



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ARYANA PINHEIRO DO NASCIMENTO

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *Himatanthus*
sucuuba

MANAUS-AM

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ARYANA PINHEIRO DO NASCIMENTO

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *Himatanthus*
*sucuuba***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. José Odair Pereira

Co-Orientador: Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

MANAUS-AM

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N244p Nascimento, Aryana Pinheiro do
Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas de Himatanthus
sucuba / Aryana Pinheiro do Nascimento. 2017
90 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Odair Pereira
Coorientador: Pedro de Queiroz Costa Neto
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Colletotrichum. 2. controle biológico. 3. promotor de
crescimento. 4. bactérias endofíticas. I. Pereira, José Odair II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

A minha Mãe,

*que me ensinou a valorizar a Vida e a Natureza,
despertando em mim a paixão pela Ciência e a busca pelo
Conhecimento, o respeito pelas pessoas e o temor a Deus.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e por sempre me mostrar o melhor caminho.

A minha família pelo apoio e compreensão incondicional.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Odair Pereira, pela oportunidade, confiança e pelo privilégio de fazer parte de sua equipe de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, pela fundamental co-orientação, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pela paciência e dedicação durante todo desenvolvimento do projeto, pela tranquilidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Adolfo José da Mota, pela colaboração, gentileza e pelas facilidades concedidas no Laboratório de Biodegradação.

Ao meu namorado e amigo Luiz Felipe, pela paciência, incentivo, atenção, e por estar sempre disposto a me ajudar na realização deste trabalho.

A minha bolsista de iniciação científica, Maria Eduarda, que colaborou no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana – LPBOM, pela amizade e conhecimentos trocados.

As amigas Ydrielly e Juci, do Laboratório de Biodegradação, pela amizade, companheirismo, ensinamentos trocados, conselhos, e pelas risadas compartilhadas, a vocês o meu muito obrigada.

Ao meu querido colega Edson Carmo, pelo incentivo e por estar sempre disposto a me ajudar.

Aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial a turma 2013/2: Pauline Soldera, Ana Flávia, Diego Moreira, Leissandra Castelo, Andréia Silva, pelo acolhimento, conversas, brincadeiras, conselhos, e por sempre um apoiar ao outro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos demais que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho e torcem por mim.

Meus sinceros Agradecimentos!

*“Quanto mais me aprofundo no
conhecimento da ciência, maior é minha crença
de que Deus é perfeito”*

Lucivana Mourão

RESUMO

NASCIMENTO, A.P. **Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sukuuba***. 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2017.

Na busca por alternativas sustentáveis de manejo de doenças, agentes de biocontrole bem como suas relações antagônicas, surgem como fonte importante para o controle biológico aplicado. Neste contexto, o emprego de micro-organismos endofíticos para fins de controle biológico vem sendo amplamente estudado. Eles compreendem, principalmente, fungos e bactérias que habitam o interior das plantas sem causar, aparentemente, danos aos seus hospedeiros. Sua capacidade de biocontrole pode advir de vários mecanismos, como a produção de substâncias deletérias a fitopatógenos ou competindo por espaço e nutrientes. Indiretamente, induzindo resistência sistêmica no hospedeiro ou pela produção de substâncias promotoras de crescimento. Neste sentido, este trabalho visou o isolamento, a caracterização bioquímica e molecular e a busca de bactérias endofíticas que atuem na redução de doenças como a antracnose ou estejam associados à promoção de crescimento vegetal, diminuindo os custos de produção e o impacto ambiental causados pelos insumos químicos. Foram obtidos 416 isolados bacterianos de *H. sukuuba*, representando 73,08% isoladas da folha, 10,10% do pecíolo e 16,82% da casca. Do total de 308 bactérias analisadas, 48,78% fixaram nitrogênio atmosférico, 83,77% foram capazes de produzir AIA e 96,42% solubilizaram fosfato inorgânico. Quanto ao ensaio de antagonismo *in vitro*, 219 bactérias foram selecionadas por seleção massal para os testes de cultura pareada e termoestabilidade, no confronto direto 68,49% conseguiram inibir substancialmente o crescimento dos fitopatógenos agindo por antibiose, com diferentes níveis de toxicidade aos patógenos desafiantes, quanto à termoestabilidade 33,79% das linhagens destacaram-se pois conseguiram inibir o crescimento dos fitopatógenos das três hospedeiras tropicais, revelando um grande espectro de ação, e, mostrando que os metabólitos produzidos demonstraram-se termoestáveis, mantendo suas atividades mesmo após a autoclavagem.

Palavras-chave: *Colletotrichum*, controle biológico, promotor de crescimento.

ABSTRACT

NASCIMENTO, A.P. **Biotechnological potential of isolated endophytic bacteria *Himatanthus sucuuba***. 2017. 90 f. Master thesis (Biotechnology) – Universidade Federal do Amazonas, 2017.

In the search for sustainable alternatives of disease management, biocontrol agents as well as their antagonistic relations, appear as important source for the applied biological control. In this context, the use of endophytic microorganisms for biological control purposes has been extensively studied. They mainly comprise fungi and bacteria that inhabit the interior of plants without apparently causing damage to their hosts. Their ability to biocontrol can come from several mechanisms, such as the production of deleterious substances to phytopathogens or competing for space and nutrients. Indirectly, inducing systemic resistance in the host or by the production of growth promoting substances. In this sense, this work aimed at the isolation, biochemical and molecular characterization and the search for endophytic bacteria that act to reduce diseases such as anthracnose or are associated with the promotion of plant growth, reducing production costs and the environmental impact caused by the inputs Chemicals. A total of 416 bacterial isolates were obtained from *H. sucuuba*, representing 73.08% of the leaf, 10.10% of the petiole and 16.82% of the peel. From the total of 308 bacteria analyzed, 48.78% fixed atmospheric nitrogen, 83.77% were able to produce AIA and 96.42% solubilized inorganic phosphate. As for the in vitro antagonistic assay, 219 bacteria were selected by mass selection for the paired culture and thermostability tests. In the direct comparison, 68.49% were able to substantially inhibit the growth of phytopathogens by antibiosis, with different levels of toxicity to the challenging pathogens, With respect to thermostability, 33.79% of the lineages were highlighted because they were able to inhibit the growth of the phytopathogens of the three tropical hosts, revealing a great range of action, and, showing that the metabolites produced proved to be thermostable, maintaining their activities even after Autoclaving.

Key words: *Colletotrichum*, biological control, growth promoter.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. <i>Himatanthus succuuba</i>	18
Figura 2: <i>Himatanthus succuuba</i> : (A) Hospedeira 1; (B) Hospedeira 2; (C) Hospedeira 3 e regiões da copa da árvore destacando de onde as folhas foram coletadas para isolamento de endófitos	29
Figura 3: Descontaminação superficial do material vegetal de <i>Himatanthus. succuuba</i> para isolamento de micro-organismos endofíticos	30
Figura 4: Folha de <i>Himatanthus. succuuba</i> : fragmentos utilizados para isolamento de bactérias endofíticas	32
Figura 5: Disposição dos fragmentos de <i>Himatanthus succuuba</i> , em placas de Petri com Ágar Nutriente	32
Figura 6: Procedimento de Coloração de Gram	35
Figura 7: Reação do teste de fermentação/oxidação da glicose	36
Figura 8: Película formada em meio de cultura livre de nitrogênio, indicando resultado positivo para o teste de fixação de nitrogênio	38
Figura 9: Diâmetro dos halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por linhagem bacteriana positiva, inoculada em triplicata	39
Figura 10: Modelo esquemático de pareamento de colônias	41
Figura 11: (A) Modelo esquemático com cultura pareada <i>in vitro</i> , utilizado para teste de antagonismo com bactérias endofíticas selecionadas; (B) Esquema do tratamento controle	42
Figura 12: Distribuição ao nível taxônomico de gênero das bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus succuuba</i>	51
Figura 13: Morfologia das células bacterianas isoladas de <i>Himatanthus succuuba</i> observadas pelo teste coloração de Gram sob microscopia óptica de 1000 X (A) Bastonetes Gram-negativo; (B) Bastonetes Gram- positivo	52
Figura 14: Teste de catalase de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus succuuba</i> (A) Catalase positivo; (B) Catalase negativo	52
Figura 15: Teste O/F de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus succuuba</i> ; (A) Controle negativo; (B) Reação Oxidativo/Fermentativa anaeróbios facultativos	53
Figura 16: Capacidade de fixar nitrogênio pelas bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus succuuba</i>	54
Figura 17: Modificação do meio de cultura NFb semi-sólido do pH básico (controle) para o pH ácido mostrado pelos isolados B122H3 e B105H3 e formação de película aerotóxica	55
Figura 18: Equação da reta dos padrões de concentrações de AIA comercial	57
Figura 19: Quantificação de AIA por bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus succuuba</i>	57
Figura 20: Percentual por tecido da planta das bactérias endofíticas de <i>Himatanthus succuuba</i> com capacidade de solubilizar fosfato de cálcio insolúvel.....	61

Figura 21: Fitopatógenos testados no antagonismo <i>in vitro</i> frente a bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sucuuba</i> (A) <i>Colletotrichum frutícola</i> isolado do cajueiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado da mangueira; (C) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado do guaranazeiro	62
Figura 22: Pré-seleção de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sucuuba</i> frente ao (A) <i>Colletotrichum frutícola</i> , isolados do cajueiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolados da mangueira; (C) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolados do guaranazeiro	63
Figura 23: Pré-seleção de bactérias endofíticas de <i>Himatanthus sucuuba</i> como potenciais antagonistas a <i>Colletotrichum</i> spp.	63
Figura 24: Teste de pareamento de culturas de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sucuuba</i> (Hospedeira 1) frente ao (A) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado do guaranazeiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado de mangueira; (C) <i>Colletotrichum frutícola</i> , isolado de cajueiro	65
Figura 25: Teste de pareamento de culturas de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sucuuba</i> Hospedeira 2 frente ao (A) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado do guaranazeiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado da mangueira; (C) <i>Colletotrichum frutícola</i> , isolado do cajueiro.....	66
Figura 26: Teste de pareamento de culturas de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sucuuba</i> Hospedeira 3 frente ao (A) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado do guaranazeiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado da mangueira; (C) <i>Colletotrichum frutícola</i> , isolado do cajueiro.....	67
Figura 27: Teste de pareamento de culturas de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sucuuba</i> da região do pecíolo frente ao (A) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado do guaranazeiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado da mangueira; (C) <i>Colletotrichum frutícola</i> , isolado do cajueiro.....	68
Figura 28: Teste de termoestabilidade de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sucuuba</i> Hospedeira 1 frente ao (A) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado do guaranazeiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado da mangueira; (C) <i>Colletotrichum frutícola</i> , isolado do cajueiro.....	72
Figura 29: Teste de termoestabilidade de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sucuuba</i> Hospedeira 2 frente ao (A) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado do guaranazeiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado da mangueira; (C) <i>Colletotrichum frutícola</i> , isolado do cajueiro.....	73
Figura 30: Teste de termoestabilidade de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sucuuba</i> Hospedeira 3 frente ao (A) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado do guaranazeiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado da mangueira; (C) <i>Colletotrichum frutícola</i> , isolado do cajueiro.....	74
Figura 31: Bactérias endofíticas de <i>Himatanthus sucuuba</i> que estimularam o crescimento micelial dos fitopatógenos (A) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado do guaranazeiro; (B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado da mangueira; (C) <i>Colletotrichum frutícola</i> , isolado do cajueiro	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fitopatógenos das três culturas frutíferas utilizadas nos testes de antagonismo <i>in vitro</i>	40
Tabela 2: Taxa de colonização de bactérias endofíticas em diferentes tecidos de <i>Himatanthus sukuuba</i>	47
Tabela 3: Taxa de colonização da copa das árvores por bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sukuuba</i>	47
Tabela 4: Taxa de colonização da folha por bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sukuuba</i>	48
Tabela 5: Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação de sequências do gene 16S rDNA de bactérias isoladas de <i>Himatanthus sukuuba</i> com as sequências depositadas no Banco de dados do <i>GenBank</i> [®] , utilizando a ferramenta BLASTn.....	49
Tabela 6: Caracterização morfológica de bactérias endofíticas isoladas de <i>Himatanthus sukuuba</i>	52
Tabela 7: Produção de ácido indol-3-acético (AIA) obtido em meio de cultura com inoculação de bactérias endofíticas, isoladas de <i>Himatanthus sukuuba</i>	58
Tabela 8: Índice de solubilização de fosfato (ISF) dos isolados que apresentaram médio ISF, segundo Marra et al. (2012).....	60
Tabela 9: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos <i>Colletotrichum</i> spp. por bactérias endofíticas isoladas das folhas da Hospedeira 1 (<i>Himatanthus sukuuba</i>), em testes de antagonismo <i>in vitro</i>	65
Tabela 10: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos <i>Colletotrichum</i> spp. por bactérias endofíticas das folhas Hospedeira 2 (<i>Himatanthus sukuuba</i>), em testes de antagonismo <i>in vitro</i>	66
Tabela 11: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos <i>Colletotrichum</i> spp. por bactérias endofíticas das folhas Hospedeira 3 (<i>Himatanthus sukuuba</i>), em testes de antagonismo <i>in vitro</i>	67
Tabela 12: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos <i>Colletotrichum</i> spp. por bactérias endofíticas do pecíolo (<i>Himatanthus sukuuba</i>), em testes de antagonismo <i>in vitro</i>	68
Tabela 13: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos <i>Colletotrichum</i> spp. por bactérias endofíticas da casca (<i>Himatanthus sukuuba</i>), em testes de antagonismo <i>in vitro</i>	69
Tabela 14: Inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. por bactérias endofíticas da Hospedeira 1 (<i>Himatanthus sukuuba</i>) em teste de termoestabilidade ...	71
Tabela 15: Inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. por bactérias endofíticas da Hospedeira 2 de (<i>Himatanthus sukuuba</i>) em teste de termoestabilidade	72
Tabela 16: Inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. por bactérias endofíticas da Hospedeira 3 de (<i>Himatanthus sukuuba</i>) em teste de termoestabilidade	73

