérias endofíticas seguiu o mesmo protocolo descrito acima para o isolamento, diferindo apenas a origem do material vegetal, o qual foi obtido de mudas de *Eucalyptus* "urograndis" clone 4622 com 80 dias, pré-inoculadas com bactérias endofíticas.

3.2 Avaliação da variabilidade genética e identificação de bactérias endofíticas de eucalipto baseada em técnicas de biologia molecular

3.2.1. Identificação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram identificados baseados na análise da seqüência parcial do gene 16S rRNA.

3.2.1.1 Extração de DNA genômico das bactérias

Os isolados foram cultivados em 5 ml de TS 10% por 24 h a 28 ± 1 °C, sob agitação de 150 rpm. Dois a 4 mL da cultura foram centrifugados por 5 minutos a 14000 g e as bactérias foram ressuspensas em 500 µL de TE (100 µM de Tris-HCl, pH 8,0), centrifugadas e ressuspensas novamente em TE, juntamente com 0,5 g de pérolas de vidro e 15 µL de SDS 20%. As células foram agitadas em homogeneizador de células por 30 s a 3500 bpm. Ao lisado celular foram adicionados 500 µL de fenol, homogeneizados por inversão e centrifugados por 5 min a 14000 g. A fase aquosa foi extraída uma vez com fenol:clorofórmio (1:1) e uma vez com clorofórmio, e então, o DNA precipitado

com 1/10 volume de NaCl 5M e 0,6 volume de isopropanol (3 minutos a temperatura ambiente). A solução foi centrifugada durante 10 min a 14000 x g, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a 37 °C e ressuspendido em 50 µl de água Mili-Q esterilizada. O DNA total foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1% p/v) em tampão 1X TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), segundo Sambrook *et al.* (1989).

3.2.1.2 Amplificação

A amplificação do 16S rDNA foi realizada utilizando-se a técnica de PCR com os *primers* universais PO27F (5´- GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3´) e 1378R (5´-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3´). As reações tiveram um volume final de 50 µl contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde; 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTPs; 3,75 mM de MgCL₂ e 0,05 U da enzima Taq DNA polimerase em 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl. Em todas as reações foi usado um controle negativo sem o DNA molde.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research, USA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 63 °C por 1 min e extensão de *primers* a 72 °C por 1 min, seguida de extensão final a 72 °C por 10 min. Após a amplificação, 4 µL da reação de PCR foi avaliada em eletroforese em gel de agarose (1% p/v) em tampão 1 X TAE e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml), para visualização de um fragmento de aproximadamente 1350 pb, e fotodocumentação.

Para a identificação dos isolados, os produtos de PCR 16S rDNA foram purificados e enviados para o Centro de Sequenciamento do Genoma Humano (Universidade de São Paulo) para sequenciamento parcial do 16S rDNA. As seqüências foram então, analisadas pelo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990), contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e RDPquery (Ribossomal Database Project).

As relações filogenéticas entre os isolados e as seqüências das espécies referências foram inferidas usando o método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). As distâncias evolutivas foram computadas usando o método de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). As análises filogenéticas foram realizadas no programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

3.3 Avaliação do potencial antagônico de bactérias endofíticas de eucalipto aos principais patógenos de mudas, em condições de casa de vegetação

3.3.1 Isolamento de microrganismos fitopatogênicos

Mudas de *Eucalyptus* “urograndis” clone 4622 mostrando sintomas e sinais de doenças importantes a cultura foram coletadas e enviadas para o Laboratório de Microbiologia Fitopatológica da UFRGS.

Áreas do órgão atacado contendo tecido sadio e doente foram imersos em álcool 70% durante um minuto, transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio 1% e mantidas durante dois minutos, e então, lavadas em água destilada esterilizada e colocadas sobre placa de Petri contendo TSA para

isolamento de bactérias fitopatogênicas e BDA para fungos fitopatogênicos. Todos isolados obtidos passaram pelo teste de patogenicidade.

Os patógenos fúngicos foram identificados por sua morfologia macro e microscópica de acordo com Ferreira, 1989 e Aparecido et al., 2008, já a bactéria fitopatogênica foi identificada por testes bioquímicos e culturais e de hipersensibilidade em plantas de fumo.

3.3.1.1 Teste de patogenicidade

Mudas do híbrido *Eucalyptus* "urograndis" clone 4622 sem sintomas de doença foram inoculadas com os microrganismos patogênicos isolados a partir de tecidos doentes para confirmação de sua patogenicidade.

3.3.1.1.1 Teste de patogenicidade com bactérias

Cinco mudas com 30 dias de idade, previamente mantidas em câmara úmida durante 3 horas, foram atomizadas com uma suspensão de *Xanthomonas* sp. numa concentração de 10^6 células/ml, preparada a partir da raspagem da colônia bacteriana cultivada em meio TSA e transferência para solução salina 0,85% esterilizada. As plantas testemunha foram atomizadas somente com solução salina esterilizada.

As plantas foram avaliadas diariamente até o aparecimento de sintomas, conforme descrito por Gonçalves (2003).

3.3.1.1.2 Teste de patogenicidade com fungos

Os fungos *Botrytis cinerea* e *Cylindrocladium gracile*, isolados de tecidos de *E. urograndis* 4622 com sintomas de doença, foram cultivados em ágar batata dextrose (BDA), durante sete dias a 28 ± 1 °C.

Discos contendo crescimento micelial de culturas foram colocados em hastes com ferimentos leves, feitos com um perfurador artesanal preparado com a inserção de 20 agulhas de pontas finas fixadas em um prendedor de roupa (Grigoletti Júnior *et al.*, 2005). Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara úmida até o início do aparecimento de sintomas.

Cinco plantas foram utilizadas para avaliação da patogenicidade de cada isolado, e, também para a testemunha onde foram inoculados somente discos de BDA, sem crescimento de microrganismos.

3.4 Avaliação do antagonismo direto entre bactérias endofíticas e microrganismos fitopatogênicos

Todos os experimentos foram realizados a 28 ± 1 °C. Seis placas de Petri foram usadas para cada tratamento no ensaio de antagonismo direto, o controle consistiu na inoculação somente do patógeno.

3.4.1 Bactérias endofíticas x Bactéria fitopatogênica

Para determinação da ação inibitória das bactérias endofíticas sobre *Xanthomonas* sp., foi usado o método de difusão de dupla camada (Romeiro, 2007).

As bactérias endofíticas foram crescidas em meio TS (15 g de triptona; 5 g de peptona; 1 L de água destilada, pH 7,5) sob agitação de 150 rpm por 48 h.

Após esse período, foi inoculado na forma de ponto no centro de uma placa de Petri contendo TSA, 10 μ L do meio TS com crescimento bacteriano. As placas foram incubadas por 48 h, e então, as placas invertidas e adicionado 1 ml de clorofórmio na tampa. Após 20 min, estas ficaram entreabertas por 30 min para eliminação do resíduo de clorofórmio. Concluída essa fase, as placas foram retornadas a posição normal e adicionado 5 mL de TSA semisólido fundente (48 °C), previamente inoculado com 0,1 mL de cultura de *Xanthomonas* sp., previamente crescida em meio TS por 48 h.

As placas foram incubadas e examinadas diariamente até o quinto dia após a inoculação para verificação da formação de halos de inibição. O resultado foi expresso como índice de antibiose, obtido por $IE = \frac{\varnothing \text{ halo}}{\varnothing \text{ colônia}}$ (Rosato et al., 1981).

3.4.2 Bactérias endofíticas x Fungos fitopatogênicos

Este experimento foi realizado, baseado no método descrito por Benhamou & Chet (1993), utilizando placas de Petri contendo meio de cultura BDA. No centro de cada placa de Petri foram colocados discos contendo colônias dos patógenos. Distante dois centímetros das bordas das placas foram inoculados na forma de estrias, as bactérias endofíticas. Como controle foi colocado um disco de cada patógeno no centro da placa, sem a posterior inoculação das estrias bacterianas.

A avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno, expresso como diâmetro médio, foi feita após sete dias de incubação a 28 ± 1 °C, com auxílio de uma escala milimétrica.

3.5 Avaliação de aspectos bioquímicos de microrganismos que podem estar associados ao biocontrole

3.5.1 Produção de metabólitos voláteis

Para avaliação da produção de metabólitos voláteis foram usadas seis placas para cada tratamento e o controle, sendo que o mesmo foi obtido pela não-inoculação da bactéria endofítica.

3.5.1.1 Produção de metabólitos voláteis por bactérias endofíticas inibitórios a fungos fitopatogênicos

Discos contendo crescimento micelial dos patógenos (1 cm de diâmetro) foram inoculados no centro de uma placa contendo BDA, e em outra placa contendo o meio TSA foi inoculado os isolados de bactérias endofíticas sobre todo o meio de cultura (Dennis & Webster, 1971).

Após, a placa contendo o fungo fitopatogênico foi invertida sobre a placa contendo a bactéria, e estas foram seladas com filme plástico e incubada a 28 ± 1 °C. O controle consistiu na inversão de uma placa de Petri inoculada com um disco do patógeno sobre uma placa sem inoculação de microrganismo endofítico. Seis repetições foram usadas para cada tratamento.

A avaliação do experimento foi realizada pela medição do crescimento micelial do fitopatógeno, expresso como diâmetro médio da colônia, sete dias após a inoculação.

3.5.1.2 Produção de metabólitos voláteis por bactérias endofíticas inibitórios a bactérias fitopatogênicas

Duas séries idênticas de placas de Petri contendo o meio TSA inoculadas com uma suspensão com 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} UFC/mL de *Xanthomonas* sp. foram preparadas. Placas contendo o meio TSA foram semeadas com alça de níquel-cromo com os isolados de bactérias endofíticas, e então o fundo das placas contendo o patógenos foi invertido sobre o fundo da placa contendo a antagonista, e as placas seladas com parafilme.

As placas foram incubadas a 28 ± 1 °C, e inspecionadas de 12 em 12 h, para verificação do tempo de surgimento de colônias da bactéria fitopatogênica, número de colônias e aspecto (Romeiro, 2007).

3.5.2 Produção de ácido hidrociânico (HCN) por bactérias endofíticas de eucalipto

Para detecção de ácido hidrociânico foi utilizado o método modificado de Miller & Higgins (1970). As bactérias endofíticas foram semeadas em placas de Petri contendo TSA. Na tampa da placa foi colocado um disco de papel filtro esterilizado embebido em uma solução de ácido pícrico 0,5% e Na_2CO_3 1%. As placas foram seladas com filme plástico e incubadas por sete dias a 28 ± 1 °C. As placas controle não receberam inóculo. O experimento consistiu de seis repetições para cada tratamento e seis para o controle.

Após a incubação, a mudança na cor do papel filtro de amarelo para marrom foi considerada como indicativo da produção de HCN.

3.6 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas por bactérias endofíticas

A produção de enzimas hidrolíticas foi determinada em meio líquido, com o objetivo de detectar e quantificar a produção de quitinases, glucanases e proteases produzidas pelos isolados que se mostraram eficientes no antagonismo. Três repetições foram analisadas para cada isolado de bactéria endofítica.

3.6.1 Avaliação da atividade quitinásica e glucanásica em meio líquido

A análise da atividade quitinásica e glucanásica foi baseada no método de Miller (1959), o qual mede a liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de quitina coloidal (Sigma®) e da laminarina (Sigma®), respectivamente, pelo uso de ácido dinitrosalicílico – DNS.

Primeiramente, as bactérias foram crescidas em meio de cultura mineral (K_2HPO_4 0,7g; KH_2PO_4 0,3g; $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,5g; $FeSO_4$ 0,01g; $ZnSO_4$ 0,001g; $MnCl_2$ 0,001g; micélio seco de *Cylindrocladium gracile* 0,5%, 1000 mL de água destilada) (Hsu & Lockwood, 1975).

O micélio seco de *C. gracile* foi obtido pela inoculação de três discos de 8 mm de meio BDA contendo micélio do fungo, em fracos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio BD, e incubado durante sete dias com agitação orbital (150 rpm). Após, o micélio foi filtrado em papel Whatman n° 1 e seco em estufa a 70 °C e então triturado.

Após a incubação das bactérias endofíticas, foi colocado 1 ml de meio de cultura em microtubos e centrifugado por cinco minutos a 14000 rpm.

Para análise da atividade quitinásica e glucanásica foi colocado em tubo de ensaio, 100 μL de amostra (sobrenadante do meio de cultura) e 550 μL de tampão citrato de sódio 50 mg/mL pH 4,8 e, após homogeneização, mantidos em banho-maria a 50 °C. Em seguida, se adicionou 250 μL de quitina coloidal 0,5% para avaliação da atividade quitinásica ou 250 μL de laminarina 0,5% para avaliação da atividade glucanásica, também a temperatura de 50 °C, e então incubados pelo período de 1 h.

Após este período, foi adicionado 1 mL de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico 10,6 g; NaOH 19,8 g; 1416 mL de água destilada, dissolução a quente com posterior adição de 7,6 g de fenol (fundido a 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio), e, ainda no banho-maria, se adicionou 100 μL de glicose 0,5 mg/mL.

Em seguida, a solução foi fervida por 5 min e após resfriar, se acrescentou 2 mL de água destilada, e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a $\lambda = 545 \text{ nm}$.

O controle (branco) consistiu na solução sem a adição de quitina coloidal ou de laminarina à reação. Para determinação da atividade enzimática foi preparada uma curva de calibração com glicose nas concentrações de 0,0, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,3 mg/mL.

Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a liberação de 1 μmol de glicose/mL/min.

3.6.2 Avaliação da atividade proteásica em meio líquido

A determinação da atividade proteásica foi baseada no método de Sarath *et al.* (1989) utilizado Azocaseína (Sigma®) 2% como substrato. As

bactérias endofíticas foram crescidas em meio Mineral, como previamente descrito (Hsu & Lockwood, 1975). Primeiramente, o substrato foi dissolvido em água destilada e centrifugado a 14000 rpm, pelo período de 10 min. Em seguida, em um tubo Eppendorf de 1,5 mL foi colocado 150 μ L da amostra (sobrenadante do meio de cultura), juntamente com 250 μ L de azocaseína, misturado lentamente e então incubado em banho-maria a 25° por 30 min. Após, foi adicionado 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% para cessar a reação, e deixado descansar por 15 min. Decorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, por 5 min. Depois o sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf contendo 1,4 mL de NaOH 1M.

Um branco foi preparado para cada amostra, adicionando-se os mesmos reagentes da reação anterior, mas na seguinte ordem: 1°) 150 μ L de Tampão Fosfato pH 6,2 (solução I: 31,2g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 1000 mL de água destilada; Solução II: 35,6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 1000 mL de água destilada. Solução final: 920 mL da solução I e 80 mL da solução II); 2°) 150 μ L da amostra; 3°) 1,2 mL de ácido tricloroacético; 4°) 250 μ L de substrato; 5°) depois o sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 1,4 ml de NaOH 1M.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a $\lambda = 440$ nm.

Uma unidade da atividade proteásica (U) é definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unidade em 30 min a 25°C., num $\lambda = 440$ nm.

3.7 Detecção de sideróforos em culturas de bactérias endofíticas do eucalipto

Toda a vidraria utilizada para o ensaio foi imersa em HCl 6M por 48 h e enxaguada seguidas vezes em água deionizada.

A detecção quantitativa de sideróforos em cultura de bactérias foi realizada baseado no método universal de Schwyn & Neilands (1987). Os microrganismos a serem testados foram cultivados, por 48 h sob agitação orbital de 150 rpm, em meio tripton-soja (TS). Como controle foi utilizado o meio sem inoculação de bactéria.

O meio de cultura foi centrifugado a 14000 rpm por 20 min, e então retirado uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, ao qual foi misturado 1 mL da solução de cromo azurol S (CAS).

A solução de CAS foi preparada misturando-se 6 mL de solução de HDTMA 10 mM e 30 mL de água. Foram acrescentados sob agitação, 1,5 mL de solução férrica ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM preparada em HCl 0,01N e 7,5 mL de solução de cromo azurol S 2 mM). Separadamente, foram dissolvidos 4,307 g de piperazina anidra em 20 mL de água deionizada, ao qual após dissolvida foi acrescida 6,25 mL de HCl. Esta solução foi adicionada ao restante dos componentes já preparados, e o volume completado para 100 mL.

A mudança de cor da mistura de sobrenadante-indicador de azulada para amarelo-avermelhado no período de 15 min indica a produção de sideróforos pelas bactérias.

3.8 Avaliação de aspectos bioquímicos de microrganismos que podem estar associados à promoção de crescimento vegetal

3.8.1 Produção de ácido indol acético (AIA)

Para o teste de produção de auxina, as bactérias foram inoculadas em meio TS 10% contendo triptofano (triptona, 15 g; peptona de soja, 5 g; triptofano, 1g; NaCl, 8 g; água destilada, 1000 mL; pH, 7,0), e mantida sob agitação por 24 h a 150 rpm/28 °C. Após a incubação, foi retirado uma alíquota de 2 ml de cultura, centrifugado a 4000 rpm/15 min. A 1,5 ml de sobrenadante de cultura foi adicionados 1,5 mL de reagente de Salkowski (FeCl₃ 0.5M, 7,5 ml; H₂SO₄ concentrado 150 mL; água destilada, 250 mL) (Patten & Glick, 2002). Após 20 min de reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro, Ultrospec 3000 Amersham-Pharmacia Biotech) no comprimento de onda de 530 nm.

Para determinação da concentração de AIA foi preparada uma curva de calibração com diferentes concentrações deste composto (0, 2, 4, 10, 16 µg/mL). Três repetições foram usadas para cada tratamento.

3.8.2 Teste de fixação de nitrogênio por bactérias endofíticas de eucalipto

Para o teste de fixação de nitrogênio as bactérias foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura NFb contendo 5 g de ácido málico; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g de NaCl; 0,01 g de CaCl₂.2H₂O; 4 mL de Fe.EDTA (solução 1,64%); 2 mL de azul de bromotimol (0,5%); 2 mL de solução de micronutrientes (0,2 g de Na₂MoO₄.2H₂O; 0,235 g

de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,28 g de H_3BO_3 ; 0,008 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 L de água destilada); 1,75 g/L de ágar; 1 L de água destilada, pH 6,8, incubadas a 28 ± 1 °C e avaliadas após sete dias. A presença de halo de crescimento no interior do meio de cultura é considerada resultado positivo (Kuklinsky-Sobral, 2003).

3.8.3. Teste de solubilização de fosfato por bactérias endofíticas

Para o teste de solubilização de fosfato foi utilizado o meio NBRIP (glicose, 10g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25g; KCl, 0,2g; água destilada, 1000ml; pH, 7,0;) (Nautiyal, 1999), e avaliada a formação de um halo ao redor da colônia bacteriana.

3.9 Avaliação da atividade *in vivo* dos microrganismos endofíticos no controle de doenças e no desenvolvimento de plantas de eucalipto

Os experimentos consistiram de 10 tratamentos, com 25 repetições por tratamento, com cinco blocos inteiramente casualizados.

3.9.1 Testes em mudas de eucalipto em casa de vegetação

3.9.1.1 Inoculação de microrganismos endofíticos em estacas de eucalipto

Vinte e cinco estacas de *Eucalyptus* “urograndis” 4622 foram imersas durante uma hora na suspensão de cada uma das bactérias endofíticas (10^3 UFC/ml), pré-selecionadas para ensaios *in vitro*, e então, plantadas em substrato casca de arroz queimada e vermiculita (1:1), conforme Procópio

(2004). Após 80 dias, mantidas em casa de vegetação foi realizado o reisolamento das bactérias endofíticas em placa de Petri, como descrito no item 6.1.2. e avaliada a frequência de colonização das mudas pelas bactérias endofíticas. A identificação das bactérias foi feita visualmente pelo reconhecimento das características culturais da bactéria inoculada.

Os fragmentos foram retirados e analisados a cada 5 cm do tamanho total da planta, começando-se a partir do colo, para verificar a capacidade de colonização dessas bactérias em cada tratamento, e o controle, que consistiu no isolamento de fragmentos de plantas de eucalipto não inoculadas com bactérias endofíticas.

3.9.1.1.1 Avaliação da ação de bactérias endofíticas sobre o enraizamento e crescimento de mudas de *E. "urograndis"* clone 4622

Vinte e cinco estacas tratadas com endófitos foram plantadas em substrato casca de arroz queimada e vermiculita (1:1). O porcentual de enraizamento, comprimento da maior raiz, comprimento de parte aérea, além de peso seco de parte aérea e do sistema radicular foram avaliados.

No ensaio realizado no período de inverno foi utilizado o Índice de Qualidade de Mudas (IQM), proposto por Dickson (1960). Este índice consiste em:

$$IQM = (PSPA + PSR) / (APA/DP) + (PSPA / PSR), \text{ onde:}$$

PSPA = peso médio seco da parte aérea (g)

PSR = peso médio seco do sistema radicular (g)

APA = Altura média da planta (cm)

DP = Diâmetro médio da planta (mm)

3.9.1.1.2 Avaliação da ação de bactérias endofíticas sobre o controle de fitopatógenos em mudas de *E. "urograndis"*
4622

Vinte e cinco plantas previamente inoculadas com as bactérias endofíticas, como previamente descrito, foram usadas para cada combinação: isolado de bactéria endofítica x fitopatógeno. Como controle negativo foi aspergido solução salina e como controle positivo, um isolado bacteriano que não apresentou efeito inibitório sobre os patógenos em testes *in vitro*.