Tabela 17: Inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. por bactérias endofíticas da casca (<i>Himatanthus sucuuba</i>) em teste de termoestabilidade	74
Tabela 18: Bactérias endofíticas de <i>Himatanthus sucuuba</i> que estimularam o crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. através do teste de termoestabilidade	75

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	FAMÍLIA APOCYNACEAE	16
2.1.1	Gênero <i>Himatanthus</i>	17
2.1.2	<i>Himatanthus sucuuba</i>	17
2.2	COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA ASSOCIADA ÀS PLANTAS	18
2.3	APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS	20
2.4	PRODUÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL	21
2.4.1	Bactérias fixadoras de nitrogênio.....	21
2.4.2	Solubilização de fosfato inorgânico	22
2.4.3	Produção de fitormônios	23
2.5	CONTROLE BIOLÓGICO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	24
2.6	ANTRACNOSE	26
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	MATERIAL VEGETAL	29
4.2	ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICOS	30
4.2.1	Descontaminação do material vegetal	30
4.2.2	Inoculação do material vegetal.....	31
4.2.2.1	Folhas	31
4.2.2.2	Pecíolos.....	31
4.2.2.3	Fragmentos do Tronco	31
4.2.3	Armazenamento das bactérias endofíticas.....	33
4.2.4	Taxa de colonização	33
4.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS	33
4.3.1	Reativação dos isolados	33
4.3.2	Coloração de Gram	33

4.3.3	Confirmação da Coloração de Gram: Teste da reação do KOH (hidróxido de potássio).....	33
4.3.4	Teste em meio OF (Oxidação/Fermentação).....	35
4.3.5	Teste de catalase	36
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL POR ISOLADOS DE <i>Himatanthus. succuba</i>	37
4.4.1	Fixação de nitrogênio <i>in vitro</i>	37
4.4.2	Solubilização de fosfato inorgânico	38
4.4.3	Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	39
4.5	POTENCIAL DE BIOCONTROLE POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE <i>Himatanthus succuba</i>	40
4.5.1	Ensaio de antagonismo com isolados bacterianos.....	41
4.5.1.1	Seleção em Massa	41
4.5.1.2	Cultura pareada	41
4.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E TERMOESTABILIDADE DE METABÓLITOS PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS.....	42
4.7	TAXA DE INIBIÇÃO	43
4.8	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	43
4.8.1	Extração de DNA bacteriano.....	43
4.8.2	Quantificação do DNA extraído	44
4.8.3	Amplificação do 16S rDNA	44
4.8.4	Purificação do produto da PCR	45
4.8.5	Identificação dos isolados	45
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE <i>Himatanthus succuba</i>	47
5.2	COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA.....	48
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	51
5.4	SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL	53
5.4.1	Potencial de fixação de nitrogênio.....	53

5.4.2	Produção de AIA	56
5.4.3	Solubilização de fosfato	59
5.5	SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS POTENCIAIS	61
5.5.1	Seleção massal.....	61
5.5.2	Cultura pareada	64
5.5.3	Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos pelos isolados endofíticos	70
6.	CONCLUSÃO.....	78
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

A diversidade total de espécies amazônicas e suas propriedades biomedicinais a elas associadas, muito pouco é conhecido. Possivelmente há inúmeras espécies de plantas, animais e micro-organismos ainda por serem descobertas.

Hoje os micro-organismos associados às plantas tem ganhado destaque, principalmente os endófitos que são aqueles que habitam o interior de plantas sem causar prejuízos aparentes aos seus hospedeiros, podendo desempenhar funções importantes no processo de adaptação da planta, e produzir uma infinidade de metabólitos, tanto primários quanto secundários, além de serem potencialmente úteis na agricultura e na indústria, sobretudo na farmacêutica e de defensivos agrícolas.

Diversos estudos também têm demonstrado que os endófitos apresentam estreita relação com suas plantas hospedeiras e tem sido muito eficiente na aquisição de nutrientes, seja pela fixação de nitrogênio, pela solubilização de fosfatos insolúveis, na produção de fitormônios e inibindo micro-organismos fitopatogênicos, já que a supressão e a prevenção de organismos fitopatogênicos via produção de efeitos antagonistas são considerados mecanismos de ação indireta do crescimento das plantas favorecendo, contudo a preservação do meio ambiente e sustentabilidade.

Dentre as espécies amazônicas, destaca-se *Himathantus sucuuba*, ou sucuba como é conhecida popularmente, que tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores devido a produção de látex, que possui ação anti-inflamatória e analgésica, efeito cicatrizante e atividade antibacteriana, além de seus compostos químicos previamente isolados, que comprovaram atividade contra o carcinoma nasofaringe.

Existem alguns trabalhos na literatura relacionados com a potencialidade dos compostos químicos extraídos do látex de *H. sucuuba*, entretanto trabalhos envolvendo a microbiota endofítica existente nesta planta ainda são incipientes ou inexistentes. Dessa forma, há necessidade de investigar a microbiota endofítica de *H. sucuuba*, uma vez que existem relatos na literatura de que micro-organismos endofíticos podem gerar os mesmos compostos produzidos pela planta hospedeira, havendo a possibilidade de descobrir novos compostos de interesse comercial, além dos já produzidos pela própria planta.

A Amazônia possui a mais rica variedade de espécies vegetais e animais do mundo e, com a tendência mundial para revalorização dos produtos de origem natural, que

substituam os sintéticos, ela representa um foco de manejo equilibrado da biodiversidade, permitindo um desenvolvimento sustentável para a região.

Portanto, o presente trabalho visou isolar bactérias endofíticas de *H. sucuuba* coletadas na cidade de Manaus-AM, avaliar a capacidade de fixação biológica de N₂, produção de AIA *in vitro* e solubilização de fosfato inorgânico, além de verificar atividade antagônica dos isolados a *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA APOCYNACEAE

Segundo revisão taxonômica vigente considerando informações morfológicas e moleculares, entre as famílias Apocynaceae e Asclepiadaceae, Endress e Bruyns (2000), corroboraram com a união das duas famílias e sugeriram a divisão da família em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae. Sendo que a subfamília Rauvolfioideae está dividida em nove tribos: Alstonieae, Alyxieae, Carisseae, Hunterieae, Melodineae, Plumerieae, Tabernaemontaneae, Vinceae e Willughbeieae.

Plantas da família Apocynaceae estão incluídas filogeneticamente na ordem Gentiales e subclasse Asteridae, sendo consideradas como espécies de dicotiledôneas bem evoluídas e são caracterizadas normalmente pela presença de látex. Essa família contém aproximadamente 5.100 espécies distribuídas em 450 gêneros, sendo encontradas predominantemente nos trópicos e subtropicais e são menos frequentes em regiões temperadas. Na flora brasileira são catalogadas como Apocynaceae mais de 400 espécies distribuídas em 41 gêneros, sendo 32 deles encontrados apenas na Amazônia (PEREIRA et al., 2007).

Essa família pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos com utilidade terapêutica na medicina moderna. Os gêneros mais importantes dessa família são *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Vinca*, *Tabernaemontana*, *Mandevilla*, *Hancornia*, *Nerium*, *Strophantus*, *Catharanthus*, *Allamanda*, *Thevetia*, *Wrightia*, *Plumeria*, *Himatanthus* e *Rauvolfia* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Os gêneros *Himatanthus* e *Rauvolfia* pertencem à subfamília Rauvolfioideae. Esta subfamília caracteriza-se por apresentar entre seus representantes árvores, arbustos, lianas lenhosas e vinhas, raramente ervas. O látex geralmente é leitoso, as folhas são opostas, espiraladas ou alternas. O ovário é sincárpico ou apocárpico; os frutos são deiscentes ou indeiscentes. Do ponto de vista químico, alcalóides indólicos geralmente estão presentes e em maior proporção, iridoídeos glicosilados e cardenolídeos são também encontrados (ENDRESS; BRUYNS, 2000).

2.1.1 Gênero *Himatanthus*

O gênero *Himatanthus* foi descrito por Willdenow e é composto por espécies nativas da América do Sul. As espécies descritas estão dispersas na zona tropical desde a latitude 10° N até o trópico de Capricórnio. Existem 13 espécies descritas para esse gênero, sendo elas: *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, *Himatanthus attenuatus* (Benth.) Woodson, *Himatanthus bracteatus* (A. DC.) Woodson, *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, *Himatanthus fallax* (Mull. Arg.) Plumel, *Himatanthus lancifolius* (Mull. Arg.) Woodson, *Himatanthus abovatus* (Mull. Arg.) Woodson, *Himatanthus plagedaenicus* (Mart.) Woodson, *Himatanthus semilunatus* Margr, *Himatanthus speciosus* (Mull. Arg.) Plumel, *Himatanthus stenophyllus* Plumel, *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson, e *Himatanthus tarapotensis* (K. Schum.) Plumel (PLUMEL, 1991).

A maioria das espécies desse gênero ocorre na região Amazônica, com as demais espécies distribuídas fora da região Amazônica (extra-Amazônica) na Costa e no Centro-Oeste do Brasil. As espécies *H. drasticus* e *H. bracteatus* apresentam distribuição restrita ao Brasil, ocupando respectivamente áreas do cerrado, campo rupestre, caatinga e de mata atlântica (SPINA, 2004).

2.1.2 *Himatanthus sucuuba*

É uma planta conhecida na região Norte do Brasil como sucuuba, janaguba ou sucuba (Figura 1) (SILVA et al., 1998). É uma espécie latescente, de tronco ereto e casca rugosa. Possui folhas glabras, coriáceas e de margens inteiras; as inflorescências estão dispostas em cimeiras terminais com poucas flores, grandes e brancas e os frutos são geminados em forma de duplo folículo contendo sementes aladas. Na medicina popular, o látex e as folhas são utilizados como antitumoral, antifúngico, antianêmico, vermífugo e no tratamento de gastrites e artrites (FERNANDES et al., 2000; DI STASI; HIRUMALIMA, 2002). A infusão feita a partir da casca do caule tem sido usada para tratamento de tumores, furúnculos, edemas, artrites e ainda como vermífugo e laxativo (FERNANDES et al., 2000).

Os compostos químicos mais isolados dessa planta são iridóides, encontrados no caule e no látex, como fluvoplumierina, plumericina que apresentou atividade contra o carcinoma nasofaringe epidermóide humano (PERDUE; BLOMSTER, 1978),

isoplumericina, acetato de lupeol, cinamato α -amirina, e cinamato de lupeol (SILVA et al., 1998; WOOD et al., 2001), ao qual foram evidenciadas as atividades anti-inflamatória e analgésica (MIRANDA et al., 2000).



Figura 1. *Himatanthus sucuuba*

2.2 COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA ASSOCIADA ÀS PLANTAS

Endofíticos (do grego, “*endon*”, dentro; “*phyton*”, planta) são micro-organismos que passam parte ou toda a vida colonizando tecidos vegetais (SCHULZ; BOYLE, 2005; HARDOIM et al., 2015). Segundo Bacon e Hinton (2014), eles colonizam o tecido vegetal, formando associações mutualísticas de longo prazo, sem apresentar nenhum dano evidente ao hospedeiro. De modo a manter essa relação simbiótica estável, endofíticos sintetizam vários compostos que promovem o crescimento das plantas e as auxiliam a melhor se adaptarem ao ambiente (NAIR; PADMAVATHY, 2014).

Há aproximadamente 300.000 espécies de plantas no planeta, e todas, sem exceção, são hospedeiras de um ou mais endófitos, estando presentes ao longo de toda a estrutura do vegetal e em diferentes níveis populacionais (STROBEL, 2004; STEPNIIEWSKA; KUZNIAR, 2013).

Bactérias interagem com plantas de quatro maneiras: como patógenos, simbiontes, epifíticos ou endofíticos. Desses quatro tipos de interação bactéria-planta, a interação como endofíticas é a menos compreendida (INIGUEZ et al., 2005).

Bactérias endofíticas podem ser classificadas como aquelas que, na maior parte dos seus ciclos de vida, habitam o interior dos tecidos de plantas, sem causar sinais de patologia. Consequentemente as verdadeiras endofíticas são aquelas que, quando isoladas do interior de tecidos vegetais e, novamente em contato com a planta, são capazes de recolonizá-la (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998).