Os resultados destes ensaios foram expressos pela incidência e severidade das doenças avaliadas, além de tamanho e peso seco de plantas. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo 5 blocos com 5 repetições cada, totalizando 25 repetições por tratamento.

- *Xanthomonas* sp.: As plantas foram inoculadas por aspersão com uma suspensão de *Xanthomonas* sp. contendo 1×10^8 células/mL, após as plantas terem sido mantidas por 3 horas em câmara úmida, como proposto por Neves, 2007.

Após esta inoculação, as plântulas foram avaliadas diariamente quanto ao aparecimento de sintomas típicos da doença. A incidência e severidade foram avaliadas após 20 dias da inoculação da bactéria fitopatogênica.

A incidência foi determinada pela contagem do número de plantas com sintomas de bacteriose foliar, e a severidade avaliada usando a escala

diagramática proposta por Gonçalves (2003), avaliando-se o quarto par de folhas a partir do ápice da planta (ANEXO I).

A desfolha foi avaliada após 30 dias de inoculação do patógeno, como proposto pelo mesmo autor, fazendo-se a contagem do número de folhas das plantas.

- *Cylindrocladium gracile*: Para a inoculação deste patógeno foi preparada uma suspensão de esporos contendo 10^6 esporos/mL e aspergida sobre as plantas, que foram mantidas em câmara úmida por 24 h antes da inoculação.

Após a inoculação, as plantas foram novamente mantidas em câmara úmida durante 15 dias, quando foi feita a avaliação dos resultados.

A incidência foi determinada pela contagem do número de plantas com sintomas de manchas foliares e/ou escurecimento de caule em cada tratamento, e a severidade da doença estimada pelo uso de escala de notas proposta por Grigoletti Júnior *et al.*, 2005, modificada.

A escala de notas determina que:

- classe 0: ausência de sintomas nas plantas;
- classe 1: infecção leve (lesões restritas, sem coalescência de lesões);
- classe 2: infecção média (lesões coalescentes na folha, sem atingir o caule);
- classe 3: infecção severa (lesões coalescentes na folha, atingindo o caule da planta);
- classe 4: infecção muito severa (progressão da doença até o ponteiro da muda).

A severidade foi analisada com base em escala de notas e os dados foram transformados para Índice de Doença, como proposto por McKinney (1923), onde:

$$ID = \frac{\sum(\text{grau da escala} \times \text{freqüência}) \times 100}{(\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})}$$

Botrytis cinerea: Discos de ágar contendo massa micelial e esporos do fungo foram colocados sobre uma folha de cada planta, previamente ferida com perfurador. Os discos de ágar foram fixados à folha com fita adesiva transparente. As plantas foram mantidas em câmara úmidas por 24 h antes da inoculação.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, e a avaliação feita após 21 dias.

A incidência foi determinada pela contagem do número de plantas com sintomas de mofo cinzento em cada tratamento, e a severidade da doença foi estimada pelo uso de escala de notas proposta por (Grigoletti Júnior *et al.*, 2005).

A escala de notas determina que:

- classe 0: ausência de sintomas nas plantas;
- classe 1: infecção leve (lesões restritas, sem coalescência de lesões);
- classe 2: infecção média (lesões coalescentes na folha, sem atingir o caule);
- classe 3: infecção severa (lesões coalescentes na folha, atingindo o caule da planta);

- classe 4: infecção muito severa (progressão da doença até o ponteiro da muda).

A severidade foi analisada com base em escala de notas e os dados foram transformados para Índice de Doença, como proposto por McKinney (1923), onde:

$$ID = \frac{\sum(\text{grau da escala} \times \text{freqüência}) \times 100}{(n^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})}$$

3.10 Análise Estatística

Os valores médios foram analisados usando o programa estatístico SPSS for Windows 16.0. Os valores expressos em porcentagem, como incidência e enraizamento foram transformados para arcoseno \sqrt{x} . Os resultados expressos em valores contínuos que seguiram a normalidade foram analisados por ANOVA, seguidos de post hoc de Tukey 5%, Duncan 5% ou Scott-Knott 5%. O ensaio de taxa de enraizamento foi analisado pela análise binominal 5%, avaliando os tratamentos em relação ao controle.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de microrganismos endofíticos cultiváveis de amostras de *Eucalyptus* “urograndis”

A partir de tecidos saudáveis do híbrido de *Eucalyptus* “urograndis” foi possível isolar bactérias endofíticas. De ramos foi obtida a maior frequência de isolamento de bactérias endofíticas de eucalipto, com 10,6% em relação aos 1,19% de endófitas isoladas de folhas (Figura 1). Algumas espécies de eucalipto parecem ser mais colonizadas por bactérias endofíticas do que outras, como verificado por Procópio (2004), ao constatar que *E. grandis* e *E. pellita* possuem frequências de isolamento de bactérias endofíticas significativamente maiores do que as de *E. citriodora*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis* e *E. torelliana*, além de diferenças também aparecem quando avaliados materiais vegetais coletados em diferentes locais, o que sugere que ocorre variação genética entre as espécies de *Eucalyptus* sp., que podem favorecer ou dificultar a colonização da planta hospedeira pelas bactérias endofíticas. O mesmo autor também encontrou uma baixa frequência de isolamento ao testar um diferente clone de *E. “urograndis”* e sugere que estas diferenças na frequência de isolamento entre as diferentes espécies de

eucalipto ocorram devido à variação nas concentrações de compostos fenólicos e óleos essenciais da planta.

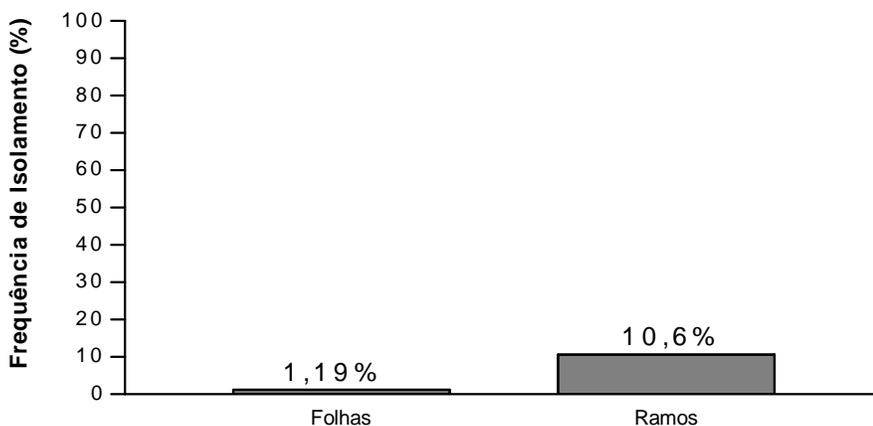


FIGURA 1. Frequência geral de isolamento (%) de bactérias endofíticas em folhas e ramos de *Eucalyptus* “urograndis”. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

Estudos mostrando a distribuição espacial de endófitos dentro das plantas são comuns com fungos (Verma *et al.*, 2007), sendo detectadas colonização preferencial em relação a hospedeiro, tecido, luminosidade, entre outros (Unterseher *et al.*, 2007), podendo diferir até em nível de preferência de área dentro do mesmo tecido (Rodriguez *et al.*, 2009). O mesmo também deve ocorrer com bactérias endofíticas.

Diferentemente do que verificado neste trabalho e por Liu *et al.* (2009) com bactérias endofíticas, folhas são um nicho extremamente colonizado por fungos (Arnold & Lutzoni, 2007), com taxas de colonização tão altas como 53,2% em acículas de *Picea glauca* (Stefani & Berubé, 2006). A localização do endófito na planta deve estar relacionada ao papel que este deve possuir na mesma (Pirtillä *et al.*, 2003).

Dentre o conjunto de microrganismos endofíticos isolados de eucalipto obteve-se 28 isolados de bactérias, que foram agrupados com base na

similaridade morfológica. As bactérias endofíticas foram agrupadas em sete grupos morfológicos (Tabela 1), sendo que o grupo morfológico 1 foi o que obteve a maior frequência de isolamento (39,3%) (Figura 2).

TABELA 1. Bactérias endofíticas de eucalipto, separadas com base em características morfológicas da colônia. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

Grupo morfológico	Características morfológicas da colônia	Isolados
1	Colônia branca, rugosa	EUCB 1, EUCB 2, EUCB 4, EUCB 7, EUCB 10, EUCB 13, EUCB 21, EUCB 24, EUCB 25, EUCB 26, EUCB 28
2	Colônia amarelo claro, lisa	EUCB 3, EUCB 12, EUCB 19, EUCB 20
3	Colônia branca, lisa	EUCB 5, EUCB 6, EUCB 11, EUCB 15, EUCB 18
4	Colônia amarelo escuro, lisa	EUCB 8, EUCB 9
5	Colônia translúcida, com crescimento disperso pela placa e formação de vilosidades nas bordas	EUCB 14, EUCB 22, EUCB 23
6	Colônia marrom, pequena e rugosa	EUCB 16, EUCB 17
7	Colônia rosa claro, lisa, com crescimento por toda a placa.	EUCB 27

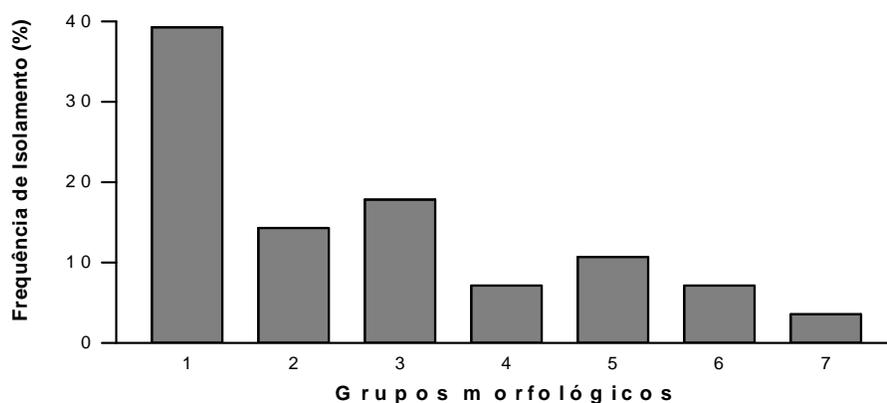


FIGURA 2. Frequência de isolamento de bactérias endofíticas separadas por grupos morfológicos. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

Os isolados bacterianos foram identificados baseados na análise da seqüência parcial do gene 16S rDNA (Tabela 2). Devido a dificuldade de crescimento de alguns isolados (EUCB 16 e 17), perda de viabilidade (EUCB 9 e 19) e falta de complementaridade de seqüências (EUCB 12 e 18), alguns isolados não foram identificados, entretanto, os mesmos são de menor importância visto que não foram selecionados para os ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A espécie bacteriana mais freqüentemente obtida da microbiota endofítica da parte aérea de eucalipto, pelo método de isolamento utilizado, foi *Bacillus subtilis* (47,6%), seguido de *B. pumilus* (14,28%), *Bacillus* sp. e *B. licheniformis* (9,52%) e *Pseudomonas* sp. (4,76%) (Tabela 2). A preponderância de espécies de *Bacillus* também foi verificada em mandioca por Teixeira (2004), entretanto, dentro deste grupo a espécie mais comumente isolada foi *Bacillus cereus*. Espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* têm sido comumente encontradas como endófitas de diversas plantas (Chanway, 1998; Araújo *et al.*, 2002; Monnerat *et al.* 2003; Nunes, 2004).

O uso de *Bacillus* spp. como agentes de controle biológico possui vantagens em relação a outros gêneros de bactérias, como *Pseudomonas* spp., pois podem ser formulados mais facilmente pelo crescimento rápido em meio líquido, ausência de patogenicidade a maioria das espécies (Shoda, 2000), capacidade de formar endósporos tolerantes ao calor e a dessecação, além de serem produtores de uma ampla gama de metabólitos bioativos (Emmert & Handelsman, 1999; Handelsman *et al.*, 1990).

Espécies de *Bacillus* têm sido amplamente estudadas e utilizadas em programas de controle biológico em todo mundo (Melo, 1998; Paz, 2005),

havendo produtos comerciais registrados a base desse microrganismo (Luz, 1996; Kloepper, 1997; Melo, 1998).

A falta de relação entre os grupos morfológicos e a identificação dos isolados (Tabelas 1 e 2) denota a fragilidade do uso de caracteres morfológicos para agrupamento de bactérias, devido a variabilidade genética das mesmas, como também verificado na Figura 3, onde nem sempre isolados da mesma espécie se agruparam.

TABELA 2. Identificação e frequência de isolamento dos isolados bacterianos endofíticos oriundos de *Eucalyptus* "urograndis". Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ/USP), 2009.

Gênero/Espécie	Família	Isolado	Porcentual de isolamento (%)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Pseudomonadaceae	EUCB 3	4,76
<i>Bacillus</i> sp.	Bacillaceae	EUCB 13, EUCB 28	9,52
<i>Bacillus pumilis</i>	Bacillaceae	EUCB 1, EUCB 24, EUCB 27	14,28
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillaceae	EUCB 2, EUCB 4, EUCB 6, EUCB, 7, EUCB 8, EUCB 10, EUCB 15, EUCB 21, EUCB 25, EUCB 26	47,6
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacillaceae	EUCB 5, EUCB 14	9,52

Nos isolamentos da microbiota endofítica de eucalipto foi detectada uma baixa diversidade de espécies (Figura 3), mas este resultado não necessariamente representa a real diversidade de microrganismos endofíticos de *Eucalyptus* spp., pois o método de isolamento (fragmentos) utilizado neste

trabalho seleciona preferencialmente organismos de fácil e rápido crescimento, o que provavelmente inviabilizou o aparecimento de bactérias de crescimento mais lento, como *Methylobacterium* sp., que já foi demonstrada como endófito de eucalipto, quando usado o método da trituração de tecidos (Ferreira *et al.* 2008). A maior diversidade de espécies bacterianas encontradas por este autor também pode advir do fato de que o mesmo isolou endófitos de raízes de eucalipto, e é notório que a distribuição dos microrganismos em uma planta é piramidal, com uma maior diversidade no rizoplano, seguido das raízes, caule e folhas (Elvira-Recuenco & Van Vuurde, 2000; Kuklinski-Sobral *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2007).

Na figura 3, é possível verificar que existe um agrupamento dos isolados endofíticos, em relação às seqüências de espécies-referências, as quais formaram outro agrupamento. Nenhum dos isolados de *B. subtilis* endofíticos de eucalipto se agrupou com a linhagem referência de *B. subtilis* (AB509381) isolado de alimentos fermentados, mas todos ficaram dentro do grande ramo com a estirpe endofítica de trigo *B. subtilis* E1R-j (Liu *et al.*, 2009), o que reforça que as diferenças de nicho são um reflexo da constituição genética, provavelmente devido a adaptações necessárias para a sobrevivência no ambiente endofítico.

A existência de diferenças entre isolados de diferentes habitats, em uma seqüência conservada como o 16S rDNA, denota que devem existir diferenças maiores em regiões menos conservadas no genoma, o que permite a obtenção de marcadores moleculares para diferenciação de isolados, e provavelmente, ao fazer uso de genes como os relacionados aos mecanismos de biocontrole, estes marcadores deverão fazer parte dos métodos rotineiros nas buscas de

agentes promissores de controle biológico (Zhou, 2003; Berg & Hallmann, 2006).

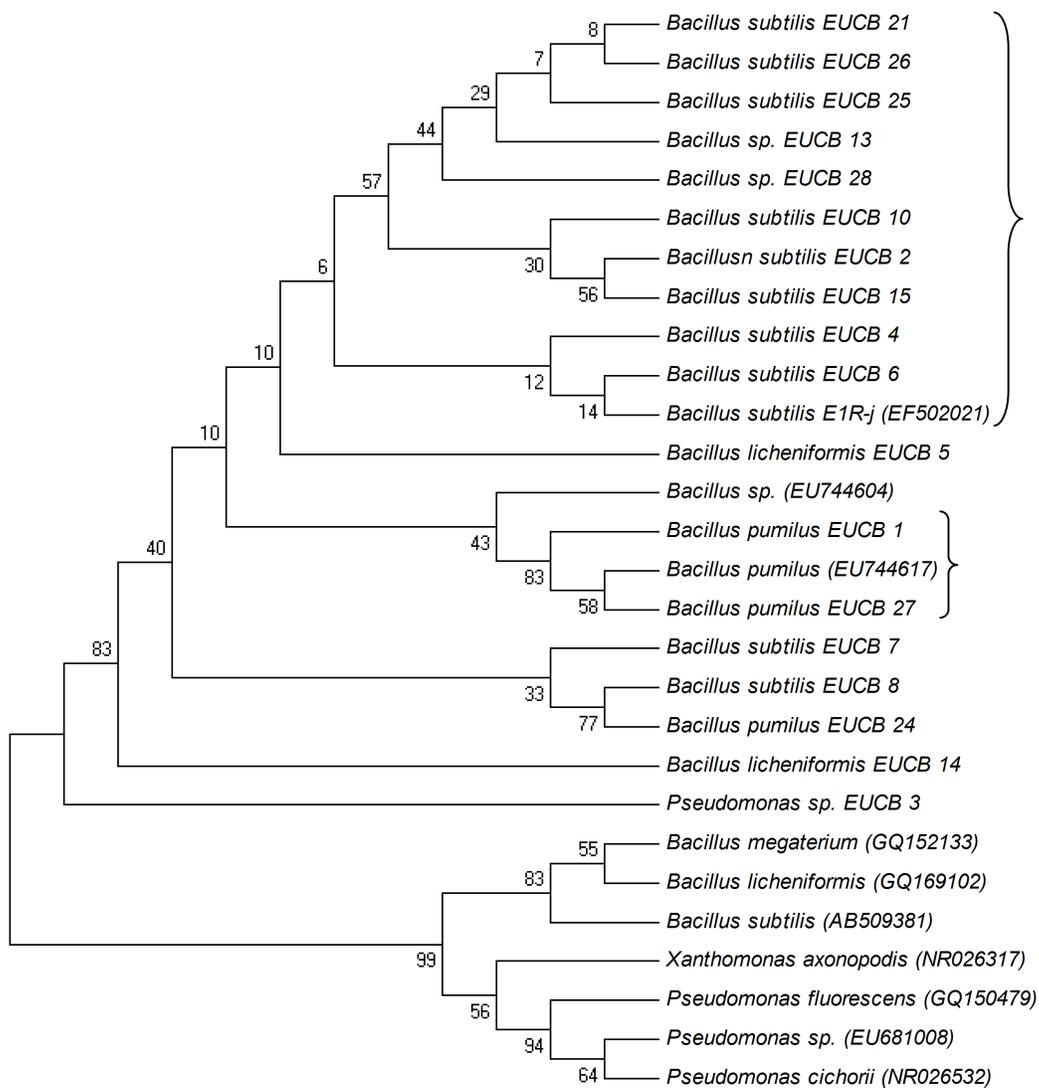


FIGURA 3. Árvore filogenética baseada na homologia da sequência parcial do rDNA 16S. Números em parênteses representam o número de acesso de cada espécie referência no GenBank. O número em cada ramo indica os valores de bootstrap (1000 replicatas). Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ/USP), 2009.

Os isolados de *Bacillus sp.* EUCB 13 e EUCB 28, provavelmente pertencem à *B. subtilis* devido ao agrupamento mais próximos com isolados

identificados deste grupo, de acordo com o resultado do alinhamento. Os isolados de *B. licheniformes* EUCB 5 e 14 divergiram o suficiente para não se agruparem entre si e nem com a espécie referência (GQ169102) (Figura 3). Segundo Di Cello *et al.* (1997) é comum observar uma alta variabilidade genética em microrganismos que possuem capacidade de colonizar diferentes habitats, o que pode explicar a diversidade dentro das diferentes linhagens de *B. subtilis* obtidos neste trabalho.

A alta frequência de isolados endofíticos de eucalipto da família Bacillaceae, também foi obtida por Ferreira (2008), com maior frequência de isolamento total obtida com isolados desta família, quando realizado o isolamento de bactérias endofíticas de raiz de eucalipto. O que mostra que este grupo é adaptado ao ambiente endofítico, e que coloniza sistemicamente a planta hospedeira. Entretanto, parece haver um estabelecimento preferencial de diferentes espécies de *Bacillus* a diferentes locais na planta, visto que *B. subtilis* e *B. licheniformes* isolados de caule e ramos de eucalipto não foram encontrados por Ferreira (2008) como endófito do sistema radicular. Já *B. pumilus* foi isolado de parte aérea nesse trabalho e detectado na microbiota endofítica de raízes por Ferreira (2008). Interessante notar que este autor ao avaliar a diversidade do rizoplane de eucalipto não encontra *B. pumilus*, e sugere que esta espécie possa ser transmitida verticalmente. Mas, quando Ferreira *et al.* (2008) avaliaram a diversidade de bactérias endofíticas de sementes de diferentes espécies de *Eucalyptus* não foi encontrado *B. pumilus*, portanto, com este resultado e a presença de *B. pumilus* na parte aérea de *Eucalyptus* “urograndis” concluímos que esta bactéria deve usar estômatos e hidatódios como porta de entrada para o ambiente endofítico.