Determinados pontos do interior da planta proporcionam um ambiente adequado para o desenvolvimento de bactérias endofíticas. Espaços intercelulares na região epidérmica e cortical além de células lisadas de plantas são os principais sítios de colonização. Mesmo colonizando sistematicamente a planta, bactérias endofíticas apresentam preferência de colonização por certos tecidos. A colonização por esses micro-organismos é também determinada por fatores ambientais como a temperatura e a umidade, que influenciam na sobrevivência das bactérias (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011).

Segundo Kuklinsky-Sobral et al. (2004), a densidade e diversidade de bactérias endofíticas em soja variaram de acordo com o tecido, fase de desenvolvimento da planta, mudanças sazonais e genótipo do hospedeiro, onde a densidade bacteriana observada foi maior na raiz e menor nas folhas. Elas podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre outros micro-organismos presentes no interior das plantas (ANDREOTE et al., 2004).

Bactérias endofíticas também são responsáveis pela geração de compostos com função de auxinas, impulsionando a produção, germinação de sementes, desenvolvimento apical, metabólitos secundários, moléculas que ativam a resposta do sistema de estresse na planta hospedeira e acarreta em uma maior resistência a invasão por fitopatógenos. Dentre algumas das funções valiosas dessas bactérias está a remoção de contaminantes, solubilização de fosfato, assimilação de nitrogênio e fornecimento de vitaminas essenciais e outros micronutrientes para o vegetal. Alguns outros efeitos consequentes da colonização por esses micro-organismos também incluem o ajuste osmótico, regulação da função do estômato, alteração da morfologia das raízes, elevação da captação de minerais e modificações do acúmulo e metabolismo de nitrogênio (DUDEJA et al., 2012).

2.3 APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

Uma agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente e saúde, dentro do contexto econômico, social e político de cada região (MARIANO et al., 2004).

Bactérias promotoras do crescimento de plantas têm sido amplamente estudadas visando reduzir o impacto ambiental causado pelo uso de fertilizantes químicos, bem como aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção. A contribuição desses micro-organismos vai além de disponibilizar nutrientes e auxiliar na assimilação destes pelas plantas. De maneira geral estão envolvidos em mais de um mecanismo para promover o crescimento da planta, tais como produção de enzimas, bioativos, antibióticos e metabólitos. Sendo assim, a sua presença promove efeitos benéficos sobre a sanidade e o crescimento da planta, suprimindo a ação de fitopatógenos, por serem agentes potenciais para o controle biológico (BABALOLA, 2010; HAYAT et al., 2010).

Esses micro-organismos tem a capacidade de promover o crescimento vegetal pela alteração da arquitetura radicular por mecanismos diretos como a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios ou por mecanismos indiretos como, por exemplo, o antagonismo a fitopatógenos (FRANCHE et al., 2009; BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Um dos principais mecanismos de promoção do crescimento das plantas mediada por micro-organismos endofíticos é a produção de fitormônios por bactérias como *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, que produzem fitormônios como o ácido indol-3-acético, ácido indol-3-butírico, giberelinas, citocininas, octadecanóides, e compostos que imitam a ação dos jasmonatos (FORCHETT et al., 2007; KANG et al., 2009; PÉREZ-GARCÍA et al., 2011).

Estudos envolvendo micro-organismos endofíticos na promoção de crescimento de plantas no Brasil já foram desenvolvidos com milho (*Zea mays*) e fumo (*Nicotiana tabacum*) (VARMA et al., 1999), tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (BARRETTI et al., 2008) e abacaxizeiro (*Ananas comosus*) (BALDOTTO et al., 2010), e apresentaram respostas promissoras.

As pesquisas envolvendo bactérias no crescimento vegetal apontam para a necessidade de explorar comercialmente esses micro-organismos como biofertilizantes

ou bioinoculantes, devido aos seus benefícios: são mais seguros, mostram reduzidos danos ambientais e um risco potencialmente menor para a saúde humana, são eficazes em pequenas quantidades, ao se multiplicarem são controlados pela planta, se decompõem mais rapidamente do que os pesticidas químicos convencionais, o desenvolvimento de resistência é reduzido devido a vários mecanismos, e, podem ser também utilizados no manejo convencional de pragas ou em sistemas integrados de manejo (BERG, 2009; BABALOLA et al., 2010).

2.4 PRODUÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

2.4.1 Bactérias fixadoras de nitrogênio

Todos os organismos requerem nitrogênio para sintetizar biomoléculas, tais como proteínas e ácidos nucleicos. No entanto, a maior fonte de nitrogênio na natureza, o nitrogênio atmosférico, não é assimilável por grande parte dos seres vivos (CHUBATSU et al., 2012).

O fornecimento de N às plantas, nas formas absorvíveis, nítrica (NO_3^-) ou amoniacal (NH_4^+) provém da aplicação de fertilizantes químicos nitrogenados, obtidos industrialmente pelo processo de Haber-Bosh, e da fixação biológica do N atmosférico (FBN), realizada por procaríotos denominados diazotróficos (DALLA SANTA et al., 2004). Estes micro-organismos podem ser de vida livre, simbióticos ou associativos (DE SOUZA MOREIRA et al., 2010).

Dentre as alternativas para fixação biológica do nitrogênio encontra-se a exploração por micro-organismos endofíticos, que, segundo Balachandar et al. (2006), ao colonizarem raízes, caules e folhas das plantas, sofrem menos competição do que as bactérias presentes no solo e possivelmente excretam parte do nitrogênio por eles fixados diretamente na planta.

Vários endófitos que fixam nitrogênio em plantas já foram relatados, podendo-se citar os gêneros *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Methylobacterium* (DONATO et al., 2005; BALACHANDAR et al., 2006; GOVINDARAJAN et al., 2007).

A fixação biológica de nitrogênio por bactérias endofíticas é tida como importante mecanismo de ação, para o incremento da produção agrícola, uma vez que elas promovem

o crescimento de hospedeiros associados, pois o uso de adubos nitrogenados tem acarretado altos custos de produção, além de danos ao meio ambiente, pela lixiviação desses insumos aos lençóis freáticos, restando à fixação biológica do nitrogênio uma alternativa economicamente viável, vantajosa e menos impactante (GOVINDARAJAN et al., 2007; JADOSKI et al., 2010).

2.4.2 Solubilização de fosfato inorgânico

O fósforo (P) é um nutriente essencial às plantas, participando como componente estrutural dos ácidos nucleicos, fosfolipídeos, adenosina trifosfato (ATP), sendo um elemento chave de vias metabólicas e bioquímicas, e particularmente importante para a fixação biológica de nitrogênio - FBN (RICHARDSON; SIMPSON, 2011).

Depois do nitrogênio, o fósforo é o nutriente que mais limita a planta e sua deficiência restringe o rendimento da produção. Os solos tropicais e subtropicais são predominantemente ácidos e normalmente deficientes em fósforo, sendo necessárias altas dosagens de adubos fosfatados para a obtenção de alta produtividade. As adubações são realizadas principalmente com fosfatos solúveis em água, atingindo dosagens de P muito superiores às necessidades das culturas vegetais, pois a maior parte do P adicionado torna-se indisponível às plantas (WAKELIN et al., 2004; KHAN et al., 2007; BARROSO; NAHAS, 2008).

Organismos com habilidade de solubilizar fosfato representam uma alternativa economicamente viável, pois o sistema microbiano é capaz de disponibilizar grandes quantidades de nutrientes de reservas naturais e enriquecer o solo com os nutrientes mais importantes e escassos (KHAN et al., 2007; DIAS et al., 2009).

Assim como os micro-organismos de solo, muitos endófitos são conhecidos por promoverem o crescimento da planta através da conversão do fósforo insolúvel nas formas solúveis. *Bacillus pumilus* e *Acinetobacter calcoaceticus* são bactérias, conhecidamente endofíticas que auxiliam a planta hospedeira de diferentes formas, sendo uma delas a oferta de fósforo solúvel através de sua solubilização (DIAS et al.; KANG et al., 2009; PÉREZ-GARCÍA et al., 2011).

Outro mecanismo de disponibilização de fosfato é a solubilização de compostos fosfatados orgânicos ou mineralização de fósforo inorgânico que é caracterizada pela hidrólise de substratos orgânicos para liberação de íons ortofosfato (principalmente como

H₂PO₄⁻). A mineralização da maioria dos compostos fosfatados orgânicos é realizada pela liberação de enzimas, tais como fosfatases. Estudos relatam que a produção de fosfatases é influenciada pelos teores de fósforo no solo, sendo que a escassez de fósforo é estimulante para sua produção (GYANESHWAR et al., 2002; RICHARDSON; SIMPSON, 2011).

O principal mecanismo envolvido na solubilização de fósforo pelas bactérias é a produção e liberação de ácidos. Dentre eles, há destaque para os ácidos láctico, itacônico, isovalérico, isobutírico e acético (VAZQUEZ et al., 2000; DIAS et al., 2009).

Sendo assim, a inoculação de micro-organismos solubilizadores de fosfatos no solo tem sido sugerida como alternativa para se substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante melhor aproveitamento do nutriente (IGUAL et al., 2001; VESSEY, 2003).

2.4.3 Produção de fitormônios

Dentre os promotores de crescimento produzidos pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal - BPCV e que atuam no crescimento diferencial de plantas, destaca-se a produção de fitormônios, os quais contribuem nas taxas de respiração das raízes dos hospedeiros, metabolismo e abundância de raízes, além de melhorar a captação de água e minerais pelas plantas inoculadas (BABALOLA, 2010). Os principais fitormônios produzidos pelas BPCV são auxinas, giberelinas, etileno e citocininas (HAYAT et al., 2010; BERGER, et al., 2013).

Diversas espécies bacterianas produzem auxinas como parte de seu metabolismo, incluindo o ácido indol-3-acético (AIA) e o ácido índol-3-butírico (AIB), ou os seus precursores. No entanto, o AIA é a principal auxina de ocorrência natural e de maior relevância fisiológica (SPAEPEN et al., 2007; JHA; SARAF, 2012).

Sua função está relacionada à alongação celular, diferenciação de tecidos, promoção do desenvolvimento das plantas, pois este influencia o crescimento radicular e atua na resposta das plantas à luz e à gravidade (VESSEY, 2003; BALDANI; BALDANI, 2005; BABALOLA, 2010; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011).

Há evidências de várias rotas de biossíntese do AIA, mas a principal é a via dependente do aminoácido triptofano, usado como precursor fisiológico para síntese de auxinas em plantas e bactérias. A biossíntese do AIA Trp-dependente possui diversas

rotas, que são nomeadas de acordo com o seu intermediário: via ácido indol-3-piruvíco (AIP), via indol-3-acetamida (IAM), via triptamina, e a via indol-3-acetaldoxima (IAOx) (KHALID et al., 2004; BENEDUZI et al., 2008).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Azospirillum* sp. produtoras de AIA promovem alteração no crescimento e desenvolvimento de plantas de trigo (AKBARI et al., 2007; SPAEPEN et al., 2008) e de girassol (AMBROSINI et al., 2012) mostrando o grande potencial desse gênero na promoção do crescimento vegetal.

Outra bactéria bastante estudada é a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma bactéria endofítica isolada de cana-de-açúcar de grande importância para o crescimento desta cultura pelos benefícios derivados da FBN (SEVILLA et al., 2001).

Outros gêneros de bactérias tem se mostrado capazes de produzir fitormônios como *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; LEE et al., 2004). No entanto, a produção de fitormônios é um mecanismo de interação planta-bactéria, sendo o efeito dessa associação variável de acordo com o genótipo do hospedeiro e do próprio micro-organismo (DROGUE et al., 2012).

2.5 CONTROLE BIOLÓGICO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Muitos processos biológicos ocorrem no campo da fisiologia, bioquímica e microbiologia, que tem o potencial para dar as condições biotecnológicas no controle de doenças agrícolas (PINOTTI; SANTOS, 2013).

Embora os pesticidas químicos sejam usados com sucesso na agricultura, eles podem causar problemas de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, resíduos em alimentos, aumento da resistência em populações de patógenos e pragas, e seus efeitos sobre organismos não-alvo (AMORIM, et al., 2011).

Em todo o mundo há uma crescente preocupação com os problemas ambientais decorrentes das diversas atividades humanas, incluindo a agricultura (ANDRADE; NOGUEIRA, 2005). E isso se resulta na busca por tecnologias de produção rentáveis, socialmente justas e ecologicamente corretas (MELLO; SILVA, 2007). Para responder a esta demanda, a pesquisa científica tem avançado no desenvolvimento de soluções apoiadas em processos biológicos naturais (MARQUES et al., 2014).

O controle biológico se caracteriza como uma alternativa cada vez mais importante, uma vez que, na agricultura convencional, utilizado de forma complementar,

contribui para a redução do uso dos agrotóxicos, enquanto na agricultura orgânica, insere-se em substituição a estes produtos (PERES et al., 2007; BONFIM et al., 2010; BONETT et al., 2013).

A efetividade dos endófitos como agentes de controle biológico depende de muitos fatores tais como a especificidade da planta hospedeira, a dinâmica de população e padrão de colonização da planta, a habilidade para mover-se dentro dos tecidos da planta e a habilidade para induzir resistência sistêmica (MELNICK et al., 2008).

Os efeitos benéficos para as plantas hospedeiras incluem: impedimento de herbivoria, proteção contra nematóides e resistência contra patógenos de origem bacteriana e fúngica, podendo inibir diretamente a infecção e proliferação do patógeno dentro da planta hospedeira, ou indiretamente induzindo respostas de resistência intrínseca à planta (MEJÍA et al., 2008; ROHLFS; CHURCHILL, 2011).

Muitos endófitos, como *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans*, *A. lwoffii*, *Bacillus* sp., *Phomopsis* sp. e *Chaetomium globosum*, apresentam ação fungicida contra *Phytophthora capsici*, *Moniliophthora roreri*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *V. wilt* e *Sclerotium rolfsii*, pela produção de diversas enzimas que degradam a parede celular como proteases, celulasas e quitinases, ou pela produção de substâncias como sideróforos (MELNICK et al., 2008; SINGH et al., 2008; TROTEL-AZIZ et al., 2008; ZHAO et al., 2010; MELNICK et al., 2011; YU et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

Outra característica marcante desses micro-organismos consiste no fato de que muitos produzem esporos com alta tolerância a condições ambientais adversas, permitindo seu uso em formulações de biopesticidas para aplicação no campo com menor impacto ambiental, como é o caso do bionematicida registrado com o nome comercial de Bionem® WP que contém *Bacillus firmus* como agente biológico (CHOUDHARY; JOHRI, 2009; MENDOZA; SIKORA, 2009; ZHAO et al., 2010; MELNICK et al., 2011).

Dentro do controle biológico de doenças, o uso de micro-organismos endofíticos tem gerado bons resultados (ARAVIND et al., 2010; MELNICK et al., 2011). Benchimol et al. (2000) testaram o efeito de bactérias endofíticas isoladas de plântulas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) na redução da mortalidade causada por fusariose, enfermidade provocada pelo fungo *F. solani*, e detectaram que a espécie *Methylobacterium radiotolerans* controlou o patógeno, causando redução significativa do número de plantas mortas.

Segundo Souza et al. (2015), 113 isolados bacterianos endofíticos de plantas sadias de *Echinodorus scaber Rataj* (chapéu de couro) foram testadas quanto à sua potencialidade como agentes de biocontrole frente a cinco fitopatógenos pós-colheita de grãos de soja. O potencial inibitório das linhagens bacterianas testadas resultou na redução de aproximadamente 100% do crescimento dos cinco fitopatógenos, constituindo uma excelente ferramenta de controle biológico.

Endófitos de crescimento rápido têm grande potencial de serem utilizados no controle biológico, uma vez que são capazes de colonizar nichos específicos e inibir, por competição ou antibiose, o desenvolvimento dos fitopatógenos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

2.6 ANTRACNOSE

Devido à alta produtividade aliada ao manejo inadequado, tem-se elevado o número de doenças pós-colheita em diversas espécies frutíferas, como a antracnose que tem o agente causal *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc responsável por ocasionar infecções em diferentes partes da planta (SERRANO; CATTANEO, 2010).

No ano de 2012, esse gênero foi classificado como o oitavo grupo mais importante de fungos fitopatogênicos do mundo, baseado em perspectivas científicas de significância econômica (DEAN et al., 2012).

A antracnose é considerada cosmopolita sendo encontrada em citrus, mamão, morango, guaraná, banana, goiaba, maracujá, ameixa, entre outros. Ataca todos os órgãos da parte aérea, causando apodrecimento (nas folhas, frutos e órgãos reprodutivos) ou crestamento (folhas e ramos) (FISHER et al., 2005; BULHÕES, 2012).

O sintoma típico da doença é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (BAILEY et al., 1992), podendo ocorrer uma podridão-mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (LIMA FILHO et al., 2003). A doença se desenvolve principalmente em clima quente e úmido, podendo, sob tais condições, acarretar prejuízos de até 100% (LOPES; ÁVILA, 2003).

Na Amazônia, espécies do gênero *Anacardium* possuem ampla distribuição como *Anacardium giganteum*, *Anacardium spruceanum*, *Anacardium amapaense*, *Anacardium parvifolium* e *Anacardium tenuifolium*. A antracnose que acomete o cajueiro é a mais

importante, pois ocorre em qualquer desenvolvimento da planta e é bastante severa em épocas mais úmidas. O agente dessa enfermidade é o *C. gloeosporioides* que produz lesões em partes jovens de cajueiro adulto ou em fase de muda (SILVA et al., 2010).

Muitos são os problemas encontrados na cadeia produtiva da mangueira, em muitos casos, limitantes à sua exploração comercial tendo em vista as perdas qualitativas e quantitativas produzidas nesta cultura. Um dos mais importantes é o ataque de microorganismos fitopatógenos. Entre os fitopatógenos que atacam a cultura, destaca-se o fungo *C. gloeosporioides*, anamorfo de *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk. (CHITARRA; CHITARRA, 1990; PLOETZ, 1994; CUNHA et al., 2000), responsável pela redução na qualidade dos frutos produzidos neste cultivo.

A produção de guaraná no Brasil, principalmente no Estado do Amazonas, tem sido afetada drasticamente pela antracnose, causada pelo fungo *C. guaranicola* Albuquerque (BENTES; BARRETO, 2004). O *Colletotrichum* é encontrado tanto em guaranazeiros (*Paullinia cupana* Kunth) doentes, quanto sadios. Isso poderia indicar que existem fungos do gênero que não são danosos à planta, ou então que a doença só ocorreria se houvessem condições favoráveis para sua manifestação (COSTA NETO, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar bactérias endofíticas isoladas de *H. succuba*, com potencial de uso como agentes de biocontrole *in vitro*, frente ao *Colletotrichum* spp. e a atividade promotora de crescimento vegetal dos isolados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar bactérias endofíticas de *H. succuba*;

Avaliar *in vitro* a capacidade de solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio atmosférico e produção do fitohormônio AIA como indicativo de atividade promotora de crescimento vegetal;

Selecionar bactérias endofíticas com atividade antagônica a *Colletotrichum* spp.;

Sequenciar o DNA codificante do gene 16S rRNA dos isolados, para identificação em nível de gênero.

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

A coleta do material vegetal de *H. sucuuba* foram realizadas em três terrenos situados na Estrada do Brasileirinho, em área de capoeira, situados no Km 12, ramal do 12, Manaus-Amazonas.

Foram selecionadas três plantas que apresentassem folhas com aspecto jovem e sadio; de onde foram retiradas de uma amostra 18 folhas, sendo seis referentes a uma planta de cada terreno.

Foram amostradas as regiões: copa da árvore (duas folhas do dossel superior, duas da região mediana e duas da região inferior) (Figura 2), dos respectivos pecíolos e de fragmentos do tronco provenientes de cada hospedeira.

O material selecionado foi colocado em sacolas de papel, devidamente identificadas e transportadas ao Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas para fins de isolamento dos endófitos.

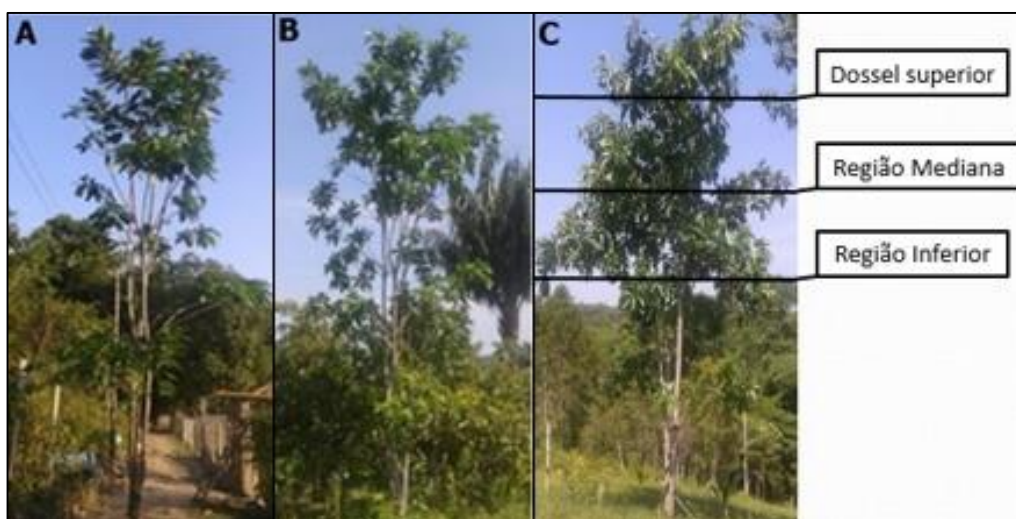


Figura 2: *Himatanthus sucuuba*: (A) Hospedeira 1; (B) Hospedeira 2; (C) Hospedeira 3 e regiões da copa da árvore destacando de onde as folhas foram coletadas para isolamento de endófitos

4.2 ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICOS

4.2.1 Descontaminação do material vegetal

Os materiais vegetais foram lavados delicadamente com detergente comum e com o auxílio de uma esponja macia. Em seguida, foram enxaguados em água corrente, até que fosse retirado todo excesso do detergente.

O material vegetal foi submetido ao seguinte tratamento:

- Imersão durante 60 segundos em álcool 70%;
- Imersão em hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos;
- Imersão em álcool 70% por 30 segundos, para retirada do excesso de hipoclorito;
- Imersão em água destilada durante 2 minutos;
- Repetir a lavagem com água destilada (Figura 3).

Uma alíquota de 100 μ L de água destilada proveniente da última lavagem foi plaqueado em meio Ágar Nutriente – NA, por semeadura em superfície, como controle da assepsia (PEREIRA, 1993).

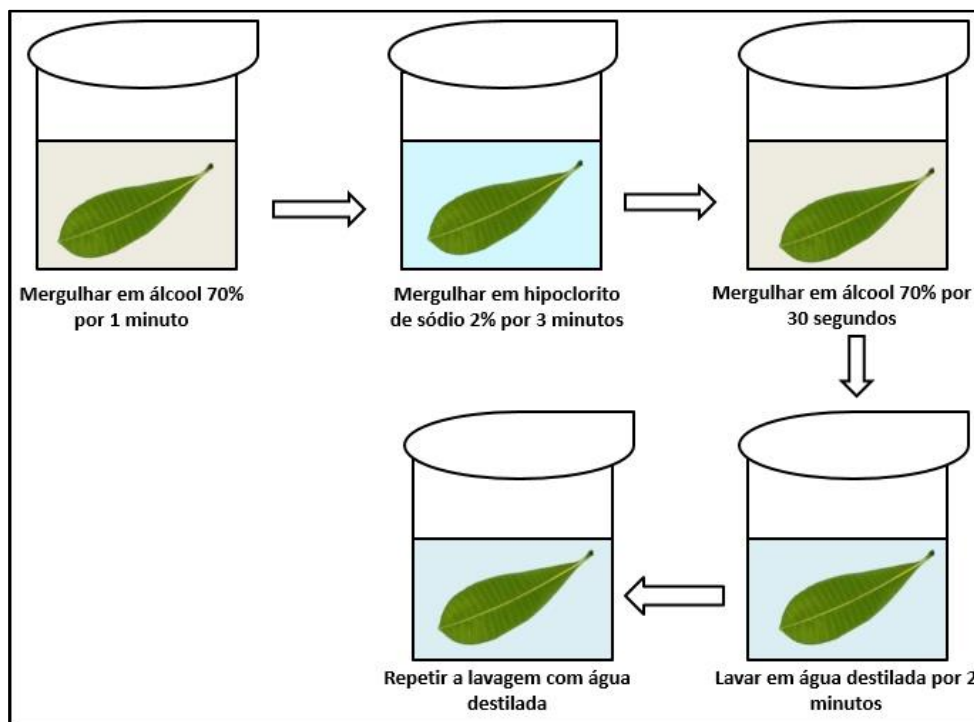


Figura 3: Descontaminação superficial do material vegetal de *Himatanthus. sucuba* para isolamento de micro-organismos endofíticos

4.2.2 Inoculação do material vegetal

Após a desinfestação superficial, o material foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente, pH 6,8, acrescidos de carbendazim 0,1% (50 mg mL⁻¹) para inibir o crescimento fúngico. Os fragmentos vegetais foram inoculados em duplicata à temperatura de 30 °C por 48 horas.

4.2.2.1 Folhas

Das seis folhas investigadas, de cada árvore, cinco fragmentos medindo 5 mm, em duplicata, foram inoculados no Ágar Nutriente em placas de Petri (Figura 4), totalizando 36 placas por planta com 180 fragmentos. Os fragmentos foram dispostos em ordem seriada conforme a Figura 5.

4.2.2.2 Pecíolos

Cada árvore foi representada por três pecíolos, um retirado da folha do dossel superior, outro da parte mediana, e o terceiro retirado da folha localizada na parte inferior do dossel. No Ágar Nutriente foram inoculados cinco fragmentos (5 mm) de cada pecíolo, em duplicata.

4.2.2.3 Fragmentos do Tronco

Os fragmentos do tronco foram coletados e desinfestados superficialmente, cortados em fragmentos de 5 mm e inoculados no Ágar Nutriente em placas de Petri. Do tronco foram retiradas três partes de cada árvore, com distância de um metro do solo, e destes, cinco fragmentos foram inoculados no Ágar Nutriente, em duplicata.