4.2 Isolamento de microrganismos fitopatogênicos de mudas de *E. urograndis* clone 4622

A partir de isolamentos em plantas com sintomas de doenças em viveiros florestais, obteve-se *Xanthomonas* sp., agente causal da bacteriose foliar, *Cylindrocladium gracile*, agente causal de canela preta e manchas foliares e *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento.

Os requisitos do postulado de Kock foram preenchidos para todos os microrganismos acima citados, o que demonstrou serem eles mesmos os agentes causais dos sintomas.

Os fungos fitopatogênicos foram identificados com base em caracteres morfológicos (Ferreira, 1989; Aparecido *et al.*, 2008).

Para a bactéria *Xanthomonas* sp. foi realizado o teste de hipersensibilidade em fumo, sendo que a inoculação do mesmo levou a necrose dos tecidos da área infiltrada em 24h, o que demonstrou a sua patogenicidade. A avaliação da produção de xantomonadina foi realizada, e o isolado produziu pigmento com perfil espectrofotométrico característico de *Xanthomonas* sp (Lelliot & Stead, 1987).

4.3 Avaliação do antagonismo direto entre bactérias endofíticas isoladas de eucalipto e microrganismos fitopatogênicos do eucalipto

Os ensaios *in vitro* visaram selecionar isolados de bactérias endofíticas com potencial antagonista para posterior avaliação no controle de doenças quando aplicadas em plantas de eucalipto.

4.3.1 Avaliação do potencial inibitório de bactérias endofíticas sobre o crescimento de *Xanthomonas* sp.

Existem poucos trabalhos utilizando bactérias endofíticas no controle de *Xanthomonas* sp. (Wuff *et al.*, 2002; Carrer Filho *et al.*, 2008), e este trabalho é inédito na busca de agentes de controle biológico de *Xanthomonas* sp., patogênica a eucalipto.

Dentre os 28 isolados de bactérias endofíticas de eucalipto avaliadas, 11 (42,8%) foram capazes de formar halo de inibição de crescimento de *Xanthomonas* sp. *in vitro* (Figura 4), e portanto, estas foram retestadas para confirmação de seu potencial antagônico (Figura 6).

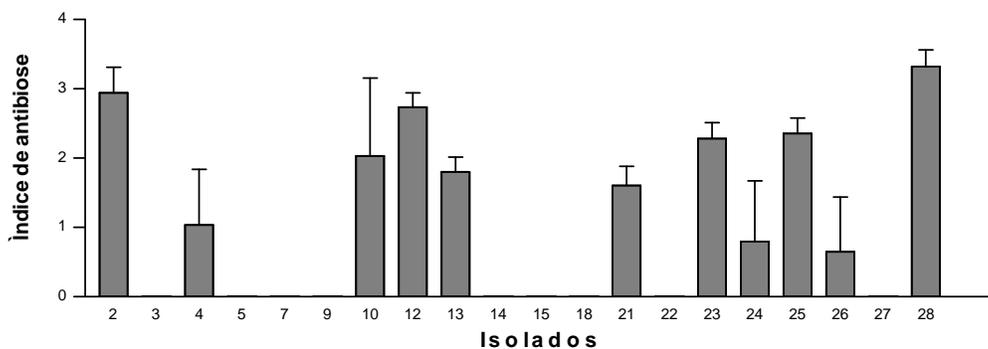


FIGURA 4. Índice de antibiose de *Xanthomonas* sp. quando desafiadas com bactérias endofíticas. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

A produção de metabólitos difusíveis inibitórios a bactérias fitopatogênicas *in vitro*, é um importante indicador da atividade *in vivo* do antagonista. Diversos trabalhos associam a capacidade de inibição de bactérias *in vitro* à capacidade de biocontrole *in vivo*. Os isolados que produziram os maiores halos de inibição da bactéria fitopatogênica foram *Bacillus pumilis* EUCB 1, bactéria não identificada EUCB 23 e *Bacillus* sp. EUCB 28 (Figura 5 e 6).

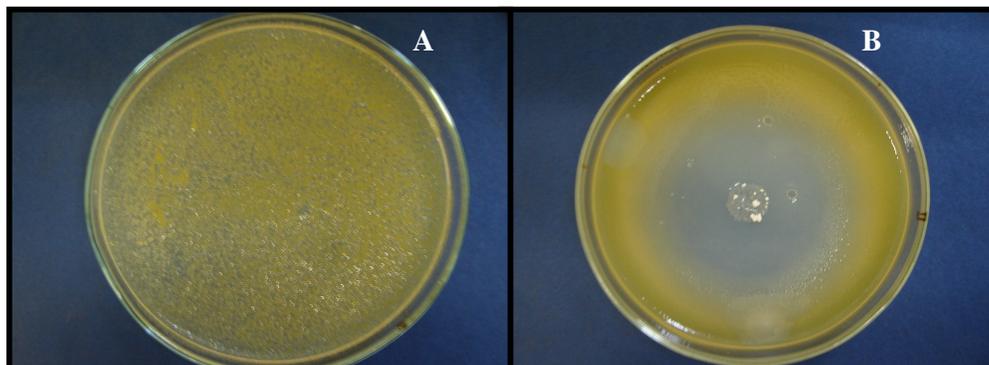


FIGURA 5. Inibição de *Xanthomonas* sp., por isolado de bactéria endofítica de eucalipto. A. Controle, B. *Bacillus* sp. EUCB 28. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

Cunha *et al.* (2006) ao testarem a atividade inibitória de bactérias rizosféricas e antibióticos sobre algumas bactérias patogênicas a eucalipto (*Pseudomonas cichorii* e *Rhizobium* sp.) obteve bons resultado com estirpes de *B. subtilis*, sendo que um isolado inibiu mais as bactérias fitopatogênicas que os antibióticos avaliados.

Carrer Filho *et al.* (2008), não obtiveram halos de inibição quando avaliaram a ação do actinomiceto rizosférico *Nocardioides thermolilacinus* sobre *X. vesicatoria* e *Pseudomonas syringae*, entretanto, quando avaliado a microbiota endofítica de batata, 29% dos isolados foram antagônicos ao isolado de *Xanthomonas campestris* testado (Sessitsch *et al.*, 2004), número inferior ao obtido na microbiota endofítica de eucalipto (42,8%), o que sugere haver uma seleção de microrganismos endofíticos a ser mantidos no interior da planta, em relação a pressão de patógenos.

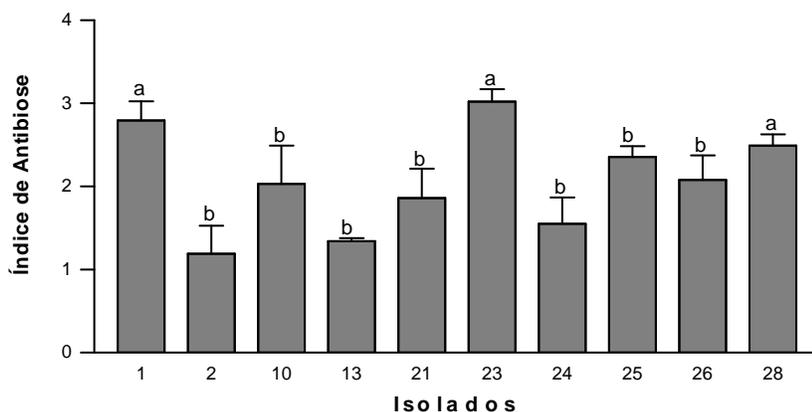


FIGURA 6. Índice de antibiose de *Xanthomonas* sp. quando desafiadas com bactérias endofíticas, expressas pelo índice de antibiose. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

4.3.2 Avaliação da inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos quando desafiados com bactérias endofíticas isoladas de eucalipto

Em relação ao controle dos fungos fitopatogênicos testados, *Botrytis cinerea* e *Cylindrocladium gracile*, vários isolados bacterianos foram capazes de reduzir drasticamente o crescimento micelial dos patógenos avaliados, sendo 13 isolados (61,9%) antagonistas à *B. cinerea* e 15 (71,4%) à *C. gracile* (Figuras 7, 8 e 9). Estes índices de isolamento de antagonistas são bastante superiores ao obtido por Procópio (2004), ao também isolar e testar bactérias endofíticas de eucalipto contra *Cylindrocladium scoparium* e *B. cinerea*, com obtenção de 13,6% de isolados efetivos na inibição desses patógenos.

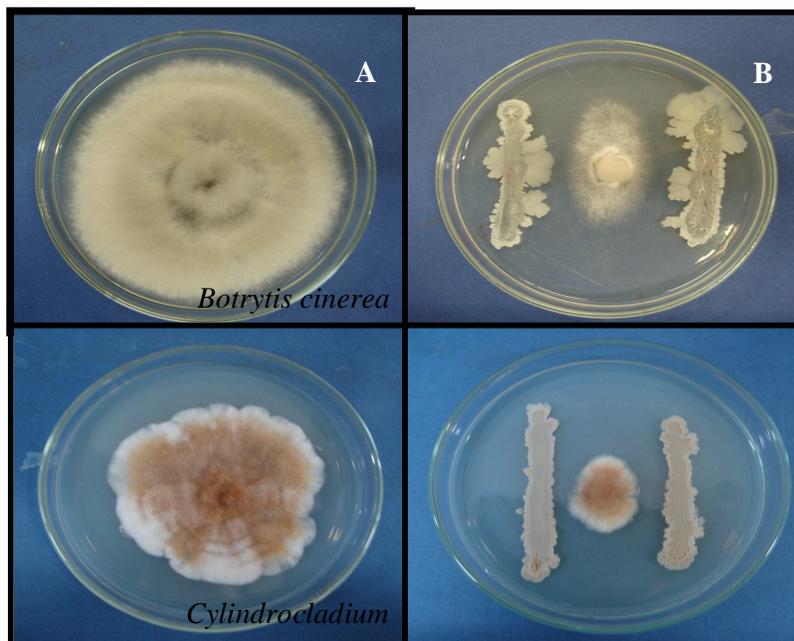


FIGURA 7. Inibição *in vitro* de *Botrytis cinerea* e *Cylindrocladium gracile* por isolados de bactérias endofíticas de eucalipto. Controles (esquerda), Bactérias endofíticas (direita). Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

De uma forma geral, os isolados bacterianos mais inibitórios ao crescimento dos fungos testados foram *B. subtilis* EUCB 2, *B. subtilis* EUCB4, *B. subtilis* EUCB 7, *B. subtilis* EUCB 10, *Bacillus* sp. EUCB 13, *B. subtilis* EUCB 15, bactéria não identificada EUCB 18, *B. subtilis* EUCB 21, *B. subtilis* EUCB 25, *B. subtilis* EUCB 26 e *Bacillus* sp. EUCB 28, com uma taxa de inibição de 66,6% no crescimento de *B. cinerea* e *C. gracile*, em relação ao controle (Figura 8 e 9).

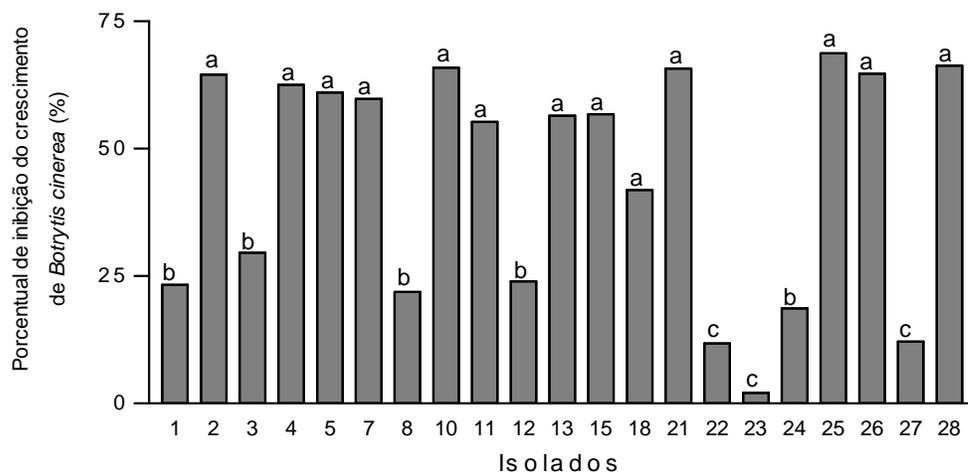


FIGURA 8. Porcentual de inibição do crescimento micelial médio de *Botrytis cinerea* quando desafiadas com bactérias endofíticas. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

B. subtilis já foi descrito como agente promissor de biocontrole de *Cylindrocladium* sp., reduzindo o crescimento do patógeno em até 78% *in vitro*, como registrado por Gomes *et al.* (2001).

A atividade antagonística *in vitro* de bactérias sobre *B. cinerea* isolado de videira e de morangos já foi descrito (Trotel-Aziz *et al.*, 2008; Essgaier *et al.*, 2009). A frequência de isolados de bactérias endofíticas de eucalipto antagonistas a *B. cinerea* obtida neste trabalho (46,42%) foi maior do que o dobro de bactérias isoladas de ambientes halofílicos (20,2%) (Essgaier *et al.*, 2009). O mesmo também foi verificado quando comparado com bactérias endofíticas de soja, onde Senthilkumar *et al.* (2009) obtiveram somente 6,56% de antagonistas à fungos fitopatogênicos.

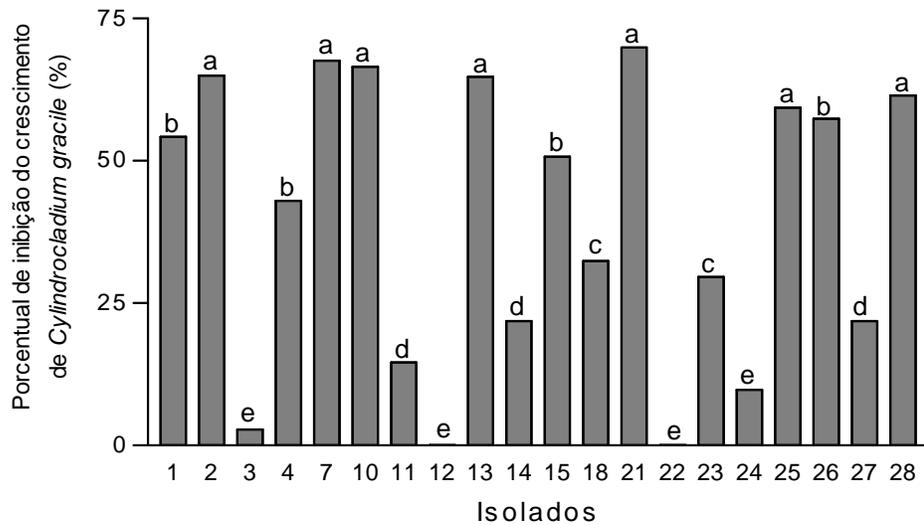


FIGURA 9. Porcentual de inibição de *Cylindrocladium gracile* quando desafiado com bactérias endofíticas. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

Bactérias possuem diferentes mecanismos que podem resultar na inibição de fungos, tais como a produção de compostos inibitórios, de enzimas relacionadas ao micoparasitismo, competição por espaço e nutrientes, entre outros (Neto *et al.*, 2002; Paz, 2005; Maki, 2006).

4.4 Seleção de bactérias endofíticas do eucalipto para ensaios de promoção de enraizamento, crescimento de plantas e controle de doenças *in vivo*

Baseado nos resultados dos ensaios anteriores de inibição de fitopatógenos e produção de AIA *in vitro* (FIGURA 10) foi feito uma seleção dos isolados mais promissores para controle de doenças e promoção de crescimento de eucalipto.

Um fator importante a ser avaliado quando da inserção de um microrganismo em um sistema é a sua interação com a planta hospedeira, tanto quanto a interação com os fitopatógenos.

As auxinas são hormônios vegetais relacionados à diferenciação radicular e divisão celular, e, portanto são fatores-chave no enraizamento de plantas. Visto que o eucalipto clonal, objeto de estudo deste trabalho, é propagado por estaquia, a produção de hormônios que estimulem o enraizamento é de suma importância. Portanto, a produção da auxina ácido indol acético (AIA) foi avaliada para auxiliar na seleção de isolados de bactérias endofíticas que possam atuar em diferentes frentes na qualidade de mudas de eucalipto, ou seja, tanto na promoção de crescimento quanto no controle de doenças.

Dentre o conjunto de bactérias endofíticas avaliadas, cinco isolados produziram as maiores concentrações de AIA em meio líquido, *B. pumilis* EUCB 1, bactéria não identificada EUCB 18, *B. subtilis* EUCB 25, *B. subtilis* EUCB 26 e *B. pumilis* EUCB 27 (Figura 10).

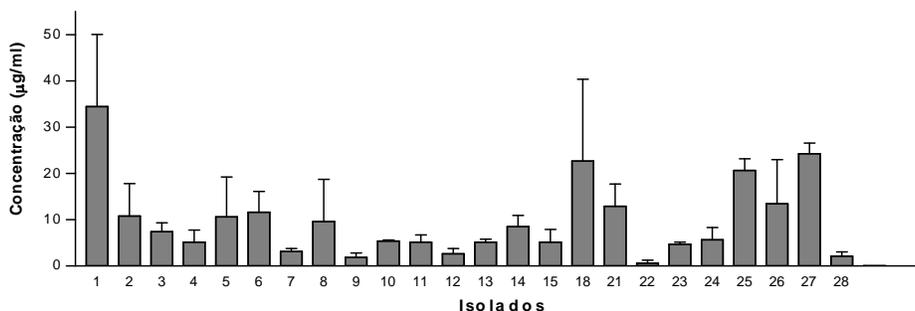


FIGURA 10. Produção de ácido indol acético ($\mu\text{g/ml}$) por bactérias endofíticas de eucalipto. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

Dos 28 isolados testados, oito foram selecionados pelo acúmulo de características de interesse deste trabalho (EUCB 1, EUCB 2, EUCB 10, EUCB 13, EUCB 21, EUCB 25, EUCB 26 e EUCB 28) e um isolado foi selecionado para servir como controle positivo por demonstrar neutralidade nas interações avaliadas (EUCB 3) para avaliações da atividades dessas bactérias endofíticas *in vivo*, como visualizados na Tabela 3.

TABELA 3. Quadro comparativo da atividade inibitória sobre fitopatógenos e da produção de AIA dos diferentes isolados de bactérias endofíticas do eucalipto. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

Isolado	<i>Xanthomonas</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Cylindrocladium</i>	AIA	Pontuação final
<i>B. pumilis</i> EUCB 1	2	1	2	2	7
<i>B. subtilis</i> EUCB 2	1	2	2	1	6
<i>Pseudomonas</i> sp. EUCB 3	0	1	0	1	2
<i>B. subtilis</i> EUCB 4	0	2	1	1	4
<i>B. licheniformis</i> EUCB 5	0	2	-	1	3
<i>B. subtilis</i> EUCB 6	-	-	-	1	1
<i>B. subtilis</i> EUCB 7	0	2	2	1	5

Continuação. TABELA 3. Quadro comparativo da atividade inibitória sobre fitopatógenos e da produção de AIA dos diferentes isolados de bactérias endofíticas do eucalipto. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

<i>B. subtilis</i> EUCB 8*	-	1	-	1	2
EUCB 9*	0	-	-	1	1
<i>B. subtilis</i> EUCB 10	1	2	2	1	6
EUCB 11*	-	2	1	1	4
EUCB 12*	2	1	0	1	4
<i>Bacillus</i> sp. EUCB 13	1	2	2	1	6
<i>B. licheniformis</i> EUCB 14	0	-	1	1	2
<i>B. subtilis</i> EUCB 15	0	1	1	1	3
EUCB 16*	-	-	-	-	-
EUCB 17*	-	-	-	-	-
EUCB 18*	0	2	1	1	4
EUCB 19*	-	-	-	-	-
EUCB 20*	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 21	1	2	2	1	6
EUCB 22*	0	0	0	1	1
EUCB 23*	2	0	1	1	4
<i>B. pumilis</i> EUCB 24	1	1	0	1	3
<i>B. subtilis</i> EUCB 25	1	2	1	1	5
<i>B. subtilis</i> EUCB 26	1	2	1	1	5
<i>B. pumilis</i> EUCB 27	0	0	0	1	1
<i>Bacillus</i> sp. EUCB 28	2	2	1	1	6

*Bactérias não identificadas.

* A pontuação seguiu o seguinte critério, foi dada a pontuação 0 para isolados não produtores/inibidores, 1 para isolados que produziram/inibiram, mas sem diferença significativa do controle e, 2 para aqueles que produziram/inibiram com diferença significativa do controle.