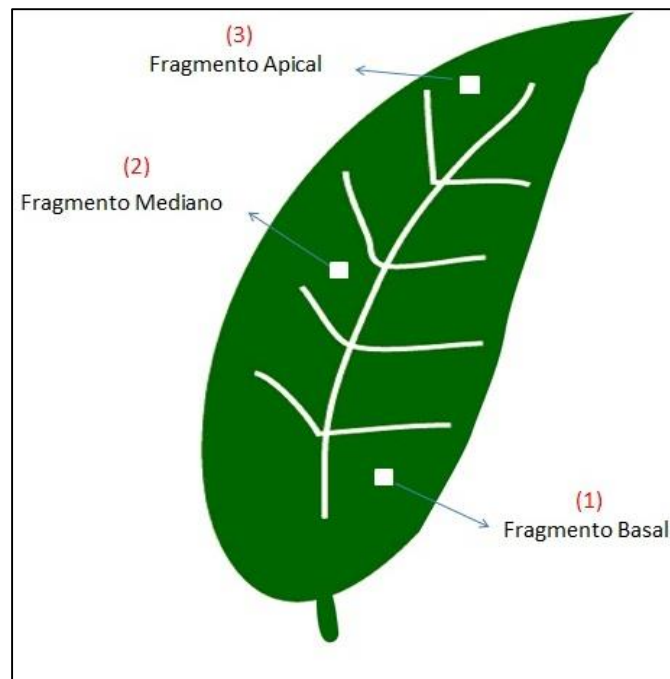


Figura 4: Folha de *Himatanthus sucuuba*: fragmentos utilizados para isolamento de bactérias endofíticas

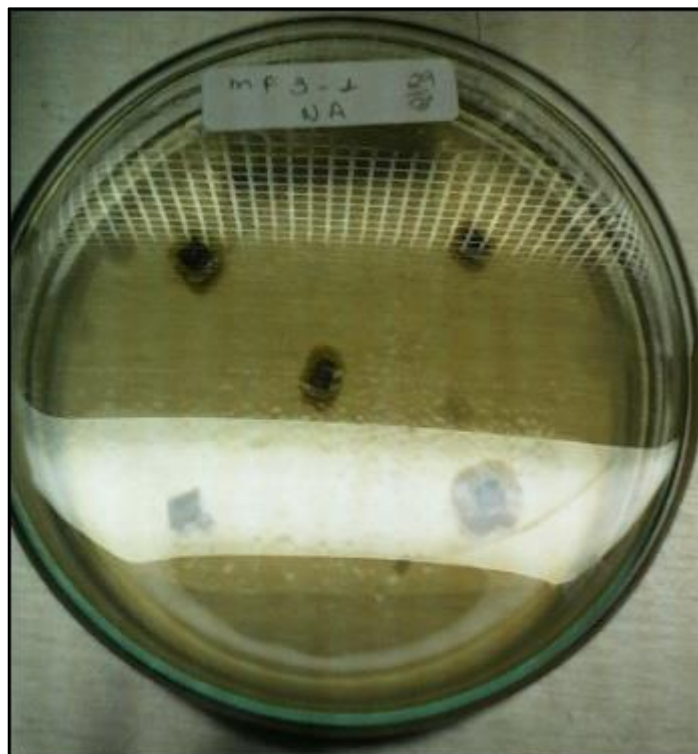


Figura 5: Disposição dos fragmentos de *Himatanthus sucuuba*, em placas de Petri com Ágar Nutriente

4.2.3 Armazenamento das bactérias endofíticas

A purificação das colônias em ágar nutritivo foi realizada no início de seu crescimento, impedindo a contaminação por outros micro-organismos endofíticos. Posteriormente as bactérias foram transferidas para tubos com meio Luria Bertani (LB) líquido, e, após 24 horas, as colônias puras foram preservadas, em microtubos contendo glicerol 50% a 4 °C.

4.2.4 Taxa de colonização

A taxa de colonização para cada uma das três hospedeiras (para bactérias isoladas dos diferentes tecidos vegetais) foi determinada de acordo com a fórmula:

Fórmula:

$$TC = \frac{\text{Total de fragmentos colonizados}}{\text{Total de fragmentos inoculados}} \times 100$$

Sendo admitido 100% quando pelo menos uma bactéria for isolada de cada fragmento inoculado. Taxas menores que 100% indicaram que de alguns fragmentos vegetais não foi isolado bactéria.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS

4.3.1 Reativação dos isolados

As bactérias preservadas em glicerol a 50% foram reativadas em NA pela técnica de esgotamento, e posteriormente incubado a 30 ° C durante 48 horas.

4.3.2 Confirmação da Coloração de Gram: Teste da reação do KOH (hidróxido de potássio)

Além da coloração de Gram para verificação de características bacterianas também é utilizado o teste KOH para verificar a resistência à ação de lise provocada pelo contato com KOH (OLIVEIRA, 2000).

Esse teste de solubilidade foi realizado depositando uma gota de solução de KOH 3% em lâmina, e para essa gota uma porção das células bacterianas foi transferida (24-48 horas). Homogeneizado por cinco a dez segundos, com a própria alça de platina. Foi observado se ocorreu mudança na viscosidade do material levantando seguidas vezes a alça para evidenciar se há formação de um líquido viscoso. Este ensaio teve um delineamento inteiramente casualizado com três repetições cada. Se a célula for lisada, o DNA é liberado dando essa consistência, indicando a presença de uma bactéria Gram-negativa.

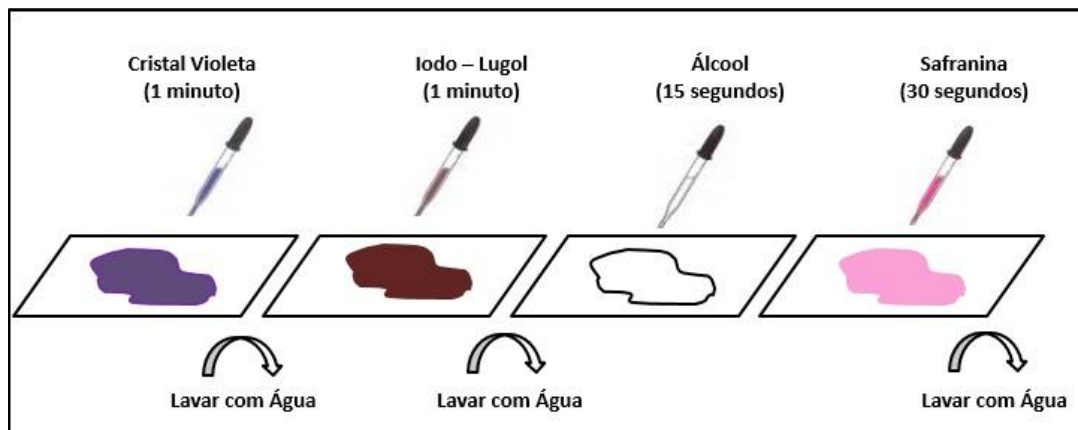
Bactérias Gram-positivas não formam o fio viscoso e são consideradas negativas no teste, pois sua parede é resistente à ação do reagente, assim não ocorre lise celular e seu material genético não é exposto ao KOH 3% (OLIVEIRA, 2000).

4.3.3 Coloração de Gram

Esta técnica permite a diferenciação de amostras bacterianas em Gram-positivas e Gram-negativas baseando-se na composição da parede bacteriana (TORTORA et al., 2012), favorecendo a identificação morfofisiológica.

Transferiu-se uma alçada de crescimento bacteriano com 24-48 horas. Na lâmina de microscopia foi feito o esfregaço com uma gota de água. Após rápida fixação pelo calor, os corantes foram aplicados no esfregaço, como descrito a seguir (Figura 6):

- Cobrir o esfregaço com solução cristal violeta por 1 minuto;
- Lavar com água corrente;
- Cobrir o esfregaço com o mordente (solução de Iodo-Lugol) por 1 minuto;
- Lavar novamente com água corrente;
- Lavar o esfregaço com etanol absoluto por 15 segundos;
- Cobrir com safranina por 30 segundos;
- Lavar com água corrente. Secar com papel-filtro e depois ao ar;
- Examinar com objetiva de imersão. Células Gram-positivas apresentam-se roxas e Gram-negativas, vermelhas.



Fonte: biomedicina.paratodos.blogspot.com

Figura 6: Procedimento de Coloração de Gram

4.3.4 Teste em meio OF (Oxidação/Fermentação)

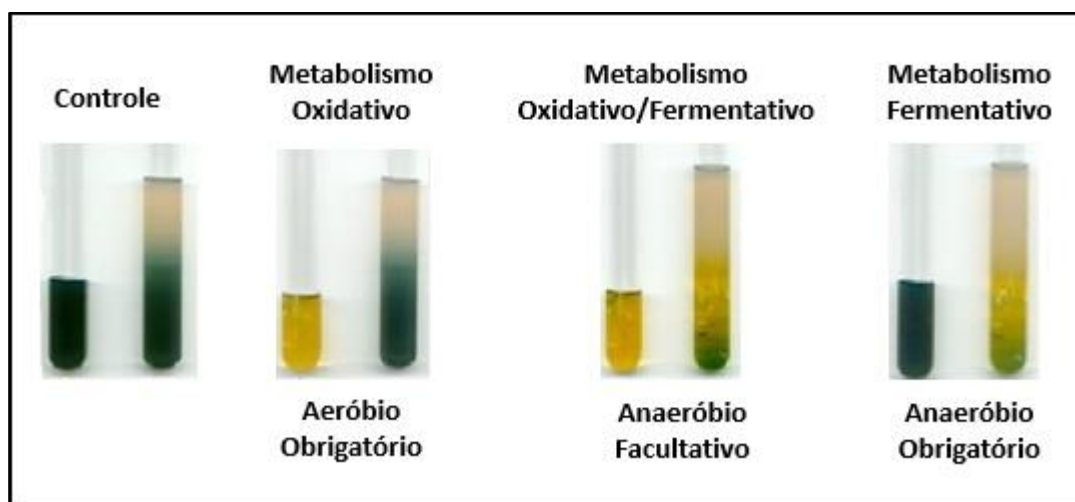
O teste de oxidação/fermentação da glicose (O/F) em meio Ágar Hugh e Leifson® (2,0 g peptona; 5,0 g NaCl; 0,30 g KH_2PO_4 ; 3,0 mL de azul de bromotimol; 3,0 g de ágar para um litro de água destilada e pH 7,0) permite determinar o uso da via oxidativa ou fermentativa da glicose. É considerado método simples e eficaz para identificação de bactérias que utilizam a glicose em presença ou na ausência de oxigênio, e baseia-se na produção de ácido quando a glicose é metabolizada (OLIVEIRA, 2000).

Para execução do teste, foi utilizado culturas bacterianas com crescimento de 48 horas. Com uma alça de platina devidamente flambada e fria, as células bacterianas foram inoculadas em dois tubos distintos com adição de 0,5 mL de glicose 10% esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose 0,22 μm .

Em um dos tubos foi adicionado uma camada de 1 mL de óleo mineral esterelizado, a fim de promover um ambiente de anaerobiose e testar a capacidade da bactéria em fermentar o açúcar na ausência de oxigênio. Após a inoculação, ambos os tubos foram incubados por 48 horas a 28 °C. Todos os procedimentos foram realizados com condições assépticas.

Para observação dos resultados foi considerado bactéria oxidativa aquela que, após decorrido o período de incubação no tubo que se encontrava sem óleo, e conseqüentemente em aerobiose, adquiriu coloração amarelada indicando oxidação da glicose e acidificação do meio. E ao mesmo tempo o tubo que conter o óleo, assim estando em anaerobiose, manter a coloração original. Foi considerado que houve fermentação da

glicose, e a bactéria então foi classificada como fermentativa, quando houve mudança da cor do tubo que continha óleo mineral, adquirindo coloração amarelada, e o tubo sem o óleo manteve sua coloração original. A bactéria foi considerada com metabolismo oxidativo/fermentativo quando ambos tubos, se tornaram amarelos (Figura 7). A não utilização do açúcar é considerada quando os dois tubos permanecem com suas cores inalteradas, e estas bactérias então foram consideradas não reativas ou incapazes de utilizar a glicose (OLIVEIRA, 2000; QUINN et al., 2005).



Fonte: pt. Slideshare.net

Figura 7: Reação do teste de fermentação/oxidação da glicose

4.3.5 Teste de catalase

A catalase é uma enzima intracelular, encontrada em grande parte dos micro-organismos, que tem a capacidade de decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. Excluindo o gênero *Streptococcus*, a maioria das bactérias aeróbias e as facultativas possuem essa enzima (FRANZOLIN, 2008). O teste tem por objetivo verificar se a bactéria em questão possui ou não a enzima catalase.