Entre os isolados bacterianos provenientes do isolamento a partir de tecidos de eucalipto, 60% apresentavam algum grau de antagonismo a algum dos patógenos testados. De acordo com Berg & Hallmann (2006), a porcentagem de organismos antagonistas isolados depende da espécie da planta hospedeira, infestação de patógenos, habitat e fase fenológica da

planta, podendo essa frequência de isolamento de antagonistas variar de 0% (Sessitsch *et al.*, 2004) a altas porcentagens, como a obtida neste trabalho.

4.6 Ensaio *in vivo* para avaliação da ação das bactérias endofíticas sobre a propagação, promoção de crescimento e biocontrole de alguns fitopatógenos de importância em viveiros florestais

4.6.1 Taxa de enraizamento e promoção de crescimento de plantas de *Eucalyptus "urograndis"* por bactérias endofíticas

Dentre os isolados testados, *B. subtilis* EUCB 10 foi o único isolado que aumentou significativamente a taxa de enraizamento (96,2%). *B. subtilis* EUCB 21 com 93% e *B. pumilis* EUCB 1 com 92,9% de enraizamento mostraram uma tendência na melhoria da taxa de enraizamento, em relação ao controle que obteve 89,4% de plantas enraizadas (Figura 11).

Os isolados *B. subtilis* EUCB 2, *B. subtilis* EUCB 25, *B. subtilis* EUCB 26 e *Bacillus* sp. EUCB 28 atuaram negativamente sobre o enraizamento, visto que plantas tratadas com estes isolados obtiveram taxas menores que a do tratamento controle, sendo respectivamente, 81,2, 77, 79,8 e 75,7% (Figura 11).

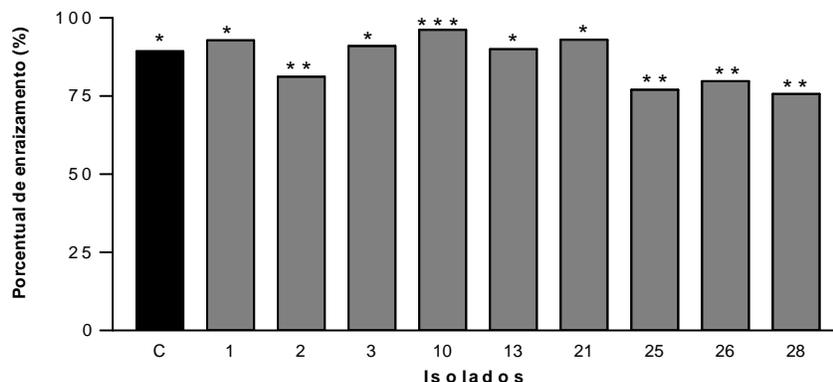


FIGURA 11. Porcentual de enraizamento de plantas de eucalipto tratadas com bactérias endofíticas de eucalipto, após 30 dias de inoculação. Barras seguidas de números iguais de asteriscos não diferiram do controle, pelo teste binominal 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008.

Quando avaliado o crescimento médio das plantas, verificou-se que plantas tratadas com o isolado *Bacillus* sp. EUCB 13 apresentavam o maior comprimento de parte aérea, entretanto, o maior efeito das bactérias ocorreu no sistema radicular, com um acréscimo de 24,8% no comprimento da raiz principal de plantas tratadas com *Bacillus* sp. EUCB 13 e *B. subtilis* EUCB 21, diferindo significativamente do controle ($p < 0,05$), (Figura 12). A promoção de crescimento de plantas inoculadas com bactérias do gênero *Bacillus* já foi descrita por diversos autores (Wang *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2009).

A maior ação das bactérias endofíticas no sistema radicular, provavelmente está relacionada a produção de auxinas pelos isolados. Shi *et al.* (2009) encontraram uma relação positiva entre produção de AIA e tamanho e peso fresco de raízes, com concentrações ótimas para crescimento radicular de beterraba açucareira entre 31,23 e 39,12 $\mu\text{g/mL}$ de AIA, em cultura.

Assim, como no ensaio de enraizamento, os isolados *B. subtilis* EUCB 25, *B. subtilis* EUCB 26 e *Bacillus* sp. EUCB 28 reduziram o tamanho médio de

plantas, mostrando que ocorreu uma interação negativa entre esses isolados e a planta (Figura 12). Este comportamento também foi verificado por Dias *et al.* (2009) quando avaliou a promoção de crescimento de morangueiros tratados com bactérias endofíticas e por Procópio (2004) ao avaliar este efeito sobre mudas de eucalipto.

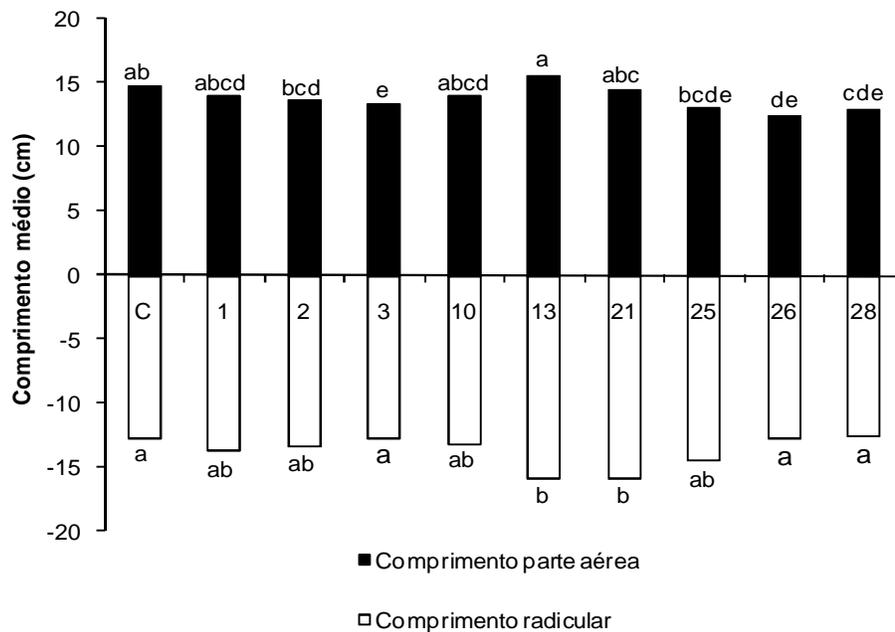


FIGURA 12. Tamanho médio de sistema radicular e parte aérea de plantas tratadas com bactérias endofíticas de eucalipto, após 30 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008.

Assim como esperado, as plantas tratadas com *Bacillus* sp. EUCB13 e *B. subtilis* EUCB 21 que apresentaram maior tamanho médio, também tiveram peso seco maior, principalmente no peso radicular (Tabela 4).

TABELA 4. Peso seco (g) de plantas de eucalipto tratadas com bactérias endofíticas após 30 e 80 dias após a inoculação. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

Isolado	Peso seco (g)*			
	Parte aérea		Sistema radicular	
	30 dias	80 dias	30 dias	80 dias
Controle	3,290b	7,359a	0,594b	2,901a
<i>B. pumilis</i> EUCB 1	3,595b	5,184b	0,732a	2,199b
<i>B. subtilis</i> EUCB 2	3,417b	5,244b	0,548b	2,136b
<i>Pseudomonas</i> sp. EUCB 3	2,825c	2,505c	0,584a	1,38c
<i>B. subtilis</i> EUCB 10	3,296b	7,702a	0,731a	3,03a
<i>Bacillus</i> sp. EUCB 13	4,130c	6,129a	0,806a	2,76a
<i>B. subtilis</i> EUCB 21	3,415b	5,808b	0,714a	2,925a
<i>B. subtilis</i> EUCB 25	3,432b	7,26a	0,873a	2,55a
<i>B. subtilis</i> EUCB 26	2,593c	1,965c	0,436b	0,63c
<i>Bacillus</i> sp. EUCB 28	2,685c	3,915b	0,542b	1,611c

*Valores dentro da mesma coluna, seguidas por letras iguais não diferiram entre si, pelo teste de Scott-Knott 5%.

Plantas tratadas com *B. subtilis* EUCB 10 tinham significativamente mais folhas por planta, em relação ao controle (Figura 13). O número de folhas por planta é uma característica indicativa da qualidade de mudas de eucalipto, pois, mudas com mais folhas geralmente sofrem menos o impacto do plantio no campo.

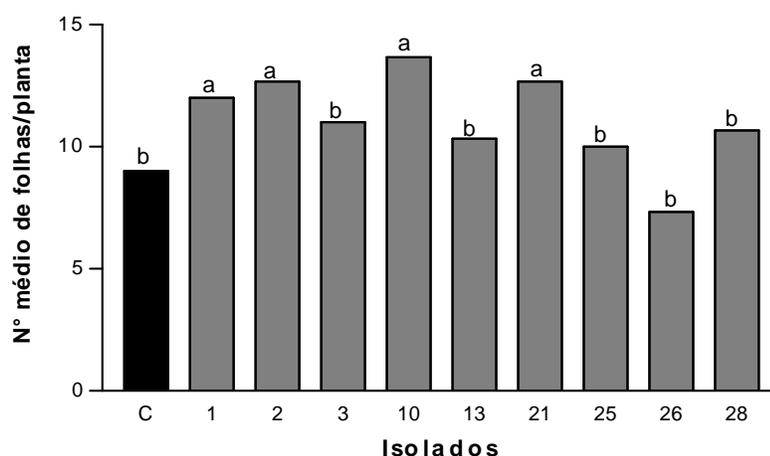


FIGURA 13. Número médio de folhas por plantas tratadas com bactérias endofíticas de eucalipto, após 80 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008.

Após 80 dias do estaqueamento em casa de vegetação, nenhum dos isolados bacterianos testados atuou de forma positiva e significativa no tamanho médio das mudas, mesmo *B. subtilis* EUCB 10 tendo produzido plantas maiores (Figura 14) e com os maiores valores de peso seco de sistema radicular e parte aérea (Tabela 4).

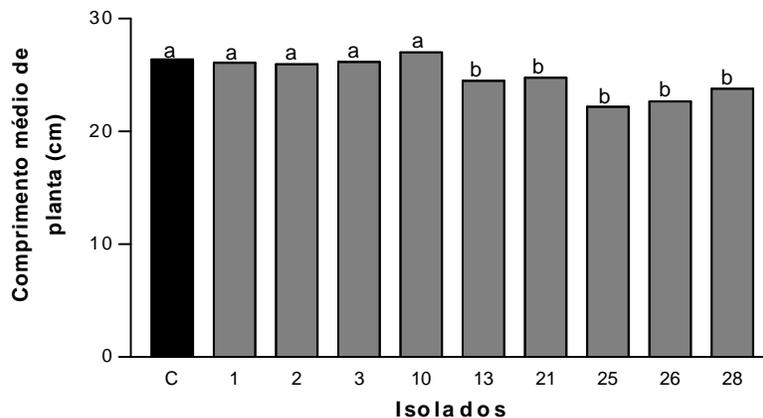


FIGURA 14. Tamanho médio de parte aérea de plantas tratadas com bactérias endofíticas de eucalipto, após 80 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008.

A promoção de crescimento de plantas por bactérias endofíticas pode ser mediada por diferentes mecanismos como a produção de fitohormônios, sideróforos, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, ou via atividade enzimática, como a supressão do etileno pela ACC desaminase (Berg & Hallmann, 2006).

As plantas de eucalipto parecem responder ao AIA produzido pelas bactérias, e a concentração deste parece ser um fator crítico principalmente no enraizamento. Uma concentração reduzida, assim como uma excessiva produção de AIA pelas bactérias podem atuar negativamente na diferenciação radicular, pela baixa concentração do hormônio indutor, ou pela conversão do

excesso de AIA em etileno pela enzima ACC desaminase, levando a parada no crescimento da planta, o que parece ter ocorrido com o tratamento *B. subtilis* EUCB 26, que produziu a maior concentração de AIA em meio de cultura (Figura 14) e as plantas inoculadas com esse isolado apresentaram o menor peso seco de raiz (Tabela 4). Uma correlação negativa entre produção de AIA por bactérias endofíticas de *Solanum nigrum* e crescimento de raízes foi verificada por Long *et al.* (2008).

Baseado nos resultados deste trabalho com a bactéria endofítica *B. subtilis* EUCB 10 que apresentou a maior taxa de enraizamento e o maior peso seco de sistema radicular, a concentração ótima de AIA produzida por bactérias endofíticas para indução de raízes de eucalipto provavelmente gira em torno de 25µg/ml (Figura 15), valor acima da concentração ótima para indução de raízes em *S. nigrum* (Long *et al.*, 2008).

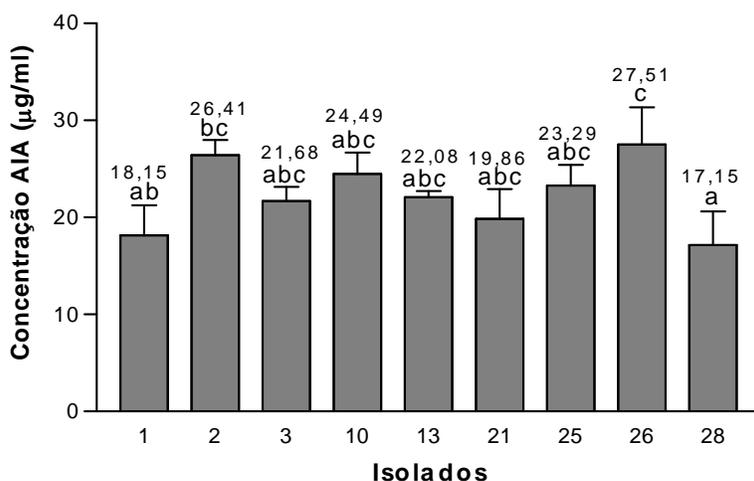


FIGURA 15. Produção de ácido indol acético (µg/ml) por bactérias endofíticas de eucalipto. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Duncan 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

Assim como a produção de hormônios vegetais, existem outros mecanismos associados a promoção de crescimento vegetal, como a solubilização de fosfato indisponível e a fixação biológica de nitrogênio (Long *et al.*, 2008). Entre os endófitos testados, isolados como *B. subtilis* EUCB 10, EUCB 25, EUCB 26 e *Bacillus* sp. EUCB 28 mostraram a capacidade de agir dessas duas formas (Tabela 5). Entretanto, não foi possível relacionar esses mecanismos ao acréscimo no tamanho médio e peso seco das plantas inoculadas, exceto para o isolado *B. subtilis* EUCB 10. Já Procópio (2004) ao testar diferentes isolados de bactérias endofíticas de eucalipto não encontrou nenhum que tivesse alguma dessas atividades.

Não foi verificada uma relação entre a fixação biológica de nitrogênio e a biomassa da parte aérea das plantas tratadas como esperado, visto que uma maior disponibilidade de nitrogênio resulta numa maior alocação de carbono na parte aérea, principalmente para as folhas, com conseqüente aumento de biomassa (Fichtner *et al.*, 1995).

TABELA 5. Avaliação qualitativa da capacidade de solubilização de fosfatos e da fixação biológica de nitrogênio por bactérias endofíticas de eucalipto. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.

Tratamento	Solubilização de fosfato	Fixação biológica de nitrogênio
Controle	-	-
<i>B. pumilis</i> EUCB 1	+	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 2	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. EUCB 3	-	+
<i>B. subtilis</i> EUCB 10	+	+
<i>Bacillus</i> sp. EUCB 13	-	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 21	-	+
<i>B. subtilis</i> EUCB 25	+	+
<i>B. subtilis</i> EUCB 26	+	+
<i>Bacillus</i> sp. EUCB 28	+	+

- = ausência da produção; + = formação de halo de degradação/crescimento

A variabilidade de atividades apresentadas entre os isolados bacterianos testados permite deduzir que nem todos os microrganismos vivendo no habitat endofítico são simbiontes que necessariamente produzirão compostos bioativos para a proteção e crescimento da planta hospedeira, mesmo sendo todos obtidos do mesmo genótipo de *E. urograndis*. Diferenças na especificidade entre rizobactérias isoladas de *Pinus taeda*, inoculadas em diferentes espécies de *Pinus* mostraram haver uma especificidade em nível de espécie de planta hospedeira, visto que o tratamento de sementes de *P. oocarpa*, *P. eliotii* e *P. caribaea* var. *hondurendis* com as estirpes de rizobactérias obtidas de *P. taeda* não obtiveram incremento significativo no crescimento dessas mudas, diferente dos resultados significativamente positivos obtidos quando da aplicação de alguns isolados em sementes de *P. taeda* (Brunetta *et al.*, 2007).

4.7 Avaliação da ação antagonística de bactérias endofíticas sobre as doenças causadas por *Xanthomonas* sp., *Cylindrocladium gracile* e *Botrytis cinerea*, em ensaios em casa de vegetação

4.7.1. Avaliação da ação de bactérias endofíticas do eucalipto sobre a bacteriose foliar do eucalipto

A ação das bactérias endofíticas sobre as plantas inoculadas com *Xanthomonas* sp. foi avaliada pela incidência e severidade da doença, e ainda, pelo tamanho da muda e desfolha causada pelo patógeno.

A incidência e a severidade da bacteriose foliar não foram modificadas significativamente pela inoculação de bactérias endofíticas (Figuras 16 e 17).

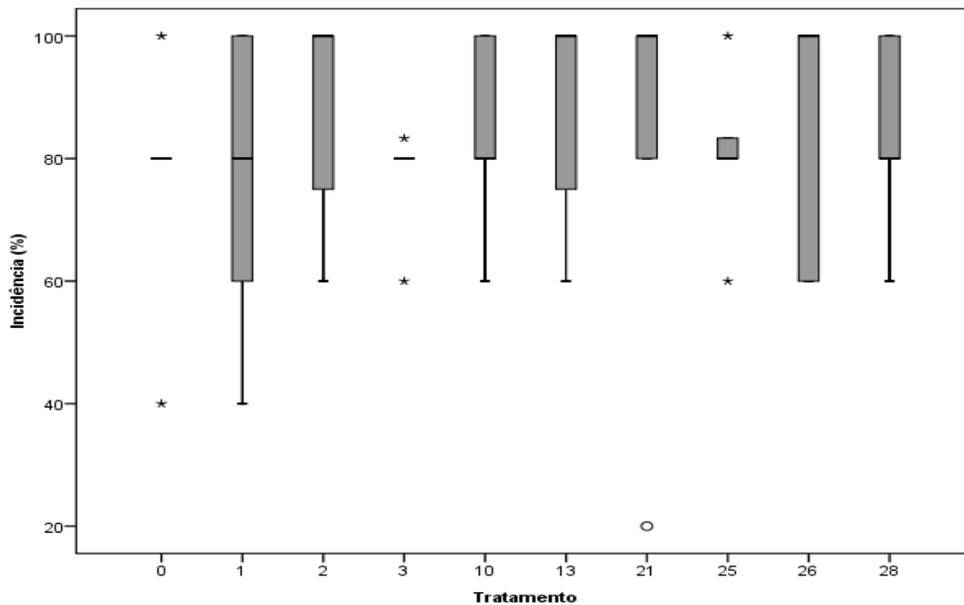


FIGURA 16. Incidência de bacteriose foliar (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação de *Xanthomonas* sp. Teste de Scott-Knott $p > 0,05$. Linha no Box indica o valor da mediana. Linha superior do Box representa o quartil superior (75%). A linha inferior do Box representa o quartil inferior (25%). As linhas externas ao Box representam os percentis superior (95%) e inferior (5%). Os pontos representam os valores extremos da distribuição. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

Mas, em relação à severidade pode ser visualizada a proteção de plantas quando pré-inoculadas com os isolados *B. pumilis* EUCB 1, *B. subtilis* EUCB 10, *B. subtilis* EUCB 21 e *Bacillus* sp. EUCB 28 (Figura 17).

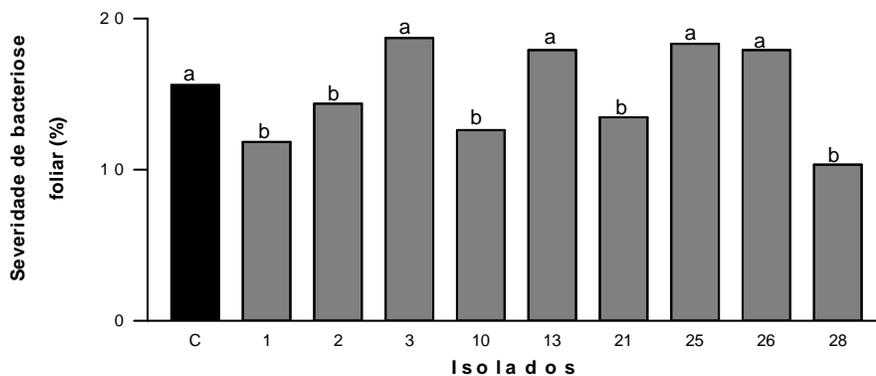


FIGURA 17. Severidade da bacteriose foliar (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação de *Xanthomonas* sp. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

B. pumilus EUCB 1 juntamente com *Bacillus* sp. EUCB 28 foram os isolados que obtiveram as menores severidades da bacteriose foliar do eucalipto, seguido por *B. subtilis* EUCB 10 e 21 (Figura 17). Redução de severidade de doenças causadas por bactérias fitopatogênicas já foi relatada com isolados endofíticos de *B. pumilus* de tomateiro e pimentão, no controle da pinta bacteriana do tomate, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, onde dos 53 isolados de bactérias endofíticas testados, mais de 50% dos isolados eficazes na redução da doença foram identificados como *B. pumilus* (Silva *et al.*, 2008).

O controle de doenças de plantas causadas por bactérias é problemático nos mais diversos patossistemas, portanto, a redução da severidade do ataque de *Xanthomonas* sp. em plantas inoculadas com bactérias endofíticas, é de grande importância, pois surge como uma alternativa ao produtor, levando a diminuição das perdas.

A redução de doenças de plantas causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* sp. por bactérias endofíticas já foi descrito, como na redução da

podridão negra das crucíferas, por um isolado endofítico de *Bacillus subtilis* (Wulff *et al.*, 2002), e também por bactérias rizosféricas no controle de *X. vesicatoria* (Ji *et al.*, 2006) e bactérias do gênero *Pseudomonas* sp., no controle de *Xanthomonas citri* (Khodakaramian *et al.*, 2008), mostrando que o uso de bactérias, agentes de controle biológico pode ser uma alternativa no manejo de doenças de plantas incitadas por bactérias.

O número médio de folhas apresentando sintomas de bacteriose foliar foi reduzido significativamente quando as plantas foram tratadas com EUCB 1, seguido de EUCB 21 e EUCB 10 (Figura 18).

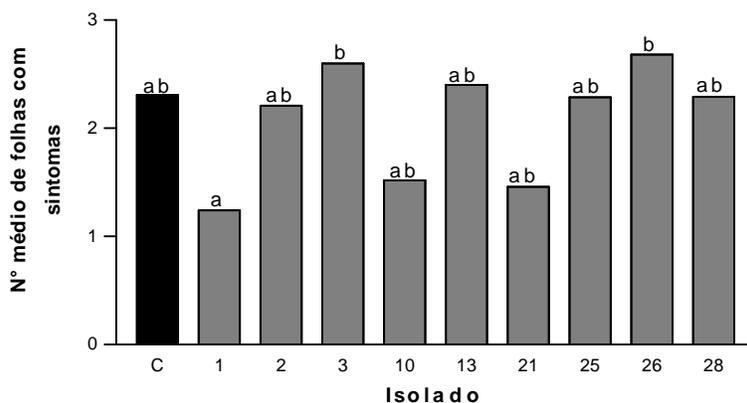


FIGURA 18. Número médio de folhas com sintomas de bacteriose foliar em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação de *Xanthomonas* sp. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

4.7.2 Avaliação da ação inibitória de bactérias endofíticas sobre o fungo *Botrytis cinerea* em ensaios de casa de vegetação

A incidência de mofo cinzento foi reduzida significativamente em plantas tratadas com os isolados de *B. subtilis* EUCB 10 e EUCB 25, em mais de 50% em relação ao controle (FIGURA 19). A severidade, avaliada pelo índice de

doença de Mckinney, também foi reduzida significativamente nas plantas tratadas com a bactéria endofítica *B. subtilis* EUCB 10 (FIGURA 20).

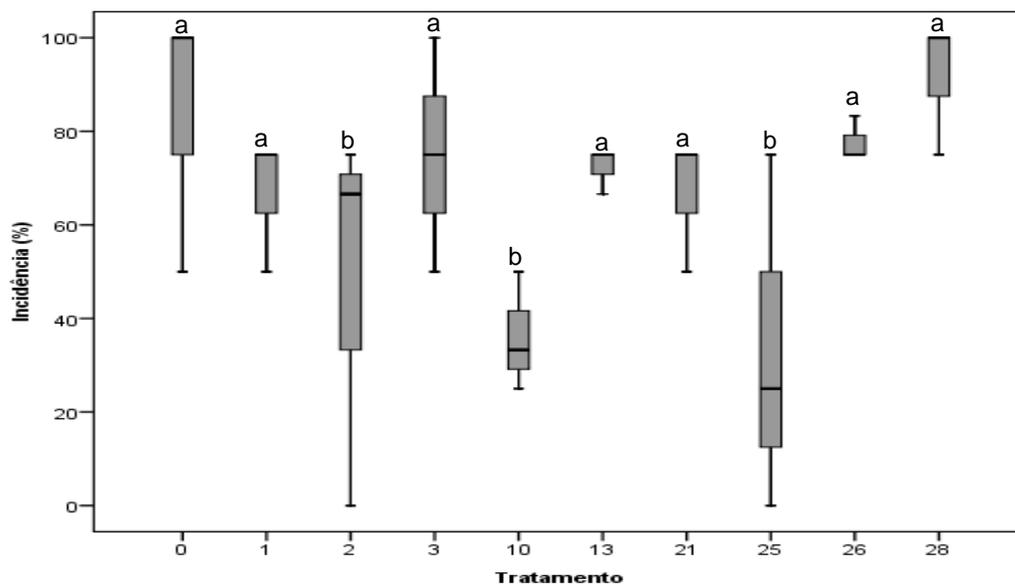


FIGURA 19. Incidência de manchas de *Botrytis cinerea* (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 21 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Linha no Box indica o valor da mediana. Linha superior do Box representa o quartil superior (75%). A linha inferior do Box representa o quartil inferior (25%). As linhas externas ao Box representam os percentis superior (95%) e inferior (25%). Os pontos representam os valores extremos da distribuição. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

A efetividade de isolados de *B. subtilis* no controle de *B. cinerea* já foi descrita no patossistema tomate-*B. cinerea*, com redução de cerca de 50% na severidade da doença (Wang et al. 2009), e sobre folhas de videira por agentes de controle biológico bacterianos (Trotel-Aziz et al., 2008).

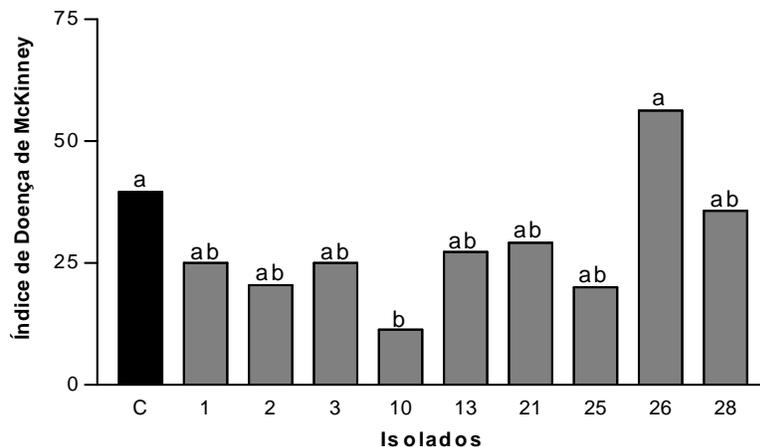


FIGURA 20. Severidade de mofo cinzento (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 21 dias de inoculação de *Botrytis cinerea*. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

Leifert *et al.* (1995) atribui a inibição de *B. cinerea* à produção de antibióticos peptídicos por *B. subtilis*, visto que mutantes para esses compostos perdiam essa atividade.

Assim como nos resultados obtidos com o número de folhas (Figura 21), não foi verificado um efeito positivo no tamanho de plantas inoculadas com bactérias endofíticas (Figura 22).

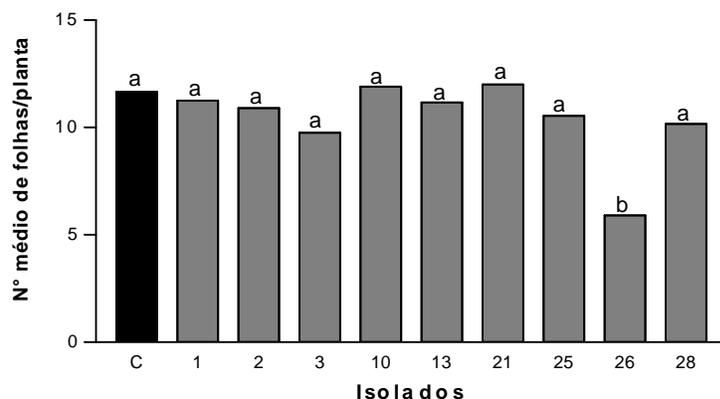


FIGURA 21. Número médio de folhas por plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 21 dias de inoculação de *Botrytis cinerea*. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

A interação *Botrytis cinerea* x *B. subtilis* EUCB 26 em plantas de eucalipto foi significativamente negativa, visto que neste tratamento houve redução tanto da formação de folhas quanto do tamanho da planta (Figuras 21 e 22). Interações variáveis entre bactérias endofíticas e plantas hospedeiras já foram registradas, como referido por Benchimol *et al.* (2000) que obtiveram alguns resultados positivos e outros negativos ao testarem oito isolados de bactérias endofíticas obtidas de plântulas de pimenteira-do-reino, em relação ao controle de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* e a promoção de crescimento vegetal.

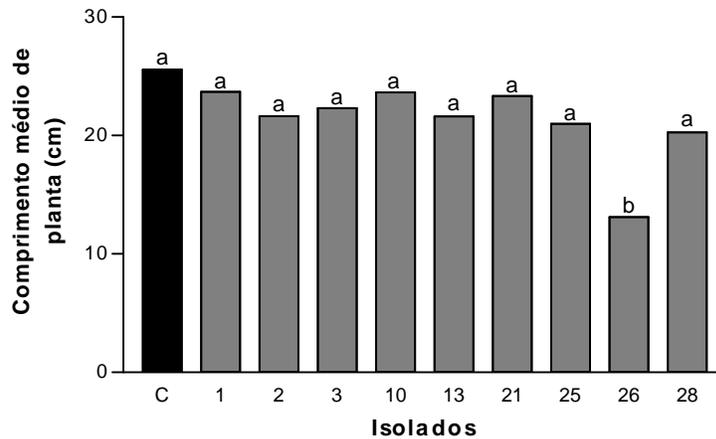


FIGURA 22. Comprimento médio de parte aérea (cm) de plantas de *Eucalyptus* "urograndis" tratadas com bactérias endofíticas e desafiadas com *Botrytis cinerea*. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

4.7.3 Avaliação da ação inibitória de bactérias endofíticas sobre o fungo *Cylindrocladium gracile*

A ocorrência de plantas mostrando sintomas, como escurecimento do caule e manchas foliares típicas de *C. gracile* foi reduzido significativamente em plantas pré-inoculadas com a bactéria endofítica *B. subtilis* EUCB 10. Entretanto, mesmo não havendo diferença significativa em relação ao controle, plantas tratadas com os isolados de *Bacillus* sp. EUCB 13 e EUCB 28 mostraram-se menos suscetíveis à doença (Figura 23).

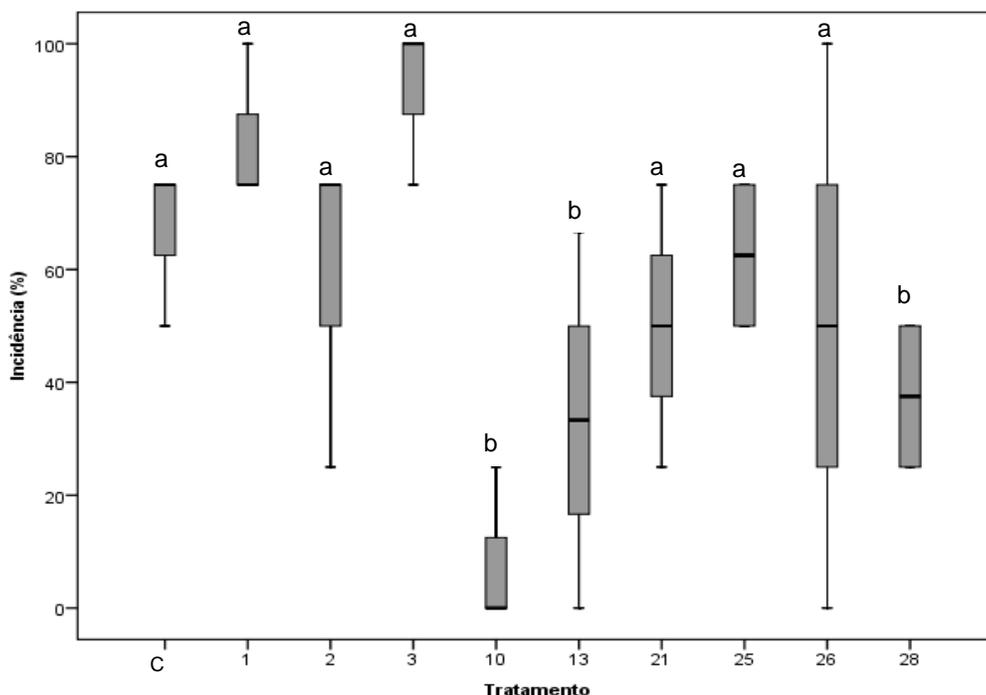


FIGURA 23. Incidência de mancha de *Cylindrocladium gracile* (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Linha no Box indica o valor da mediana. Linha superior do Box representa o quartil superior (75%). A linha inferior do Box representa o quartil inferior (25%). As linhas externas ao Box representam os percentis superior (95%) e inferior (25%). Os pontos representam os valores extremos da distribuição. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

A severidade da mancha de *C. gracile* foi reduzida em plantas tratadas com *B. subtilis* EUCB 10, *Bacillus* sp. EUCB 13 e *Bacillus* sp. EUCB 28 (Figura 24). Plantas inoculadas com *B. subtilis* EUCB 26 tiveram uma maior severidade deste patógeno. O aumento da severidade da doença em plantas tratadas com bactérias endofíticas já foi registrado em outros patossistemas (Benchimol *et al.*, 2000).

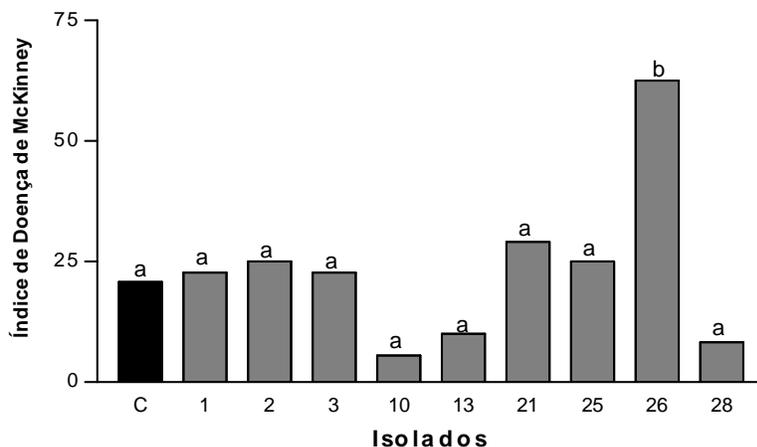


FIGURA 24. Severidade de sintomas de *Cylindrocladium gracile* (%) em plantas tratadas com bactérias endofíticas. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

O ataque de um patógeno geralmente vai culminar com a menor produção de biomassa foliar, o que leva a redução da fotossíntese, e conseqüentemente, o enfraquecimento da planta.

A redução na incidência e severidade de *C. gracile* em plantas tratadas com *B. subtilis* EUCB 10 se relaciona aos resultados de número de folhas, visto que as plantas tratadas com esse isolado são as que possuem mais folhas, e as plantas tratadas com *B. subtilis* EUCB 26 são as que possuem menos folhas (Figura 25). Este resultado mostra a variabilidade existente dentro da mesma espécie de bactéria, pois dentro desse mesmo grupo obteve-se o melhor e o pior resultado no controle do patógeno, denotando a importância de que os processos de seleção de agentes de biocontrole e promoção de crescimento ocorram em nível de isolado e não de espécies.

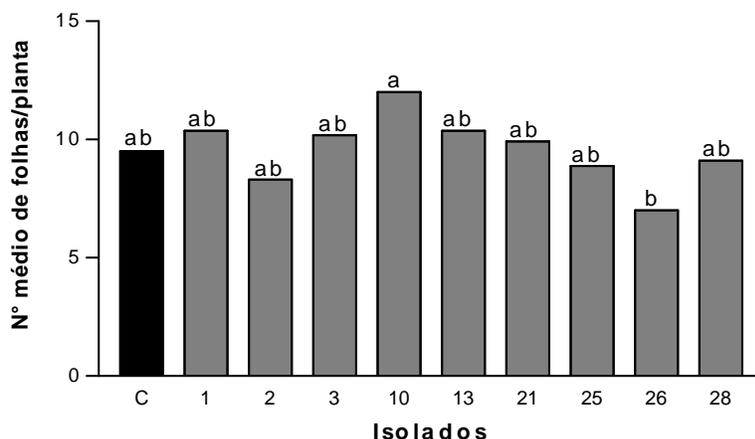


FIGURA 25. Número médio de folhas por plantas tratadas com bactérias endofíticas, após 15 dias de inoculação de *Cyindrocladium gracile*. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

Plantas tratadas com o isolado *Pseudomonas* sp. EUCB 3 apresentaram maior número de folhas com sintomas de *C. gracile*, cabe ressaltar que este isolado foi utilizado como controle positivo, sendo uma bactéria que não mostrou ação inibitória *in vitro*. O isolado *B. subtilis* EUCB 10 foi o que apresentou maior proteção às plantas (Figura 26).

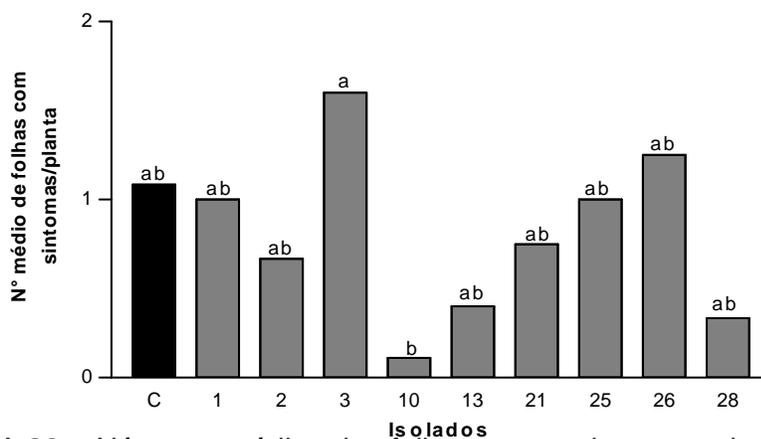


FIGURA 26. Número médio de folhas com sintomas de manchas de *Cyindrocladium* em plantas tratadas com bactérias endofíticas, 15 dias após inoculação. Barras seguidas de mesma letra, não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

4.8. Reisolamento de bactérias endofíticas de plantas de eucalipto pré-inoculadas

Bactérias endofíticas foram reisoladas de todos os tratamentos avaliados, inclusive do controle, onde inicialmente não foi inoculado bactérias, sendo que estas provavelmente já estavam colonizando a miniestaca que deu origem a muda, ou então eram bactérias que estavam no substrato e conseguiram penetrar e colonizar a planta. Baseado nos resultados do reisolamento pode-se verificar que existe um maior índice de colonização na base da muda, do colo da planta até cerca de 15 cm de altura. Após, começa a haver uma redução na população de bactérias endofíticas, sendo que em fragmentos analisados retirados da porção de 25 a 35 cm, praticamente não haviam mais bactérias colonizando o interior da planta (Figura 27). A redução da densidade de bactérias das raízes para as folhas já foi descrita (Poon *et al.*, 1977; Wulf *et al.*, 2003; Liu *et al.*; 2009), entretanto, ainda não existem explicações para este fenômeno. Um deslocamento de nicho parece provável, pois foi comprovado que existe uma relação inversa entre populações de bactérias e fungos endofíticos, como verificado com as altas freqüências de isolamento de fungos em folhas e baixa em caule e ramos, e os resultados inversos ocorrem com as bactérias.