Com o auxílio de uma alça de platina foram coletadas colônias isoladas de culturas bacterianas e colocadas em lâminas de microscopia contendo solução aquosa de peróxido de hidrogênio 3%, o resultado foi considerado positivo ao ser imediatamente observada a formação de bolhas, que caracterizam o resultado positivo para esse teste (OLIVEIRA, 2000). Este ensaio teve um delineamento inteiramente casualizado com três repetições cada.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL POR ISOLADOS DE *Himatanthus sucuuba*

4.4.1 Fixação de nitrogênio *in vitro*

O potencial de fixação de nitrogênio dos isolados bacterianos em ensaio *in vitro*, foi avaliado através da sua capacidade de crescimento em meio NFb semi-sólido, que contém por litro: 5,0 g ácido málico; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g NaCl; 0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 2 mL de solução de micronutrientes (0,04 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1,20 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,40 g H_3BO_3 ; 1,0 g $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$; 1,175 g $MnSO_4 \cdot H_2O$; em um litro de solução) 2 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH); 1 mL de solução de vitaminas (10 mg biotina e 20 mg piridoxol-HCl; em 100 mL de solução); 4 mL de Fe-EDTA (solução a 4 M) e 4,5 g KOH. O pH foi ajustado para 6,8, e acrescido de 1,8 g de ágar, caracterizando o estado semi-sólido isento de nitrogênio (DOBEREINER et al., 1995). O crescimento bacteriano neste meio ocorre se o isolado fixar biologicamente o nitrogênio, já que tais bactérias necessitam deste nutriente, o que estimulará os mecanismos de fixação do N_2 atmosférico para suprir essa necessidade.

Cada isolado bacteriano foi inoculado por meio de alça de platina, a partir de culturas já crescidas em meio TSA 10%, e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura NFb semi-sólido, e incubadas a 28 °C por sete dias. A presença de uma película aerotóxica próxima da superfície do meio foi a indicativa da fixação de N_2 (Figura 8). A película aerotóxica é constituída de células bacterianas (KUSS et al., 2007). Os ensaios de fixação biológica de nitrogênio foram realizados em delineamento inteiramente casualizados, com três repetições para cada isolado bacteriano.

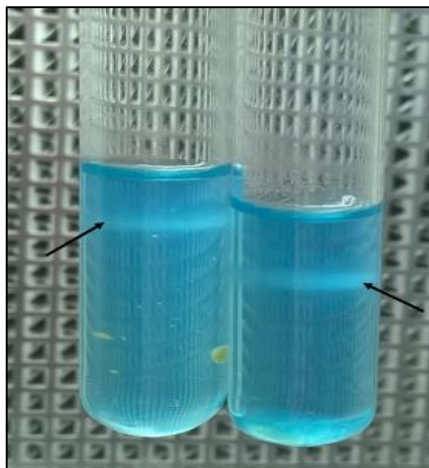


Figura 8: Película formada em meio de cultura livre de nitrogênio, indicando resultado positivo para o teste de fixação de nitrogênio

4.4.2 Solubilização de fosfato inorgânico

Para a solubilização de fosfato inorgânico, empregou-se o meio de cultura NBRIP contendo por litro: 10 g de glicose; 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$; 5 g de $Ca_3(PO_4)_2$ e 15 g de ágar. O pH foi ajustado para 7,0, metodologia proposta por Nautiyal (1999). Essa metodologia considera que a solubilização de fosfato inorgânico é determinada pela formação de halo claro ao redor das colônias.

Para avaliação da capacidade solubilizadora, as bactérias foram cultivadas em meio LB líquido por 24 horas. Após, a densidade ótica (DO) foi ajustada pela leitura da absorvância no comprimento de onda (λ) 580 nm, com transmitância de 45%, que equivalente a escala nº 2 de McFarland com aproximadamente 6×10^8 de células bacterianas.

O resultado positivo foi considerando a formação de halo claro devido a solubilização de fosfato de cálcio. O diâmetro do halo de solubilização e da colônia bacteriana foram mensurados por meio do uso do paquímetro. A eficiência de solubilização foi estabelecida de acordo com a escala proposta por Marra et al. (2012), índices menores que 2,0 cm foram considerados baixos solubilizadores, entre 2,0 e 4,0 cm médio, e maiores que 4,0 cm altos solubilizadores.

Como inóculo foi utilizado 10 μ L da suspensão bacteriana em três pontos equidistantes na placa, incubadas a 28 °C por 15 dias. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições em que cada parcela experimental foi formada pela média de valores das três inoculações por placa de Petri (Figura 9).

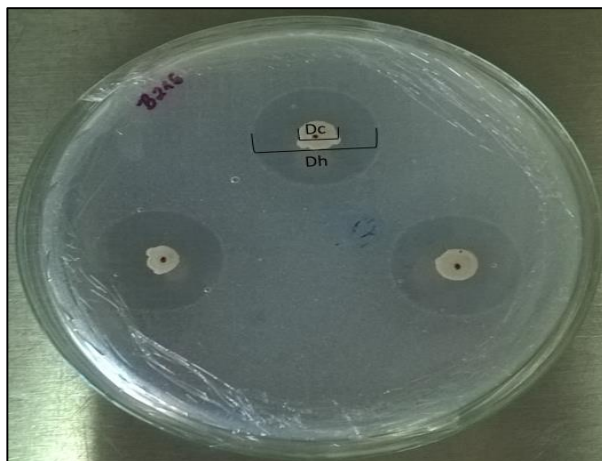


Figura 9: Diâmetro dos halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por linhagem bacteriana positiva, inoculada em triplicata

4.4.3 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

Para identificação de bactérias produtoras de ácido indol-3-acético (AIA) foi usada a rota dependente do aminoácido triptofano, segundo metodologia descrita por Bric et al. (1991) e Assumpção (2009).

Os isolados bacterianos foram inoculados em meio TSB 10% acrescido com 5 mM de L-triptofano e incubados a 28 °C sob agitação constante (160 rpm), durante 24 horas, na ausência de luz.

Após o crescimento, 2 mL de cada cultura foi homogeneizado e transferido para microtubos, centrifugados a 10.000 rpm durante dez minutos para obtenção do sobrenadante. Em seguida foi retirado uma alíquota de 500 μ L do sobrenadante e acrescentado em 500 μ L do reagente de Salkowski ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4$), incubados durante 30 minutos na ausência de luz para que ocorresse a reação calorimétrica.

A produção de AIA foi avaliada por meio da presença de coloração rosa nos microtubos. A quantificação foi realizada através das leituras das amostras pela

intensidade de cor, com auxílio do espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm (Biochrom Libra S60).

Determinou-se a concentração de AIA pela absorvância em espectrofotômetro, de meio de cultura esterilizado com concentrações conhecidas de AIA comercial (0, 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), que foi normalizada em curva padrão, gerando a equação da reta para determinar a concentração de AIA das amostras. Para determinar o teor de AIA em meio suplementado com L-triptofano, utilizou-se a equação $Y = 0,0013x + 0,3303$ ($R^2 = 99,16\%$), no qual “Y” é a concentração de AIA em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e “x” é a absorvância obtida durante as leituras no espectrofotômetro. Cada ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

4.5 POTENCIAL DE BIOCONTROLE POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *Himatanthus sucuuba*

Para avaliar a atividade antagônica dos isolados bacterianos contra o agente causal da antracnose, foi realizado o teste de paridade *in vitro*. Os fitopatógenos testados foram reativados da Coleção de micro-organismos do LPBOM, de três culturas diferentes: mangueira, cajueiro e guaranazeiro (Tabela 1).

Tabela 1: Fitopatógenos das três culturas frutíferas utilizadas nos testes de antagonismo *in vitro*

Cód. da Linhagem	Origem de Isolamento	Identificação	Nº de Acesso melhor similaridade
PGM10-1/1.1a	Guaranazeiro	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GQ395335.1
CP6-1/7	Cajueiro	<i>Colletotrichum fruticola</i>	IN009618.1
MP7-2/7	Mangueira	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ418203.1

Os fungos fitopatogênicos foram isolados de folhas com sintomas de antracnose. Os isolados da mangueira e do cajueiro foram provenientes de plantas do Campus da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, enquanto o isolado do guaranazeiro foi coletado em área de produção no município de Maués/AM. Foram reativados em meio BDA (200 g de batata, 15 g de dextrose, 15 g de ágar – pH 7,0) e incubados a temperatura de 28 °C durante sete dias.

4.5.1 Ensaio de antagonismo com isolados bacterianos

4.5.1.1 Seleção em Massa

Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa da capacidade inibitória dos isolados. Discos de 0,5 centímetros de diâmetro contendo colônias do fitopatógeno *Colletotrichum* spp., com sete dias de cultivo, foram inoculados no centro de placas de Petri contendo meio BDA. Dois dias após, foram repicados dois potenciais antagonistas e colocados a três centímetros de distância da cultura do fitopatógeno, incubados a 28 °C durante sete dias (Figura 10). Os controles consistiram do cultivo de disco de 0,5 cm de diâmetro com culturas dos fitopatógenos sem a presença do antagonista (SHIOMI, 2007).

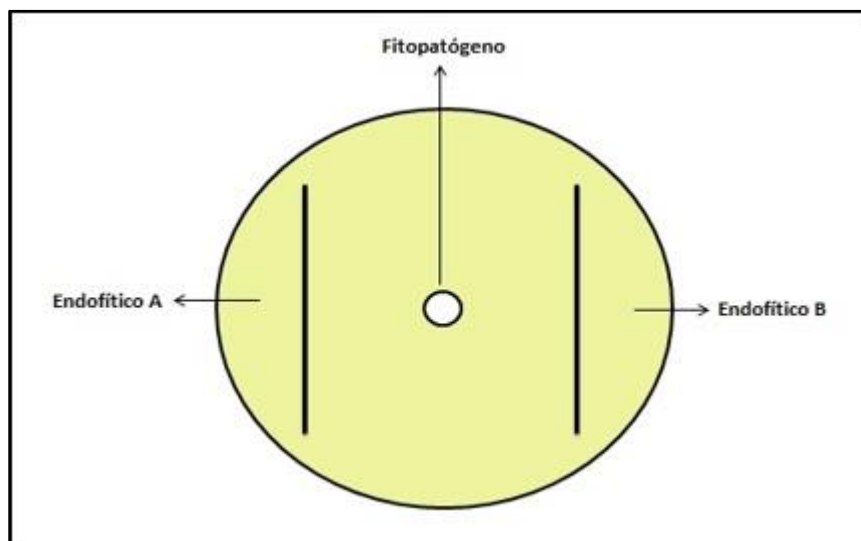


Figura 10: Modelo esquemático de pareamento de colônias

4.5.1.2 Cultura pareada

Para o teste de antagonismo com cultura pareada, foram utilizados discos de 0,5 cm de diâmetro da borda da colônia ativa dos fungos fitopatógenos com sete dias de crescimento, inoculados em meio BDA a 1 cm da borda, à temperatura de 28 °C. Dois dias após, num ponto equidistante da placa a 1 cm da borda, com auxílio de alça de platina foi feito um risco contendo o isolado endofítico (Figura 11). Os controles consistiram do cultivo a partir de disco de 0,5 cm de diâmetro com culturas dos fitopatógenos, incubados

a 28 °C durante sete dias. Os ensaios foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições (SHIOMI, 2007).

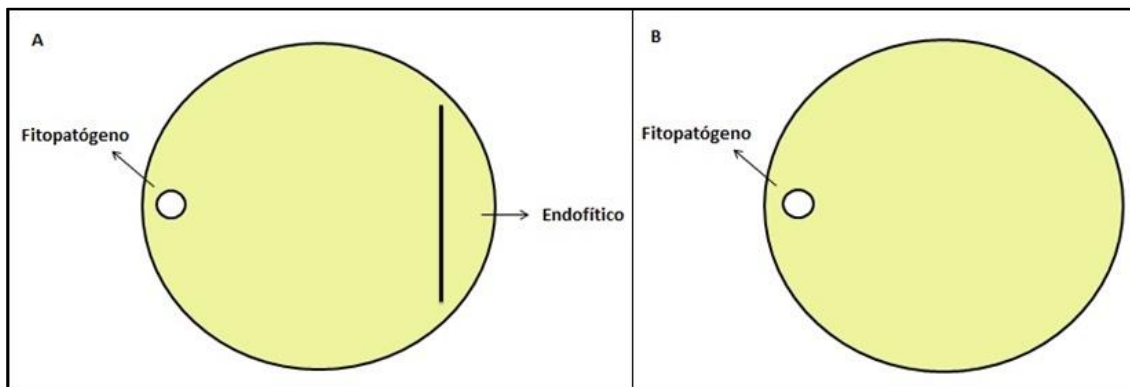


Figura 11: (A) Modelo esquemático com cultura pareada *in vitro*, utilizado para teste de antagonismo com bactérias endofíticas selecionadas; (B) Esquema do tratamento controle

4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E TERMOESTABILIDADE DE METABÓLITOS PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS

Para testar a produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos pelos isolados endofíticos que apresentaram atividade nos testes de antagonismo *in vitro*, colônias da bactéria foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido à base de batata-dextrose com pH 7,0. Após a incubação em condições ambiente de laboratório por cinco dias, sob agitação (150 rpm) em agitador mecânico, no escuro, amostras de 10 mL de cada caldo fermentado foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 90 mL de BDA, e posteriormente esterilizados em autoclave por 15 min, a 120 °C e 1 atm de pressão.

Após homogeneização da suspensão, procedeu-se a deposição de 20 mL em placas de Petri. Após a solidificação do meio, foi transferido para o centro de cada placa um disco de 5 mm de diâmetro, obtido da borda de colônias do fitopatógeno *Colletotrichum* spp., com sete dias de cultivo, proveniente das diferentes árvores hospedeiras.