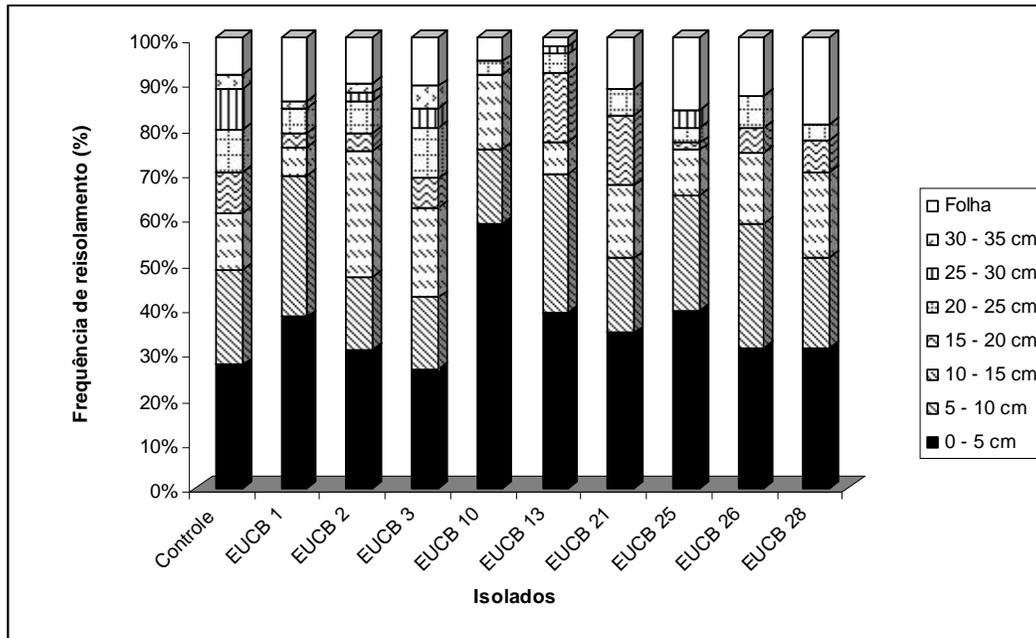


FIGURA 27. Frequência de reisolamento de bactérias endofíticas de plantas de *Eucalyptus* "urograndis", após 80 dias de inoculação. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

O isolado *B. subtilis* EUCB 10, bactéria mais efetiva no controle de doenças e na promoção de crescimento no presente trabalho, colonizou basicamente a região basal da muda de eucalipto, alcançando até 15 cm da muda, o que sugere que o controle biológico mediado por bactérias endofíticas pode ocorrer devido a indução de resistência na planta hospedeira, como sugerido por Ji *et al.* (2006), com a redução da severidade de manchas bacterianas quando a rizobactéria promotora de crescimento de plantas *Pseudomonas syringae* Cit7 foi inoculada via semente e raízes de tomate. Já Liu *et al.* (2009) sugere que a colonização de raízes de trigo por um isolado endofítico de *Bacillus subtilis* reduziu a severidade do mal-do-pé do trigo causado por *Gaeumannomyces graminis*, devido as alterações significativas na

hifa do patógeno causadas pelas células bacterianas, como degeneração e necrose do citoplasma do patógeno.

4.9 Avaliação da atividade da bactéria endofítica *Bacillus subtilis* EUCB 10 em casa de vegetação, durante o período de inverno no Rio Grande do Sul

Após a seleção do isolado *B. subtilis* EUCB 10 como o mais promissor para uso no enraizamento e controle de doenças em estacas de *E. urograndis* clone 4622, o mesmo foi utilizado no mesmo tipo de experimento, diferindo apenas pelo aumento no número de repetições (5 blocos com 50 repetições cada) e por ter sido realizado durante o inverno.

O inverno é um período crítico em viveiros florestais devido à redução do metabolismo vegetal, que culmina com uma diminuição na velocidade de enraizamento das estacas e uma maior suscetibilidade a doenças, aumentando as perdas para o viveirista. Devido a essa problemática, foi programado esse experimento para estudar o comportamento das plantas inoculadas com a bactéria endofítica nesse período do ano.

Estacas tratadas com a bactéria *B. subtilis* EUCB 10, assim como no ensaio realizado no verão, obtiveram uma taxa de enraizamento (78,8%) significativamente maior do que o tratamento controle (68%) (Figura 28). O gráfico mostrando a dinâmica temporal do processo de enraizamento, o qual foi avaliado pela área abaixo da curva de enraizamento, permite visualizar que até a sétima semana após o plantio ambos os tratamentos mostram um comportamento similar, ocorrendo a partir de então um aumento na taxa de

plantas enraizadas no tratamento com a bactéria, em relação ao não tratado (Figura 28).

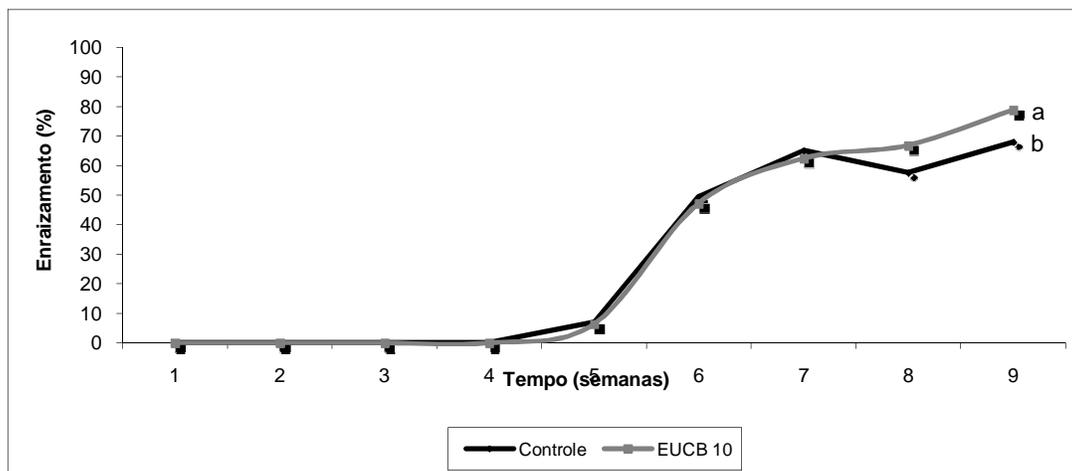


FIGURA 28. Dinâmica temporal do enraizamento (%) de estacas de *Eucalyptus* “urograndis” tratado com *Bacillus subtilis* EUCB 10, representadas. Linhas seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knot 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008.

Além do enraizamento, diversos outros aspectos da muda podem ser beneficiados pela inoculação de microrganismos, como tamanho de muda e índices associados à severidade de doenças.

A mortalidade de estacas, nas condições normais de viveiro, ocorreu basicamente devido a *B. cinerea* e *Rhizoctonia solani*, e foi verificada uma tendência de proteção de mudas de *E. “urograndis”* quando inoculadas com *B. subtilis* EUCB 10. O enraizamento de mudas de *Eucalyptus*, no período de inverno é lento devido à redução do metabolismo das plantas. A extensão do período das estacas na casa de vegetação para enraizamento aumenta a probabilidade da ocorrência de patógenos, visto que as condições ótimas de enraizamento são também ótimas para a ocorrência de doenças (temperatura amena e alta umidade), portanto, qualquer redução na incidência e/ou severidade de doenças, mesmo que não significativa estatisticamente, como

registrado neste trabalho (Figura 29) é de grande importância, visto que viveiros florestais trabalham em números da ordem de milhares de estacas/dia.

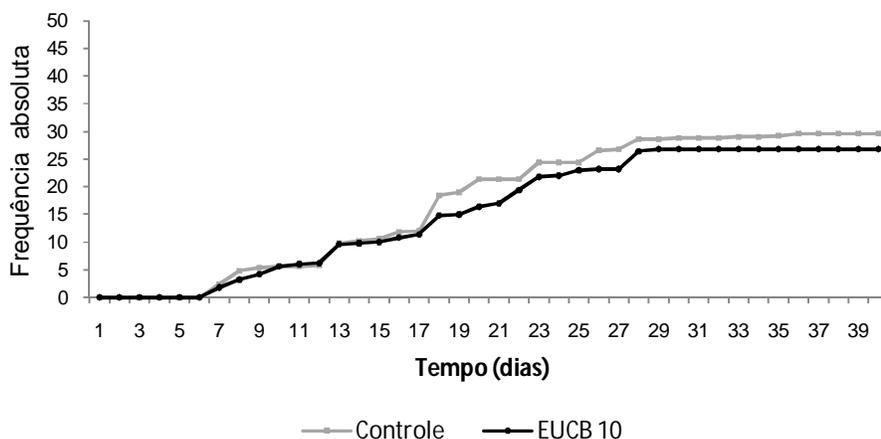


FIGURA 29. Mortalidade absoluta de estacas de *Eucalyptus* “urograndis” quando tratadas com *Bacillus subtilis* EUCB 10, representada como área abaixo da curva de progresso da doença. Tecnoplanta Florestal, 2008.

Vários caracteres das mudas tratadas foram avaliados, e na grande maioria deles houve um efeito positivo nas plantas inoculadas com *B. subtilis* EUCB 10 (Tabela 6).

TABELA 6. Parâmetros relacionados a qualidade de mudas de *Eucalyptus* “urograndis” quando tratado com *Bacillus subtilis* EUCB 10. Tecnoplanta Florestal, 2008.

Caráter	Tratamento	
	Controle	<i>Bacillus subtilis</i> EUCB 10
Altura média das plantas (cm)	29,64 a	29,94 a
Peso seco médio da parte aérea (g)	1,19 a	1,48 b
Peso seco médio do sistema radicular (g)	0,57 a	0,751 b
Diâmetro médio do caule (mm)	3,59 a	3,86 b
Número médio de folhas	9,58 a	10,68 b

Uma melhor visualização dos efeitos positivos da aplicação da bactéria endofítica nas estacas pode ser obtida pelo uso do Índice de Qualidade de Mudas (IQM), proposto por Dickson (1960) (Figura 30). Este índice pondera vários parâmetros da planta, como altura, peso seco de parte aérea e do sistema radicular, além do diâmetro do caule, para dar uma visão geral da qualidade da muda, considerando no cálculo o vigor e o equilíbrio da biomassa da muda (Brunetta *et al.*, 2007).

Segundo Fonseca *et al.* (2002) havendo semelhança entre os ambientes nos quais são desenvolvidas as mudas, o Índice de Dickson é um bom indicador de qualidade. Usando este parâmetro, no experimento realizado durante o inverno foi verificado uma melhoria significativa da qualidade geral das mudas tratadas com o isolado de *B. subtilis* EUCB 10, em relação ao controle (FIGURA 30).

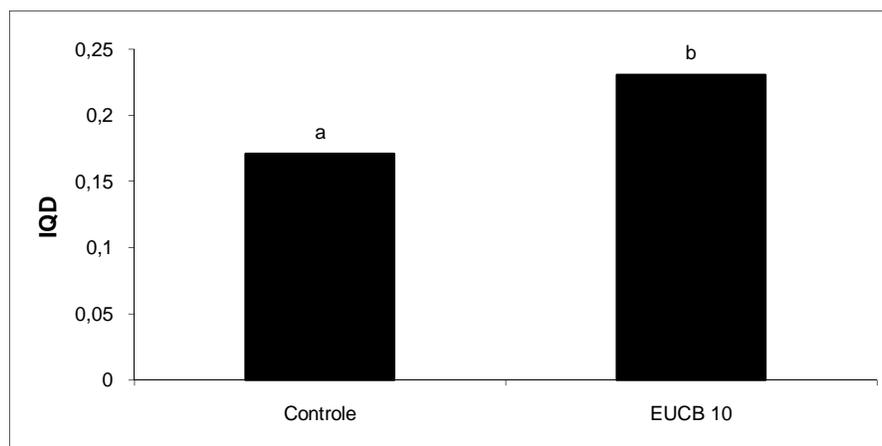


FIGURA 30. Índice de Qualidade de mudas de Dickson em mudas tratadas com a bactéria endofítica *Bacillus subtilis* EUCB 10. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008.

A bacteriose foliar foi um parâmetro selecionado e avaliado ao final do experimento, para demonstrar a capacidade protetora da bactéria endofítica. O comportamento verificado foi o mesmo do ensaio realizado no verão, não sendo constatada diferença significativa na incidência de bacteriose, e somente havendo uma proteção significativa na severidade dos mesmos (Figura 31).

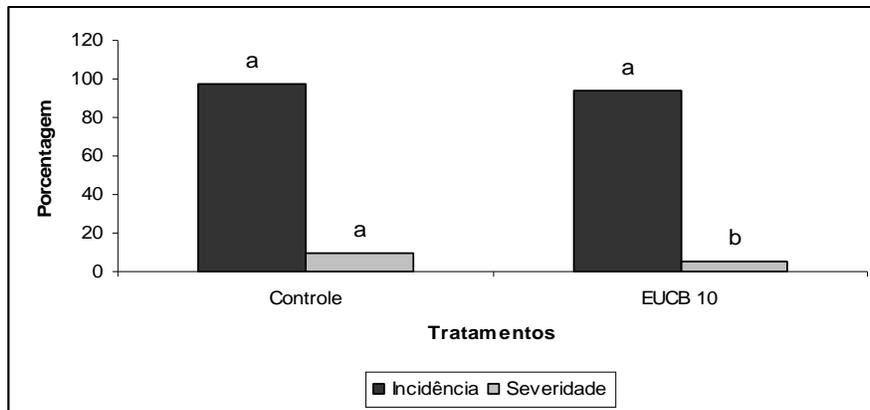


FIGURA 31. Incidência e severidade (%) de bacteriose foliar em plantas tratadas com *Bacillus subtilis* EUCB 10. Barras de mesma cor, seguidas de letras diferentes não diferiram significativamente pelo teste de Tukey 5%. Tecnoplanta Florestal, 2008.

4.9 Avaliação de mecanismos bioquímicos usados por bactérias endofíticas de eucalipto relacionados a inibição de fitopatógenos

4.9.1 Avaliação da produção de enzimas relacionadas ao micoparasitismo e sideróforos por bactérias endofíticas de eucalipto

Todos os isolados de bactérias endofíticas produziram enzimas relacionadas ao controle biológico de fitopatógenos (Tabela 7).

Nenhum isolado produziu sideróforos em cultura (Tabela 7), o que indica que este não é um mecanismo de biocontrole utilizado por esses agentes, ou então de que esses compostos foram produzidos em concentrações baixas, o que impediu a sua detecção. Este mesmo comportamento foi verificado com bactérias endofíticas de eucalipto por Procópio (2004). Bactérias endofíticas de soja, potenciais agentes de biocontrole de *Rhizoctonia bataticola*, também não são produtoras de sideróforos, como detectado por Senthilkumar *et al.* (2009).

As bactérias endofíticas avaliadas não são produtoras de sideróforos, pois a análise foi repetida, o que pode ser uma característica de espécies florestais, pois o mesmo comportamento foi detectado em isolados de fungos e bactérias endofíticas de espécies florestais (Dahm *et al.*, 2003).

TABELA 7. Atividade enzimática (U) de quitinases, glucanases e proteases e produção de sideróforos em culturas de bactérias endofíticas de eucalipto. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2008.

Isolado	Atividade Enzimática (U)			Sideróforo
	Quitinase*	Glucanase*	Protease*	
<i>B. pumilis</i> EUCB 1	397,5a	368,3a	0,092b	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 2	434,6ab	540,7b	0,070ab	-
<i>Pseudomonas</i> sp. EUCB 3	457,2b	381,6a	0,087b	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 10	432,0ab	368,3a	0,181c	-
<i>Bacillus</i> sp. EUCB 13	397,5 ^a	373,6a	0,060ab	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 21	441,2b	396,2a	0,077ab	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 25	397,5 ^a	372,3 ^a	0,047a	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 26	441,2b	380,3a	0,111a	-
<i>Bacillus</i> sp. EUCB 28	438,6b	384,2a	0,155c	-

* Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a liberação de 1 μ mol de glicose/mL/min

** Uma unidade da atividade proteásica (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unid/30 min, a 440 nm e a 25°C.

- = ausência de produção

Os resultados obtidos com a atividade quitinásica e glucanásica não permitiram fazer uma relação entre a produção dessas enzimas e o controle de fitopatógenos, seja fungo ou bactéria. A falta de relação entre essas enzimas e os resultados de controle de *Xanthomonas* sp. já era esperado, visto que quitina e β -glucanos, substratos dessas enzimas, são constituintes típicos de parede celular fúngica (Figura 32).

A atividade proteásica pôde ser relacionada à redução da severidade da bacteriose foliar, e também na diminuição da incidência e severidade dos dois patógenos fúngicos testados, *B. cinerea* e *C. gracile*, visto que a maior produção de proteases foi a da bactéria *B. subtilis* EUCEB 10, que atuou negativamente sobre esses patógenos (Figuras 32, 33 e 34)

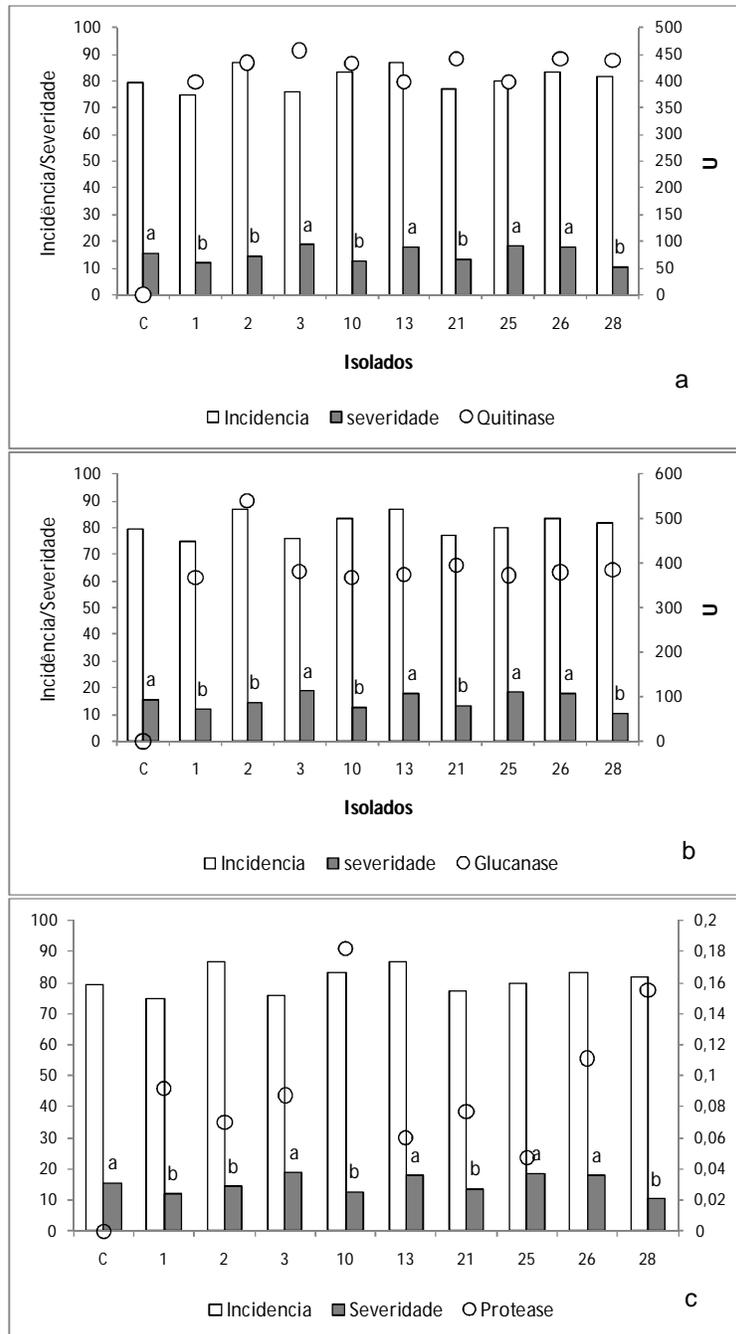


FIGURA 32. Relação entre a produção de enzimas extracelulares, quitinase (a), glucanase (b) e protease (c) com incidência e severidade da bacteriose foliar do eucalipto em *Eucalyptus* "urograndis". Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2008.

Uma melhor relação entre a produção de proteases e o biocontrole no controle de patógenos fúngicos do que com quitinase e glucanases (Figura 33 e 34), já foi verificado por Paz (2005). Elad (1996) também não encontrou correlação positiva entre a produção de quitinases e glucanases por *Trichoderma harzianum* T39 e o biocontrole de *B. cinerea*. Portanto, o controle do patógeno pode estar associado a produção de proteases, as quais podem atuar diretamente lisando as proteínas associadas a parede celular dos patógenos, como mostrado com proteases de *Trichoderma harzianum* 1051 que hidrolisam a parede celular de *Moniliophthora perniciosa* (De Marco *et al.*, 2002), ou indiretamente, pela inativação de proteínas liberadas pelo patógeno no meio, importantes no reconhecimento do hospedeiro e desenvolvimento da doença. A inativação de proteínas extracelulares de fitopatógenos foi demonstrado com proteases de *B. megaterium* inativando enzimas de *Rhizoctonia solani*, por Suarez *et al.* (2004).

As quitinases e glucanases são descritas como importantes no processo de controle de fungos, como demonstrado pela produção de quitinases por isolados de *Streptomyces* sp. no controle de diferentes fungos fitopatogênicos (Quecine *et al.*, 2008), e na levedura *Metschnikowia pulcherrima*, efetiva no controle pós-colheita de *B. cinerea* sobre maçãs (Saravanakumar *et al.*, 2009), entretanto as mesmas não são efetivas em todas as circunstâncias, sob diferentes condições ambientais (Gohel *et al.*, 2006). Assim como verificado neste trabalho, Paz (2005) e Aktuganov *et al.* (2003) trabalhando com estirpes de *Bacillus* sp., não encontraram correlação entre produção de quitinases e inibição de crescimento de fitopatógenos, podendo

ser uma característica intrínseca do gênero, e portanto, a produção de quitinases e glucanases não pode ser usado como um método seguro na seleção de *Bacillus* spp. como agentes de biocontrole (Aktuganov *et al.*, 2003; Paz, 2005).

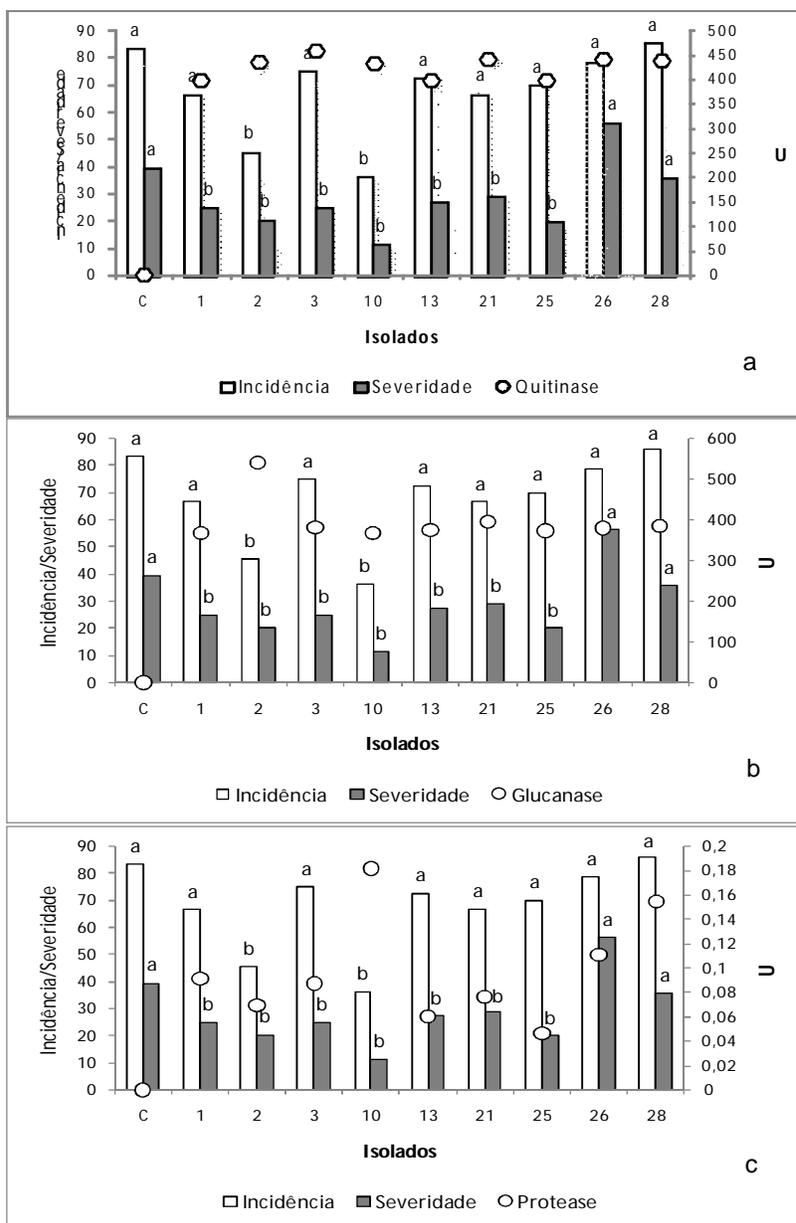


FIGURA 33. Relação entre a produção de enzimas extracelulares, quitinase (a), glucanase (b) e protease (c) com incidência e severidade de mofo cinzento em *Eucalyptus* "urograndis". Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2008.

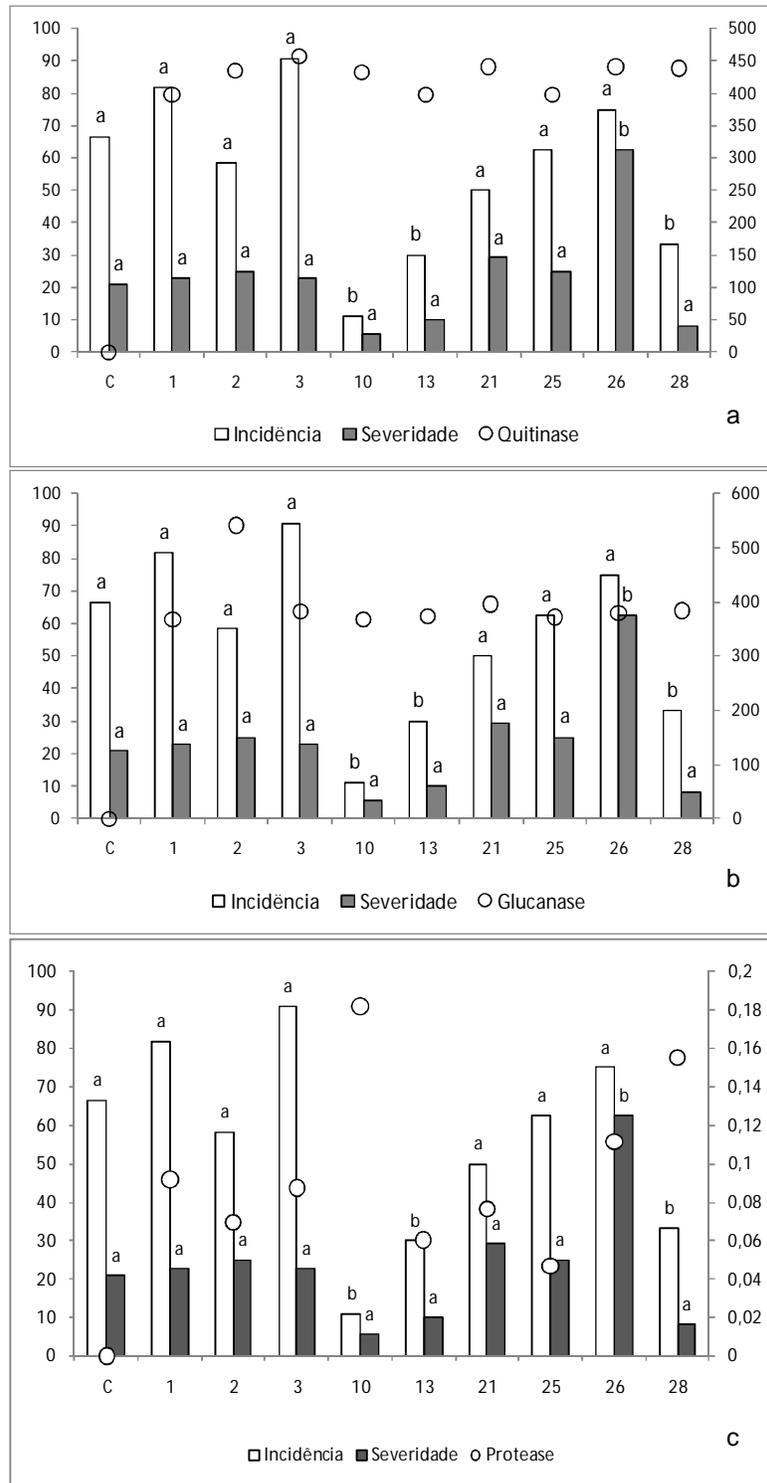


FIGURA 34. Relação entre a produção de enzimas extracelulares, quitinase (a), glucanase (b) e protease (c) com incidência e severidade de *Cylindrocladium gracile* em *Eucalyptus* "urograndis". Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2008.

4.9.2 Produção de metabólitos voláteis por bactérias endofíticas de eucalipto inibitórios a microrganismos fitopatogênicos de eucalipto

Todos os isolados testados reduziram significativamente o crescimento micelial médio de *B. cinerea*, com exceção do isolado *Pseudomonas* sp. EUCB 3, usado como controle positivo (Figura 35). Portanto, metabólitos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas de eucalipto testadas atuam negativamente sobre *B. cinerea in vitro*, e o mesmo pode ocorrer também *in vivo*.

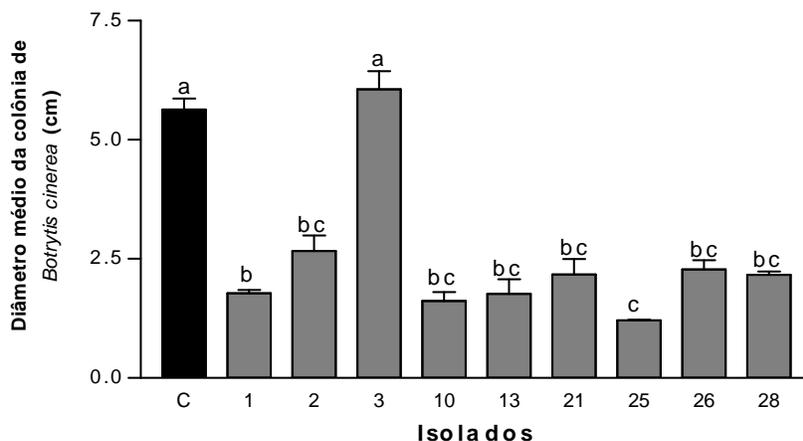


FIGURA 35. Crescimento micelial médio de *Botrytis cinerea* quando exposto à metabólitos voláteis de bactérias endofíticas de eucalipto. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2009.

Diferentemente do que foi verificado no ensaio de inibição de crescimento de *B. cinerea*, somente o isolado *Bacillus* sp. EUCB 28 reduziu significativamente o crescimento de *C. gracile* (Figura 36), o que sugere que este fitopatógeno deve possuir mecanismos de detoxificação de compostos voláteis tóxicos. Efeitos inibitórios de metabólitos voláteis sobre *Cylindrocladium* sp. já foram descritos quando contrapostos com isolados de

Trichoderma sp (Carvalho Filho, 2008). Diferenças de suscetibilidade de diferentes fungos foram verificadas por Hassanein *et al.* (2009) quando avaliada atividade de metabólitos voláteis de *Pseudomonas aeruginosa* sobre *Helminthosporium* sp., *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger*, sendo as duas primeiras espécies inibidas e a última não afetada.

Um dos metabólitos voláteis que podem ter atuado na redução do crescimento de *B. cinerea* é o ácido hidrociânico (HCN), visto que os isolados *B. pumilus* EUCB 1, *B. subtilis* 10, 25, 26 e de *Bacillus* sp. EUCB 13 produziram este metabólito (TABELA 8). Hassanein *et al.* (2009) relaciona a inibição de *Helminthosporium* sp. e *Fusarium oxysporum* a produção de HCN.

A atividade de metabólitos voláteis na redução de *B. cinerea* patogênico a morangos já foi descrita para alguns isolados halofílicos de *Bacillus* sp. (Essghaier *et al.*, 2009).

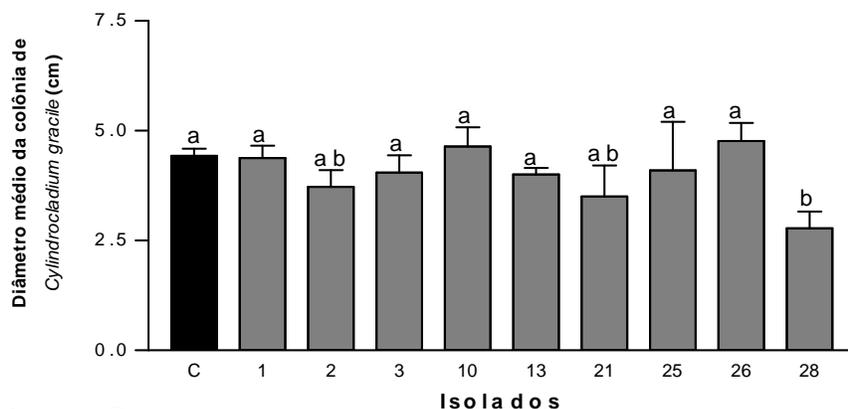


FIGURA 36. Crescimento micelial médio de *Cylindrocladium gracile* quando exposto á metabólitos voláteis de bactérias endofíticas de eucalipto. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.

Lobo Júnior & Abreu (2000) encontraram uma forte interação entre temperatura e atividade inibitória de metabólitos voláteis de isolados de

Trichoderma sp., com resultados melhores geralmente quando avaliados sob temperaturas diferentes do ótimo do fitopatógeno, *Sclerotinia sclerotiorum*, o que alerta aos pesquisadores de que processos de seleção de antagonistas devem ser feitos numa ampla gama de fatores ambientais, preferencialmente, prevendo-se as condições ótimas ao patógeno, para certificação de que o agente de biocontrole expressará todo o seu potencial quando aplicado no campo. A não observância deste fator pode ser um dos motivos da pobre correlação entre resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, observados em alguns trabalhos (Bevivino *et al.*, 1998; Senthilkumar *et al.*, 2009).

Os isolados *Bacillus* sp. EUCB 13 e EUCB 28 não permitiram o crescimento de colônias de *Xanthomonas* sp., quando estas foram expostas ao metabólitos voláteis destas bactérias endofíticas, mostrando haver nestes metabólitos tóxicos à sobrevivência da bactéria fitopatogênica testada (Tabela 8).

Outros isolados de endófitos testados reduziram a contagem de colônias de *Xanthomonas* sp., como *Pseudomonas* sp. EUCB 3 e os isolados de *B. subtilis* EUCB 10, 21, 25 e 26, mas não de forma tão drástica quanta *Bacillus* sp. EUCB 13 e 28, que inibiram totalmente o crescimento do patógeno (Tabela 7). *Bacillus* sp. EUCB 13 mostrou uma alta produção de HCN *in vitro*, o que pode indicar uma relação deste metabólito volátil com a inibição da bactéria fitopatogênica (Tabela 8).

TABELA 8. Inibição de *Xanthomonas* sp. e produção de ácido cianídrico (HCN) por bactérias endofíticas de *Eucalyptus* “urograndis”. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, 2009.

Tratamento	Inibição de <i>Xanthomonas</i> sp.	Produção de HCN
Controle	-* (5×10^8)	**
<i>B. pumilus</i> EUCB 1	+ ($3,8 \times 10^8$)	+
<i>B. subtilis</i> EUCB 2	+ (8×10^7)	-
<i>Pseudomonas</i> sp. EUCB 3	++ (2×10^7)	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 10	++ (2×10^7)	+
<i>Bacillus</i> sp. EUCB 13	+++ (0)	++
<i>B. subtilis</i> EUCB 21	++ (2×10^7)	-
<i>B. subtilis</i> EUCB 25	++ (2×10^7)	++
<i>B. subtilis</i> EUCB 26	++ (2×10^7)	++
<i>Bacillus</i> sp. EUCB28	+++ (0)	-

- indica ausência de inibição do fitopatógeno ou produção de HCN, + = pouca inibição ou produção, ++ = inibição ou produção média e +++ = inibição total do fitopatógeno ou muita produção de HCN.

A maior produção de HCN pelos isolados endofíticos *Bacillus* sp. EUCB 13 e *B. subtilis* EUCB 25 e 26 pode ser relacionada a redução no tamanho de plantas de *E. “urograndis”* observada neste trabalho, visto que este metabólito possivelmente está envolvido na inibição do metabolismo energético, ao atuar no desacoplamento do sistema da citocromo P450 de algumas plantas (Kremer & Souisse, 2001), como comprovado por Bakker & Schippers (1987) ao verificar que todas as linhagens de *Pseudomonas* fluorescentes relacionadas a promoção de crescimento de plantas de batata, não eram produtoras de HCN. Estes resultados sugerem que o uso de agentes de biocontrole produtores de alta concentração de HCN deve ser limitada a tratamento pós-colheita, como usado por Leelasuphakul *et al.* (2008) e Mikani *et al.* (2008), ou usado em plantas que possuam uma rota respiratória alternativa resistente ao cianeto (Lambers; 1982).

5 CONCLUSÕES

- Bactérias endofíticas promissoras como agentes de controle biológico e promoção de crescimento habitam o interior de plantas de *Eucalyptus* “urograndis”;
- A diversidade de espécies de bactérias residentes nas partes aéreas de *E.* “urograndis” é baixa, quando avaliado pelo método de isolamento de fragmentos, sendo representada basicamente por *Bacillus subtilis*;
- Existe variabilidade fisiológica entre os isolados de bactérias endofíticas isolados de eucalipto;
- Alguns isolados de bactérias endofíticas produzem AIA, solubilizam fosfato e fixam nitrogênio, mas isso nem sempre é correlacionado com aumento de biomassa de planta;
- A síntese de ácido hidrocianico (HCN) por alguns isolados de bactérias endofíticas é inibitório ao crescimento de plantas de *E.* “urograndis”;
- Nenhum isolado de bactéria endofítica selecionadas para os ensaios *in vivo* produzem sideróforos em cultura;
- A produção de proteases correlaciona com os índices de biocontrole de patógenos fúngico, portanto, pode ser usado como um indicador nos processos de seleção de antagonistas;

- A produção de quitinases e glucanases não foram relacionadas aos índices de biocontrole dos patógenos testados;
- *Bacillus subtilis* EUCEB 10 é o isolado mais promissor no controle de doenças fúngicas que atacam *E. urograndis*, em fase de viveiro;
- *B. subtilis* EUCEB 10 aumenta a taxa de enraizamento e qualidade de mudas de *E. urograndis*;

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do ponto de vista do uso de agentes microbianos em viveiros florestais, este trabalho comprova a efetividade de alguns isolados, com destaque para *Bacillus subtilis* EUCB 10, obtidos da microbiota endofítica de *Eucalyptus* “urograndis” no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas. Este trabalho foi bastante abrangente, começando a partir do isolamento das bactérias endofíticas, a análise da variabilidade genética entre os isolados, a obtenção de um provável perfil de colonização do interior de mudas por cada isolad até a avaliação da efetividade *in vitro* e *in vivo*, sob condições ótimas para diferentes patógenos. Além da elucidação de alguns mecanismos de ação envolvidos nesses processos, trazendo com isso uma melhor compreensão sobre a viabilidade e a efetividade do uso de microrganismos em viveiros florestais. Trabalhos posteriores devem avaliar vários outros pontos visando a otimização do uso das bactérias endofíticas, como a avaliação de diferentes métodos e tempos de inoculação dos endófitos e a formulação mais adequada para manutenção das características dos agentes de biocontrole, além da verificação da capacidade de elicitação de resistência e colonização da planta.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF: Ano base 2005. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/anuario-ABRAF-2006.pdf>. Acesso em 14 mai. 2007, 13:45.

ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF: Ano base 2006. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/anuario-ABRAF-2007.pdf>. Acesso em 26 nov. 2007, 10:23.

ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF: Ano base 2007. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF08-BR.pdf>. Acesso em 26 de mai. 2008, 17:45.

AKTUGANOV, G.E., MELENT'EV, A.I., KUZ'MINA, L.Y., GALIMZYANOVA, N.F. AND SHIROKOV, A.V. (2003) The chitinolytic activity of *Bacillus* Cohn bacteria antagonistic to phytopathogenic fungi. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 72, p. 313–317, 2003.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004, 442 p.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

APARECIDO, C.C.; FURTADO, E.L. & FIGUEIREDO, M.B. Caracterização morfofisiológica de isolados do gênero *Cylindrocladium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34. n.1, p. 38-47, 2008.

ARAUJO, W.L.; LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F. D. & AZEVEDO, J.L. Interactions between endophytes and plant host: biotechnological aspects. In: AIT BARKA, E.; CLÉMENT, C. **Plant-Microbe Interactions**. Research Signpost: Kerala, 2008. p. 95-115.

ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ARNOLD, A.E. & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, Ithaca, v. 88, n. 3, pp. 541-549, 2007.

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGUI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed). "**Fungi: multifacetated microbes**". Boca Raton: Anamaya Publishers New Delhi and CRC Press, 2006. p. 189-207.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: AZEVEDO, J.L.; MELLO, I.S. de. **Ecologia Microbiana**. São Paulo: Embrapa Jaguariúna, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr, W.; PEREIRA, J.O. & ARAÚJO, W. L. de. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BACKMAN, P.A. & SIKORA, R.A. Endophytes: an emerging tool for biological control. **Biological Control**, Montreal, v. 46, p. 1-3, 2008.

BAKER, K.F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974, 433 p.

BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 19, n.4, p. 451-457, 1987.

BENCHIMOL, R.L.; CHU, E. Y.; MUTO, R. Y.; DIAS-FILHO, MOACYR BERNARDINO. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.35, n.7, p. 1343-1348, 2000.

BENHAMOU, N. & CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p.1062-1071, 1993.

BERG, G.; HALLMANN, J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: Schulz, B.; Boyle, C.; Sieber, T.N. (ed.) **Microbial Root Endophytes**. Springer-Verlag, 2006.

BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, L. Characterization of free living maize rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, Reading, v. 27, p. 225–237, 1998.

BROUGHTON, W.J.; JABBOURI, S. & PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 20, p. 5641-5652, 2000.

BRUNETTA, J.M.F.C.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; GOMES, J.M.; BINOTI, D.B.; FONSECA, E.P. Avaliação da especificidade de rizobactérias isoladas de diferentes espécies de *Pinus* sp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31 (6), p. 1027-1033, 2007.