As testemunhas foram constituídas de placas contendo os fitopatógenos nos meios de cultura, sem a presença de metabólitos, incubados a 28 °C por sete dias. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, cada placa de Petri constituída de uma unidade experimental (KUPPER, et al., 2009).

4.7 TAXA DE INIBIÇÃO

A taxa de inibição dos isolados foi determinada de acordo com a fórmula descrita por Idris et al. (2007).

Fórmula:

$$I. R (\%) = \frac{(Rc-Rx)}{Rc} \times 100, \text{ sendo:}$$

RC = raio da colônia do patógeno no tratamento controle

RX = raio da colônia do patógeno pareada com o isolado endofítico

4.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.8.1 Extração de DNA bacteriano

Os isolados bacterianos que apresentaram potencial biotecnológico no presente trabalho foram selecionados para identificação molecular. A extração foi feita segundo metodologia de Mota et al. (2009) modificado. Os isolados foram crescidos em meio NA e incubados a 30 °C por 24 horas. Com um palito estéril foi transferido uma porção da colônia para um microtubo plástico contendo 100 µL de tampão TRIS-EDTA-DEXTROSE, acrescido de 5 µL de lisozima, sendo este homogeneizado e incubado a 37 °C em banho seco durante 30 minutos.

Após, acrescentou-se ao microtubo 10 µL de SDS 10%, procedeu-se a incubação em banho seco a 50 °C por 20 minutos. Foram adicionados 90 µL de acetato de potássio e agitado vigorosamente, em seguida, levado ao congelador por aproximadamente 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.500 rcf, o sobrenadante retirado e transferido para novos microtubos.

Foi adicionado aos novos microtubos 200 µL de isopropanol puro, deixando agir por cinco minutos, sob refrigeração. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.500 rcf, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%.

Nova centrifugação foi realizada por cinco minutos a 16.000 rcf, descartado o sobrenadante e o microtubo contendo o DNA precipitado colocado para secar com a tampa aberta em capela de fluxo laminar, para evitar contaminação. Após seco, o DNA foi reidratado com 30 μ L de TE + RNase, incubado durante cinco minutos em banho seco a 37 °C. Ao término do processo os microtubos contendo o DNA extraído foram armazenados no congelador.

4.8.2 Quantificação do DNA extraído

A quantificação por fluorescência consiste, basicamente, na adição de um fluorocromo (ex. Brometo de Etídio) que se liga ao DNA e que, ao ser submetido a uma fonte de luz ultravioleta emite fluorescência, sendo a quantificação verificada pela quantidade da fluorescência emitida (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Para quantificação foi utilizada uma alíquota de 2 μ L de DNA extraído, adicionado a 3 μ L de tampão de corrida (TEB 5X - Azul de Bromofenol) seguida de uma breve homogeneização com a micropipeta. As amostras adicionadas de tampão foram carregadas em 100 mL de gel de agarose 1%, que foi preparado previamente com tampão TEB 1X e adicionado 1 μ L de brometo de etídio (10 mg/mL).

O gel contendo as amostras foi transferido para uma cuba de eletroforese e adicionado solução tampão TEB 1X em volume suficiente para cobrir o gel. A eletroforese foi realizada utilizando uma voltagem de 100 V por cerca de 30 minutos e, após isto, o gel transferido para um transiluminador UV para visualização da fluorescência, sendo a quantificação determinada pela intensidade da emissão (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.8.3 Amplificação do 16S rDNA

A amplificação do 16S rDNA foi realizada por meio da técnica de PCR, utilizando-se os *primers* para bactéria 400F (5' – ACA GTC CAT GCC ATC ACT GCC - 3') e 400R (5' – GCT TGA CAA AGT GGT CGT TGG - 3'). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 1,0 μ L de DNA molde (10 ng/ μ L); 1,0 μ L de cada *primer* 10 mM; 2,5 μ L de dNTPs 2,5 mM; 1,5 μ L de MgCl₂ 25 mM; 2,5 μ L de Tampão

10X e 0,3 μL da enzima Taq DNA Polimerase 5 U/ μL e 15,2 μL de água Milli-Q, com volume final de 25 μL .

A reação de amplificação foi realizada em termociclador MyGenie 96 Thermal Block da Bioneer, programado para realizar desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, 30 ciclos compreendendo desnaturação a 95 °C por 40 segundos, anelamento a 58 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos, seguida de extensão final a 72 °C por sete minutos. O produto das reações foi analisado em gel de agarose (1% p/v) para visualização dos fragmentos.

4.8.4 Purificação do produto da PCR

Os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados, foram purificados por meio de solução de *Polyethylene glycol* (PEG 6000), a fim de que os restos de *primers* e de dNTPs não utilizados durante o processo de amplificação fossem removidos (digeridos) por uma enzima com o intuito de evitar interferências no processo de sequenciamento das amostras.

Foram utilizados 10 μL do produto da PCR + 10 μL de PEG e incubados em banho-Maria a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2.500 rcf por 15 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com 125 μL de etanol 80%.

Uma nova centrifugação foi realizada durante dois minutos a 1.450 rcf, descartado o sobrenadante e o microtubo contendo o precipitado colocado para secar com a tampa aberta em capela de fluxo laminar, para evitar contaminação. Após seco, o precipitado foi reidratado com a adição de 14 μL de água Milli-Q.

4.8.5 Identificação dos isolados

As seqüências obtidas a partir do gene 16S rDNA pelo sequenciamento foram utilizadas para identificação dos isolados, por meio do Banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando BLAST n . Foram consideradas seqüências com dissimilaridades menor ou igual a 3% com as do Banco de dados.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o software ASSISTAT (SILVA et al., 2016). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%) de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *Himatanthus sucuuba*

A partir de tecidos sadios de *H. sucuuba*, foi possível obter 416 isolados bacterianos, representando 57,35% de colonização. Destes, 42,22% isoladas da folha, 5,83% do pecíolo, e 9,30% isoladas da casca (Tabela 2).

Tabela 2: Taxa de colonização de bactérias endofíticas em diferentes tecidos de *Himatanthus sucuuba*

	Taxa de colonização (%)			
	Folhas	Pecíolo	Casca	Total (%)
Hospedeira 1	12,08	2,08	3,33	17,49
Hospedeira 2	14,17	2,08	3,19	19,44
Hospedeira 3	15,97	1,67	2,78	20,42
Total (%)	42,22	5,83	9,30	57,35

Das 304 bactérias isoladas da copa da árvore, 18,90% foram isoladas do terço superior e 18,70% dos terços médio e inferior da copa, respectivamente, representando 56,30% de colonização. Quanto à taxa de colonização por hospedeiro destacou-se no terço superior com 7,60% a Hospedeira 1, no terço médio com 8,52% a Hospedeira 2 e terço inferior com 10,00% a Hospedeira 3 (Tabela 3).

Tabela 3: Taxa de colonização da copa das árvores por bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba*

	Taxa de colonização por região da copa (%)			
	Terço Superior	Terço Médio	Terço Inferior	Total (%)
Hospedeira 1	7,60	3,51	5,00	16,11
Hospedeira 2	6,67	8,52	3,70	18,89
Hospedeira 3	4,63	6,67	10,00	21,30
Total (%)	18,90	18,70	18,70	56,30

Quanto à taxa de colonização por região da folha, 17,60% foram isoladas da região apical, 16,29% da região mediana e destacando-se a região basal com 22,41%. Com

relação à taxa de colonização por hospedeiro, destacou-se a região apical com 6,49% da Hospedeira 3, a mediana com 6,11% das Hospedeiras 1 e 3, respectivamente; e na região basal com 8,70% a Hospedeira 3, além de apresentar maior taxa de colonização nas folhas com 21,30% (Tabela 4).

Tabela 4: Taxa de colonização da folha por bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuba*

Taxa de colonização por região da folha (%)				
	Apical	Mediana	Basal	Total (%)
Hospedeira 1	4,81	4,07	7,22	16,11
Hospedeira 2	6,30	6,11	6,49	18,89
Hospedeira 3	6,49	6,11	8,70	21,30
Total (%)	17,60	16,29	22,41	56,30

5.2 COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA

Foram identificadas, por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, um total de 83 bactérias isoladas de tecidos vegetais de sucuba. O critério de seleção para o sequenciamento foi baseado no potencial biotecnológico que as bactérias endofíticas apresentaram; e será apresentado no decorrer deste trabalho. Foi utilizado a ferramenta BLASTn para identificação por similaridade destas sequências consultando a base de dados do *GenBank*[®] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Essa análise resultou na distribuição das sequências, onde foi possível identificar sete gêneros e uma classe entre as linhagens, sendo que a grande maioria pertence ao filo Proteobacteria. E dentro deste filo a classe predominante foi Betaproteobacteria. Na tabela 5 estão descritas as linhagens e suas respectivas identificações de similaridade do 16S rDNA que variaram de 97 a 100% utilizando fragmentos de 400 pb.

Caracterizando essas linhagens por região da planta, 73,50% são representantes da folha, 18,07% do pecíolo, e 8,43% da casca. Quanto à sua distribuição taxonômica, o gênero predominante foi *Enterobacter* 35,80%, seguido da classe Betaproteobacteria 24,70%, *Pantoea* 16,05%, *Pseudomonas* 13,59%, *Acinetobacter* 6,17%, e os menos frequentes foram *Bacillus*, *Klebsiella* e *Ochrobactrum* com 1,23% cada (Figura 12).

Enterobacter e Betaproteobacteria, os mais frequentes, foram isolados das três hospedeiras e não demonstraram preferência de colonização por nicho da planta.

Quanto à distribuição dos isolados nos diversos tecidos da planta, notamos que quem se destaca em termos de diversidade são as folhas da Hospedeira 2, já que ela engloba os seis gêneros e a classe identificadas, seguida das folhas da Hospedeira 1 com quatro desses gêneros e uma classe; Hospedeira 3 com dois gêneros e uma classe, o pecíolo apresentou três gêneros, a casca apenas um gênero, e a classe Betaproteobacteria que demonstra apresentar afinidade com este tecido, já que há uma predominância desses isolados nessa região da planta.

Tabela 5: Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação de sequências do gene 16S rDNA de bactérias isoladas de *Himatanthus sucuuba* com as sequências depositadas no Banco de dados do *GenBank*[®], utilizando a ferramenta BLASTn

Isolado	Tecido de Origem	Identificação	Número de Acesso	Similaridade (%)
97H1	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KM280654.1	97
116H1	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	CP017184.1	99
11H1	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957443.1	100
24H1	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	CP017164.1	99
25H1	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KX246804.1	99
67H1	Folha	<i>Acinetobacter</i> sp.	KU550144.1	100
35H1	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX891558.1	99
120H1	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX590929.1	99
53H1	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957441.1	99
65H1	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KX246804.1	99
31H1	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957439.1	99
48H1	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KU672370.1	99
99H1	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	Kt998836.1	99
86H1	Folha	<i>Pantoea</i> sp.	KU198743.1	99
143H1	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX673854.1	99
7H1	Folha	Betaproteobacteria	HM112380.1	99
45H1	Folha	Betaproteobacteria	HM112380.1	99
50H1	Folha	Betaproteobacteria	HM111709.1	99
85H1	Folha	Betaproteobacteria	HM109997.1	99
119H1	Folha	Betaproteobacteria	HM112380.1	99
51H1	Pecíolo	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX822687.1	100
30H1	Pecíolo	<i>Pantoea</i> sp.	KU198743.1	100
60H1	Pecíolo	<i>Pantoea</i> sp.	KX246773.1	100
32H1	Pecíolo	<i>Pantoea</i> sp.	KT150210.1	100
39H1	Pecíolo	<i>Pantoea</i> sp.	KR149609.1	99
36H1	Pecíolo	<i>Bacillus</i> sp.	AP007209.1	97
131H1	Casca	<i>Enterobacter</i> sp.	KX246804.1	99
132H1	Casca	<i>Enterobacter</i> sp.	KU725930.1	100

Continua...