CAMATTI-SARTORI, V. **Dinâmica das populações de fungos endofíticos e epifíticos, impacto ecológico em diferentes sistemas de produção da Macieira (*Malus domestica*) e seu potencial biotecnológico**. 2003. 109 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

CAMATTI-SARTORI, V, SILVA-RIBEIRO, RT, VALDEBENITO-SANHUEZA, RM, PAGNOCCA, FC, ECHEVERRIGARAY, S., AZEVEDO JL. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, p. 397-402, 2005.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophilacinus*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 457-460, 2008.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Ithaca, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.

CARVALHO FILHO, M.R. **Trichoderma spp. como agente de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotor de crescimento em mudas de eucalipto**. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; MULLEMBERG, K.; CONDRON, M.M.; TEPLow, D.B.; FOLGIANO,V.; GALLO, M.; FERRACANE, R.; MANNINA, L.; VIEL, S.; CODDE, M.; ROBISON, R.; PORTER, H. & JENSES, J. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL3052. **FEMS Microbiology Letters**, Reading, v. 255, p. 296-300, 2006.

CHANWAY, C.P. Bacterial endophytes: Ecological and practical implications. **Sydowia**, Innsbruck, v. 50, p. 149-170, 1998.

CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, Hull, v. 30, n. 5, p. 919-923, 2008.

COUTINHO, T.A.; PREISIG, O. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids and clones in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 1, p. 20-25, 2002.

CUNHA, J. F.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Efeito "in vitro" de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, p. 871-876, 2006.

DAHM, H.; HRYNKIEWICZ, K.; STRZELCZYK, E.; WRÓTNIAK, W. Studies on the production of siderophores by forest trees endophytic bacteria and fungi. **Folia Forestalia Polonica**, Raszyn, v. 45, p. 5-13, 2003.

DE BARY, A. **Morphologie Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten**, v. 2. Leipzig: Holmeister's Handbook of Physiological Botany, 1866, 316p.

DE MARCO, J.L.; VALADARIS-INGLIS, M.C.; FELIX, C.R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witch's broom disease. **BMC Biochemistry**, London, v.3, n. 3, 2002.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. 11. Production of volatile antibiotics. **Transactions of British Mycology Society**, Surrey, v. 57, p. 41-48, 1971.

DI CELLO, F.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4485-4493, 1997.

DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; TEIXEIRA, M.A.; ASSUMPÇÃO, L.C.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.

Dickson, A. LEAF, A.L. HOSNER, J.F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forestry Chronicle**, West Mattawa, v. 36, p. 10-13, 1960.

DUNSTAN, W.A.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Effects of bacteria on mycorrhizal development and growth of container Brown *Eucalyptus diversicolor* F. Muell. Seedlings. **Plant and Soil**, Crawley, v. 201, p. 241-249, 1998.

ELAD, Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 38, p. 719-732, 1996.

ELAD, Y.; STEWART, A. Microbial control of *Botrytis* spp. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 223-241.

ELVIRA-RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in pear cultivar under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 1036-1041, 2000.

EMMERT, E.A.B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: A (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, Reading, v. 171, n. 1, p. 1-9, 1999.

ESSGAIER, B.; FARDEAU, M.L.; CAYOL, J.L.; HAJLAOUI, M.R.; BOUDABOUS, A.; JIJAKLI, H.; SADEI-ZOUAQUI, N. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 106, n. 3, p. 833-846, 2009.

FERREIRA, A. **Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplaneo com *Eucalyptus***. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; SHINITIRO, O.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Reading, v. 287, n.1, p. 8-14, 2008.

FERREIRA, E.M.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; LEITE, H.G.; SARTORIO, R.C.; PENCHEL FILHO, M. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2004.

FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal**. Viçosa: SIF, 1989. 570 p.

FICHTNER, K.; KOCH, G.W.; MOONEY, H.A. Photosynthesis, storage and allocation. In: SCHULZE, E.D.; CALDWELL, M.M. (Ed.). **Ecophysiology of photosynthesis**. Berlin : Springer, 1995. p.132-146.

FONSECA, E. P.; VALIENGO, V.S.; MIGLIORANZA, E.; FONSECA, N.A.N. Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume, produzidas sob diferentes períodos de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n.4, p. 515-523, 2002.

GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Firenze, v.33, p. 410-415, 2001.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 793-796, 1995.

GOHEL, V., SINGH, A., VIMAL, M., ASHWINI, P. AND CHHATPAR, H.S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 5, p. 54–72, 2006.

GOMES, N.S.B.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.43, p. 123-138, 2001.

GONÇALVES, R.C. **Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil**. 2003, 79 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.G.; BIZI, R.M & AUER, C.G. 2005. Metodologia para Inoculação Padronizada de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus dunnii*. **Comunicado Técnico 134**, Embrapa Florestas, 2 p.

HANDELSMAN, J.; RAFFEL, S.; MESTER, E.H.; WUNDERLICH, L.; GRAU, C.R. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 3, p. 713-718, 1990.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.; DAVIES, F.; GENEVE, R. **Plant Propagation - principles and practices**. New York: Prentice-Hall International, 1997. 770p.

HASSANEIN, W.A.; AWNY, N.M.; EL-MOUGITH, A.A.; SALAH EL-DIEN, S.H. The antagonistic activities of some metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* Sha8. **Journal of Applied Sciences Research**, Faisalabad, v. 5, n.4, p. 404-414, 2009.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Circular Técnica IPEF**, n.192, 2000.10p.

HSU, S.C. & LOCKWOOD, J.L. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 29, n. 3, p. 422-426, 1975.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z. & SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Reading, v. 31, p. 163-167, 2001.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS - IPEF. Sistemas alternativos de microjardim clonal via solução nutritiva. **Boletim Informativo IPEF**, Piracicaba, v. 2, n. 15, p. 1-2, 1996.

JI, P.; CAMPBELL, H.L.; KLOEPPER, J.W.; JONES, J.B.; SUSLOW, T.V.; WILSON, M. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, Montreal, v. 36, n. 3, p. 358-367, 2006.

KHODAKARAMIAN, G.; HEYDARI, A.; BALESTRA, G.M. Evaluation of Pseudomonads bacterial isolates in biological control of citrus bacterial canker

disease. **International Journal of Agricultural Research**, New York, v. 3, n. 4, p. 268-272, 2008.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Chicago, v. 16, p. 111-120, 1980.

KLOEPPER, J.W. Current status and future trends in biocontrol research and development in the U.S. In: International Symposium of clean agriculture, 1997, Japão, **Anais Simpósio**, Japão, 1997, p. 49-52.

KREMER, R.J.; SOUISSI, T. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of wheat seedling growth. **Current Microbiology**, Braunschweig, v. 43, p. 182–186, 2001.

KRINGS, M; TAYLOR, TN; HASS, H; KERP, H; DOTZLER, N; HERMSEN, EJ. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist**, Lancaster, v. 174, n. 3, p. 648-657, 2007.

KRUGNER, T.L., AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**, v. 2, 4 ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, 663 p.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (Glycine max) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZARINI-KLEINER, A. A. & AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, n.12, p. 1244-1251, 2004.

LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAUJO, W.L. & AZEVEDO, J.L.. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 637-642, 2006.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W.; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v. 39, n. 1, p. 55-59, 2004.

LAMBERS, H. Cyanide-resistant respiration: A non phosphorylating electron transport pathway act as an energy overflow. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 55, p. 478–485, 1982.

LEEFLANG, P.; SMIT, E.; GLANDORF, D. C. M.; VAN HANNEN, E. J. & WERNARS, K. Effects of *Pseudomonas putida* WCS358r and its genetically modified phenazine producing derivative on the *Fusarium* population in a field experiment, as determined by 18S rDNA analysis. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 34, p. 1021-1025, 2002.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v. 48, p. 113–121, 2008.

LELLIOT, R.A.; STEAD, D.E. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. Palo Alto: Blackwell, 1987, 216 p.

LEIFERT, C.; LI, H.; SIRIPUN, C.; HAMPSON, S.; WORKMAN, S.; SIGEE, D.; EPTON, H.A.S.; HARBOUR, A. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v. 78, n.2, p. 97-108, 1995.

LEWIS, L.C.; BRUCK, D.J.; GUNNARSON, R.D. & BIDNE, K.G. Assessment of plant pathogenicity of endophytic *Beauveria bassiana* in Bt transgenic and non-transgenic corn. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1395-1400, 2001.

LIU, B.; QIAO, H.; BUCHENAUER, H.; HAN, Q. KANG, Z. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. **Biological Control**, Montreal, v. 49, p. 277-285, 2009.

LOBO JÚNIOR M. & ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pHs. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.24, n.2, p. 521-526, 2000.

LONG, H.H.; SCHMIDT, D.D.; BALDWIN, I.T. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in commom growth response. **PLoS**, San Francisco, v.3, n.7., e.2702, 2008.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J.C.; HU, J. & TAN, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., na endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, Davis, v. 151, p. 67-73, 2000.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **RAPP**, v. 4, p. 1-49, 1996.

MAES, M.; Huvenne, H.; Messens, E. *Brenneria salicis*, the bacterium causing watermark disease in willow, resides as an endophyte in wood. **Environmental Microbiology**, Bedford, v. 11, n.6, p. 1453-1462, 2009.

MAFIA, R. G. et al. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, p.843-851, 2005.

MAFIA, R. G. **Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto**. 2004. 105f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, E.M.; LEITE, F.P.; SOUZA, F.L. Variáveis climáticas associadas à incidência de mofo-cinzento em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 152-157, 2006.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A. et al. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 101-105, 2003.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau** (*Theobroma cacao*). 2006. 127 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MCKINNEY H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Lahore, v. 26, p. 195-218, 1923.

MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico v. 1**. Jaguariúna: Editora Embrapa, 1998. p. 17-30.

MENDES, R.; PIZZARINI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO. W.A.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane : genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

METZ, A., HADDAD, A.; WORAPONG, J.; LONG, D. M.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, um fungo produtor de taxol. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 146, p. 2079-2089, 2000.

MIETHLING, R. & TEBBE, C. C. Resilience of a soil-established, genetically modified *Sinorhizobium meliloti* inoculant to soil management practices. **Applied Soil Ecology**, Belfield, v. 25, p. 161-167, 2004.

MIKANI, A.; ETEBARIAN, H.R.; SHOLBERG, P.L.; O'GORMAN, D.T.O.; STOKES, S.; ALIZADEH, A. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 107-112, 2008.

MILLER R.L.; HIGGINS, V.J. Association of cyanide with infection of birdsfoot trefoil by *Stemphylium loti*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 104–110, 1970.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Chapel Hill, v.31, p.426-428, 1959.

MONNERAT, R.; SANTOS, R.C.; BAROS, P.C.; BATISTA, A.C.; BERRY, C. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003., 4 pg, **Comunicado Técnico**, 98.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. **FEMS Microbiology Letters**, Readings, v. 170, p. 265-270, 1999.

NETO, P.A. de S. P.; AZEVEDO, J.L. & ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.29, p. 62-76, 2002.

NEVES, D.A. 2007. **Condições favoráveis à mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em eucalipto**. 2007, 33 f.. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

NUNES, F.V. **Isolamento e identificação de bactérias endofíticas de café (*Coffea arabica* e *Coffea robusta*) e suas aplicações biotecnológicas**. 2004. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. **Applied Environmental and Microbiology**, Washington, v.68, n. 8, p. 3795–3801, 2002.

PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 39, p. 103-133, 2001.

PAZ, I.C.P. 2005. **Atividade biológica de metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos do cacauero *Theobroma cacao* L. e o controle biológico de *Crinipellis pernicioso***. 2005, 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2005.

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

PINTO, L.S.R.C.; AZEVEDO, J.L.; PEREIRA, J.O.; VIEIRA, M.L.C. & LABATE, C.A. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. **New Phytologist**, Lancaster, v. 147, p. 609-615, 2000.

PIRTILLÄ, A. M.; POSPIECH, H.; LAUKKANEN, H.; MYLLYLÄ, R.; HOHYOLA, A. Two endophytic fungi in different tissues of scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). **Microbial Ecology**, Rockville, v. 45, p. 53-62, 2003.

POON, E.S.; HUANG, L.L.; KANG, T.T. Possible mechanisms of symptom inhibition of bacterial blight of Rice by an endophytic bacterium isolated from rice. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 18, p. 61-70, 1977.

PROCOPIO, R. E.L. **Diversidade de bactérias endofíticas de *Eucalyptus* spp.e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

QUECINE, M.C.; ARAÚJO, W.A.; MARCON, J.; GAI, C.S.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v.47, n.6, p. 486-491, 2008.

RODRIGUEZ, R.J.; WHITE JR., J.F.; ARNOLD, E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles **New Phytologist**, Lancaster, v. 182, p. 314–330, 2009.

ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de enfermidades de plantas: procedimentos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 172 p.

ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C. L. & AZEVEDO, J.L. Production of extracellular enzymes from isolates of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 38, p. 1-3, 1981.

RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; SANTOS, D.R. & AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal Biological Science**, Bethesda, v. 1, p. 24-33, 2005.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALLES, J. F.; GITAHY, P. D.; SKOT, L. & BALDANI, J. I. Use of endophytic diazotrophic as a vector to express the *cry3A* gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 155-161, 2000.

SAMBROOK, J., FRITSCH E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2 ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 1989, 1659p.

SANTOS, A.F.; AUER, C.G. & GRIGOLETI JR., A. 2001. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. **Circular Técnica 45, Embrapa Florestas**, 20 p.

SARATH, G., MOTTE; R.S.D.L.; WAGNER, F.W.. Protease assay methods. In: BEYNON, R.J.; BOND, J.S. (eds.) **Proteolytic enzymes: A practical approach**. New York: IRL Press, 1989, p. 25-55.

SARAVANAKUMAR, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agent. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 123, n. 2, p. 183-193, 2009.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Surrey, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 160, p. 46-56, 1987.

SENTHILKUMAR, M.; SWAMALAKSHMI, E.K.; GOVINDASAMY, V.; LEE, E.Y.K.; ANNAPUMA, E.K. Biocontrol Potential of Soybean Bacterial Endophytes Against Charcoal Rot Fungus, *Rhizoctonia bataticola*. **Current Microbiology**, v. 58, p. 288-293, 2009.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, Braunschweig, v.50, n. 4, p. 239-249, 2004.

SHI, Y.; LOU, K.; LI, C. Promotion of plant growth by phytohormones-producing endophytic microbes of sugar beet. **Biology and Fertility of Soil**, Firenze, v.45, n.6, p.645-653, 2009.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Suita, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SILVA, H.D. O. *Eucalyptus* na silvicultura brasileira e no mundo. **Folha da Floresta**, Colombo, ago. 1997. Edição Especial

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 32, n.4, p. 1062-1072, 2008.

SOMEYA, N.; NUMATA, S.; NAKAJIMA, M.; HASEBE, A.; HIBI, T. & AKUTSU, K. Biological control of rice blast by the epiphytic bacterium *Erwinia ananas* transformed with a chitinolytic enzyme gene from an antagonistic bacterium, *Serratia marcescens* strain B2. **Journal of Genetic Plant Pathology**, Kyoto, v. 69, p. 276-282, 2003.

STEFANI, F.O.P.; BÉRUBÉ, J.A. Biodiversity of foliar fungal endophytes in white spruce (*Picea glauca*) from southern Québec. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v.84, n. 5, p. 777-790, 2006.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical review in Biotechnology**, Edinburgh, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

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

SUAREZ, B.; REY, M.; CASTILLO, P.; MONTE, E.; LLOBELL, A. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 65, p. 46-55, 2004.

SUZUKI, Y. & OYAZU, H. Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. **Current Microbiology**, Braunschweig, v. 47, p. 138-143, 2003.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA), software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, D.A.; ALFENAS, A.C; MAFIA, R.G.; MAFFIA, L.A. & FERREIRA, E.M. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 350-356, 2004.

TEIXEIRA, M.A. **Diversidade de bactérias endofíticas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de diferentes regiões do Brasil**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2004. 102 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

TROTEL-AZIZ, P.; COUDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v.64, n. 1, pp. 21-32, 2008.

UNTERSEHER, M.; REIHER, A.; FINSTERMEIER, K.; OTTO, P.; MORAWETZ, W. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. **Mycological Progress**, München, v. 6, n. 3, p. 201-212, 2007.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R.N.; STROBEL, G. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). **Microbial Ecology**, Rockville, v. 54, n. 1, p. 119-125, 2007.

WANG, H.; WEN, K.; ZHAO, X.; WANG, X.; LI, A.; HONG, H. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. **Crop Protection**, Lincoln, v. 28, p. 634–639, 2009.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; VAN KAN, J.A.L. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, Reading, v.8, n. 5, p. 561-580, 2007.

WUFF, E.G.; MGUNI, C.M.; MORTENSEN, C.N.; KESWANI, C.L.; HOCKENHULL, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.108, n.4, p. 317-325, 2002.

WULFF, E.G.; VAN VUURDE, J.W.L.; HOCKENHULL, J. The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. **Plant and Soil**, Crawley, v. 255, p. 463-474, 2003.

ZHOU, J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 288-294, 2003.

ANEXO I

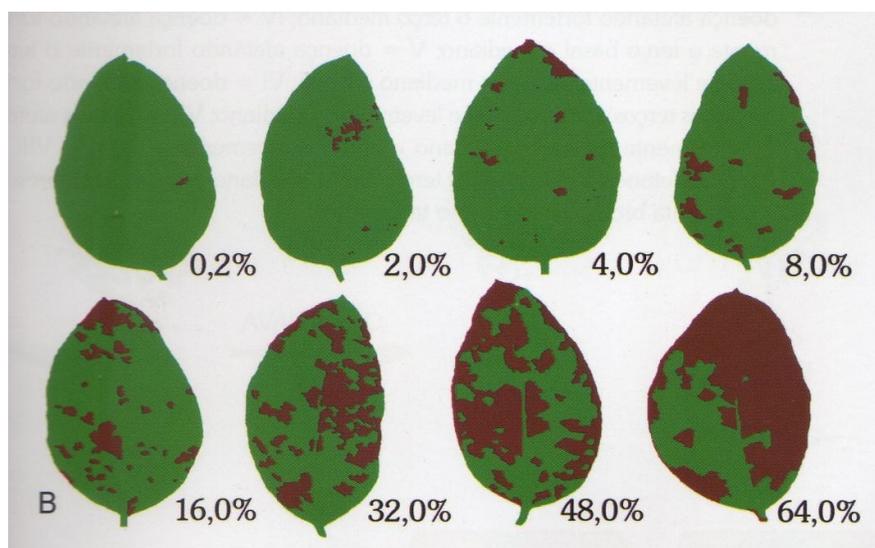


FIGURA 1. Escala diagramática para avaliação da severidade de bacteriose foliar de eucalipto, proposta por Gonçalves (2003).

ANEXO II

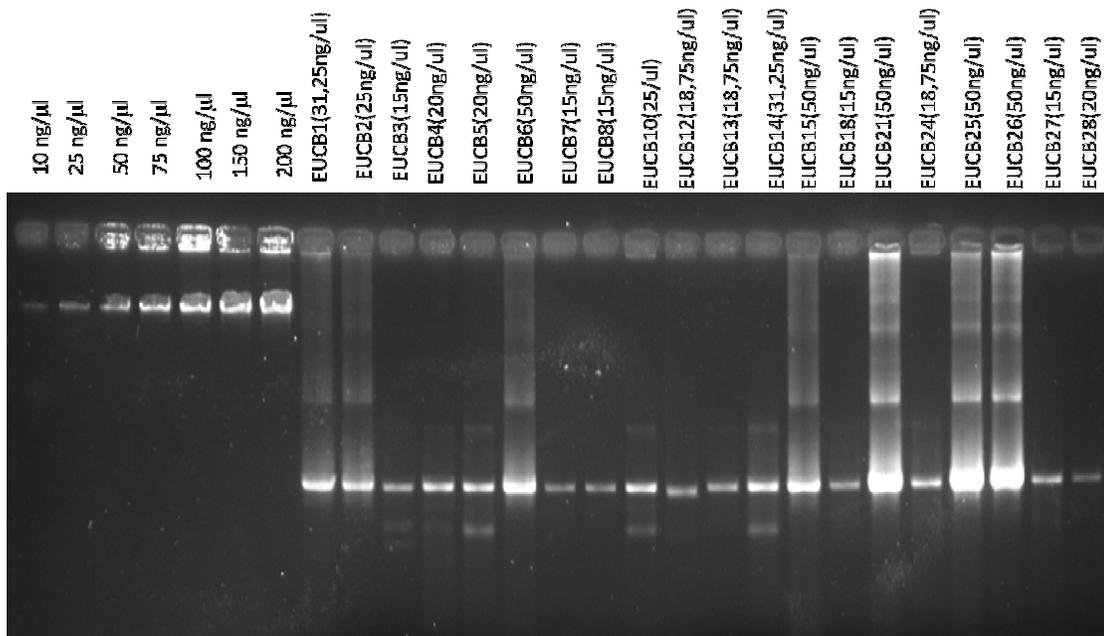


FIGURA 2. Quantificação de rDNA 16S dos isolados de bactérias endofíticas .