Isolado	Tecido de Origem	Identificação	Número de Acesso	Continuação...
				Similaridade (%)
136H1	Casca	Betaproteobacteria	HM109997.1	99
137H1	Casca	Betaproteobacteria	HM112380.1	99
47H2	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	CP017184.1	99
38H2	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX946132.1	99
37H2	Folha	<i>Klebsiella</i> sp.	KT301533.1	99
61H2	Folha	<i>Pantoea</i> sp.	HQ683822.1	99
62H2	Folha	<i>Acinetobacter</i> sp.	KX550095.1	100
63H2	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX891558.1	99
67H2	Folha	<i>Pantoea</i> sp.	KJ865552.1	99
68H2	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KU550155.1	99
52H2	Folha	<i>Acinetobacter</i> sp.	KX453860.1	100
53H2	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957443.1	100
56H2	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	CP014280.1	99
58H2	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KU712018.1	99
28H2	Folha	<i>Ochrobactrum</i> sp.	CP015776.1	99
27H2	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX570929.1	99
71H2	Folha	<i>Pantoea</i> sp.	KJ830698.1	99
31H2	Folha	<i>Acinetobacter</i> sp.	KX822673.1	100
60H2	Folha	<i>Pantoea</i> sp.	KX246773.1	99
73H2	Folha	<i>Pantoea</i> sp.	KJ865552.1	99
8H2	Folha	<i>Acinetobacter</i> sp.	KX822673.1	99
90H2	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KX246804.1	99
33H2	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	CP014280.1	99
34H2	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX231809.1	99
43H2	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KU725930.1	100
205H2	Folha	Betaproteobacteria	HM111709.1	100
164H2	Folha	Betaproteobacteria	HM111709.1	100
14H2	Folha	Betaproteobacteria	HM108877.1	99
85H2	Folha	Betaproteobacteria	HM111709.1	100
136H2	Folha	Betaproteobacteria	HM112380.1	99
5H2	Pecíolo	<i>Enterobacter</i> sp.	CP014280.1	99
21H2	Pecíolo	<i>Enterobacter</i> sp.	CP017184.1	99
79H2	Pecíolo	<i>Enterobacter</i> sp.	KU712018.1	99
1H2	Casca	Betaproteobacteria	HM108877.1	99
75H2	Casca	Betaproteobacteria	HM112380.1	99
210H3	Folha	<i>Pantoea</i> sp.	KM586980.1	99
309H3	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KX246804.1	99
295H3	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957443.1	99
310H3	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	CP017184.1	99
300H3	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957443.1	99
281H3	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957439.1	100
290H3	Folha	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957439.1	99
248H3	Folha	Betaproteobacteria	HM111709.1	100
24H3	Folha	Betaproteobacteria	HM109205.1	99
218H3	Folha	Betaproteobacteria	HM110705.1	99
216H3	Folha	Betaproteobacteria	HM109160.1	99

Continua ...

Isolado	Tecido de Origem	Identificação	Número de Acesso	Conclusão
				Similaridade (%)
104H3	Folha	Betaproteobacteria	HM112380.1	99
79H3	Pecíolo	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957443.1	99
80H3	Pecíolo	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957439.1	100
81H3	Pecíolo	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957443.1	99
98H3	Pecíolo	<i>Pantoea</i> sp.	KF736934.1	99
273H3	Pecíolo	<i>Enterobacter</i> sp.	KT957443.1	99
124H3	Pecíolo	Betaproteobacteria	HM110705.1	99
126H3	Pecíolo	Betaproteobacteria	HM112380.1	99
33H3	Casca	Betaproteobacteria	HM111709.1	100

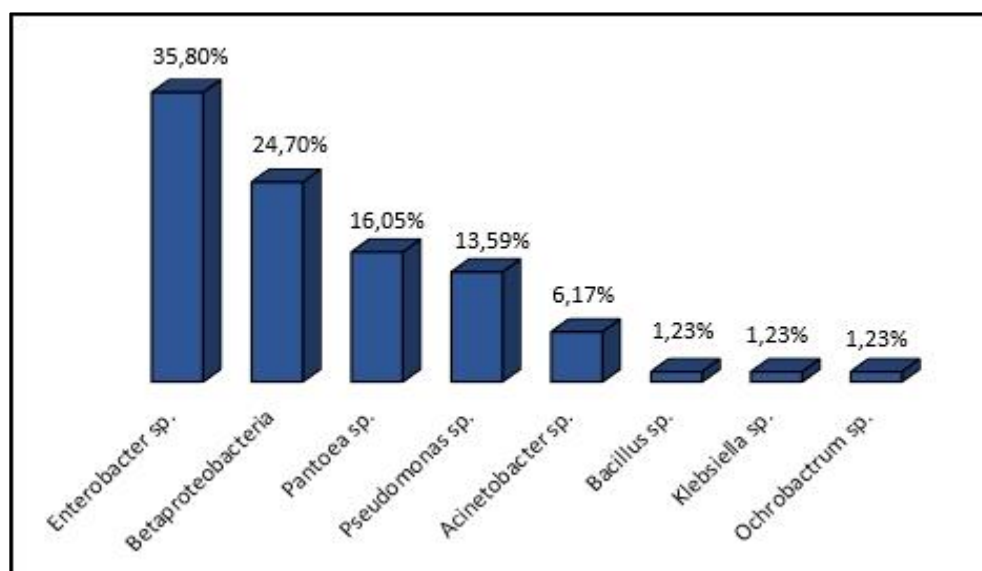


Figura 12: Distribuição ao nível taxonômico de gênero das bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba*

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

O critério utilizado para caracterização morfológica foi o mesmo estabelecido no item (5.2). Das 83 bactérias endofíticas analisadas quanto ao Gram, 98,80% foram bastonetes Gram-negativos e 1,20% bastonetes Gram-positivos (Figura 13). Quanto ao teste de catalase (Figura 14), 73,50% expressaram atividade positiva, e 26,50% negativa. Já o ensaio em meio O/F (Figura 15), 62,65% dos isolados apresentaram metabolismo anaeróbico facultativo e 37,35% metabolismo oxidativo (Tabela 6).

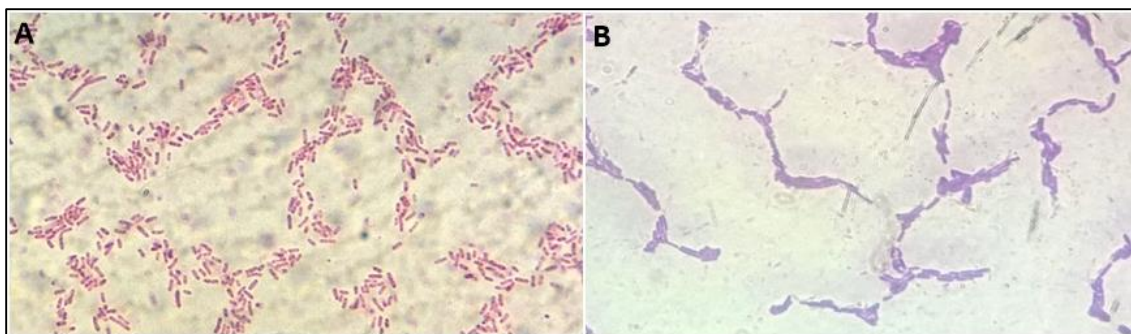


Figura 13: Morfologia das células bacterianas isoladas de *Himatanthus sucuuba* observadas pelo teste coloração de Gram sob microscopia óptica de 1000 X (A) Bastonetes Gram-negativo; (B) Bastonetes Gram-positivo

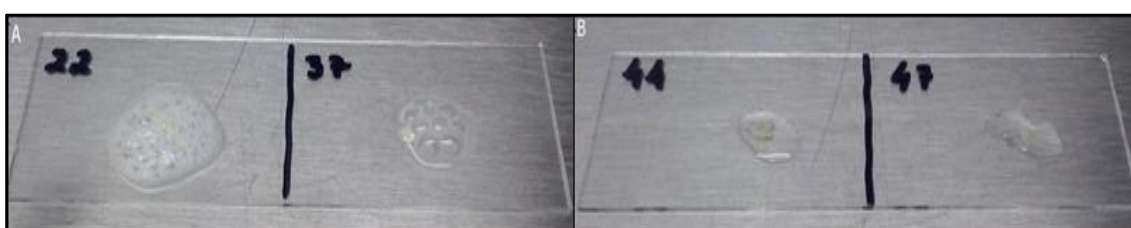


Figura 14: Teste de catalase de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba* (A) Catalase positivo; (B) Catalase negativo

Tabela 6: Caracterização morfológica de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba*

Isolados	Forma	Gram/KOH	Catalase	O/F
<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Ochrobactrum</i> sp. <i>Pantoea</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp.	Bastonete	Gram -/ -	Positivo	Aeróbio Obrigatório
Betaproteobacteria	Bastonete	Gram -/ -	Negativo	Anaeróbio Facultativo
<i>Bacillus</i> sp.	Bastonete	Gram +/+	Positivo	Anaeróbio Facultativo
<i>Enterobacter</i> sp.	Bastonete	Gram -/ -	Positivo	Anaeróbio Facultativo

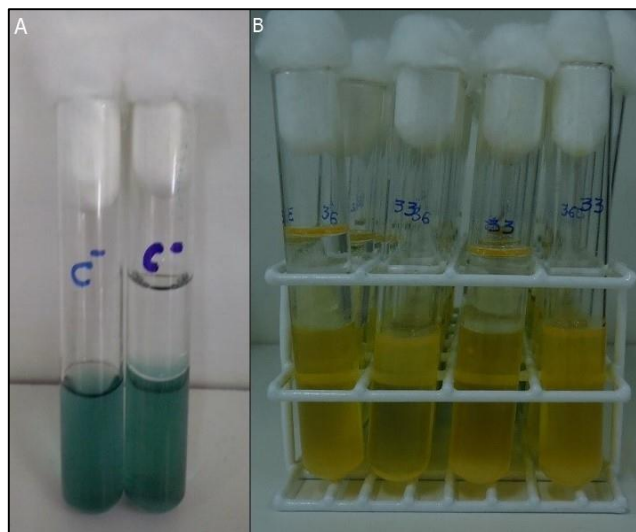


Figura 15: Teste O/F de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba*; (A) Controle negativo; (B) Reação Oxidativo/Fermentativa anaeróbios facultativos

5.4 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

O potencial dos micro-organismos isolados para promover o crescimento das plantas foi avaliado *in vitro*. O desempenho dos isolados nas análises a seguir, se mostraram promissores, uma vez que, o rastreio de fatores de promoção de crescimento *in vitro* é considerado uma ferramenta eficaz na investigação de micro-organismos que podem ser utilizados como biofertilizantes. Estes testes são extremamente importantes porque permitem a seleção de micro-organismos com melhor potencial agrônômico antes de testá-los em plantas (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2016). Os ensaios a seguir foram realizados com 308 de 416 bactérias endofíticas isoladas de *H. sucuuba*, isso se deu em decorrência dos outros isolados criopreservados não terem sido mais reativados.

5.4.1 Potencial de fixação de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio pode ser considerada o segundo processo biológico mais importante do planeta, depois da fotossíntese (ALVES, 2007). Esse processo é de grande importância econômica, pois o nitrogênio é um dos fatores

limitantes para o desenvolvimento da maioria das plantas de interesse comercial, uma vez que o mesmo torna o sistema agrícola mais sustentável e produtivo (BATISTA, 2012).

Por meio deste processo foi possível avaliar 308 bactérias endofíticas, sendo, selecionadas apenas 141 linhagens que foram capazes de crescer em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio. Destas, 51,07% eram oriundas das folhas, 41,13% da casca e 7,80% do pecíolo.

Mediante estes dados, obteve-se um resultado significativo em termos qualitativos com as bactérias isoladas da casca, uma vez que entre as 61 linhagens, 58 cresceram no meio NFb semi-sólido e formaram película aerotóxica (Figura 16).

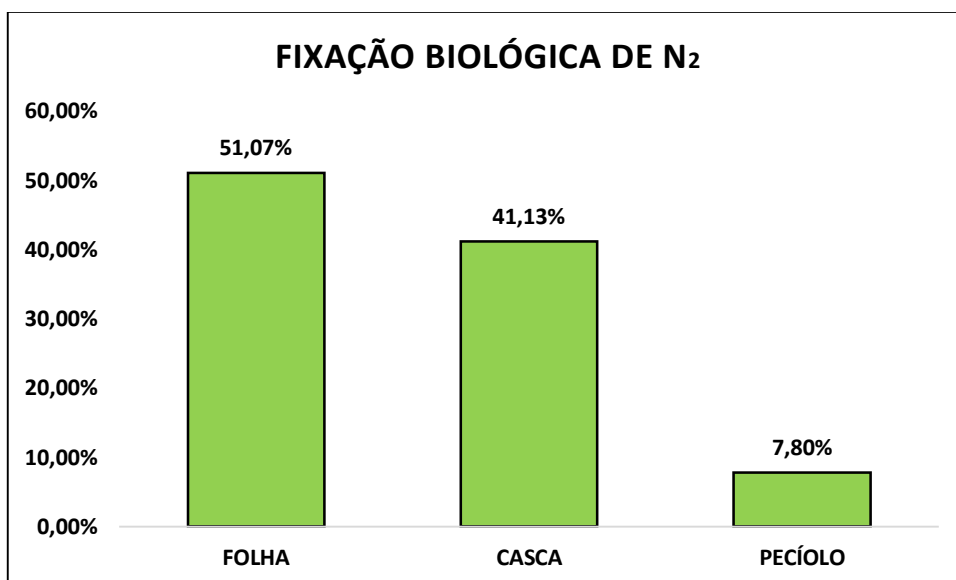


Figura 16: Capacidade de fixar nitrogênio pelas bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba*

A formação dessa película é uma estratégia desenvolvida pelos micro-organismos para regular a concentração de oxigênio no meio, com a finalidade de manter baixa sua tensão (BRASIL, 2005), permitindo uma condição de crescimento bacteriano onde o oxigênio não influencia negativamente na sua sobrevivência, proporcionando uma melhor atividade da nitrogenase, que é extremamente sensível a altas concentrações de oxigênio (PELZER, 2010).

Nos isolados que apresentaram crescimento da película foi observada a mudança de coloração do meio de cultura de verde para azul. Alguns trabalhos relatam que a modificação da cor no meio de cultura (NFb), está relacionado com o resultado positivo

para fixação de nitrogênio. No entanto, segundo Castro (2011) este fator está relacionado com a modificação do pH, de básico para ácido (Figura 17). Portanto, o resultado positivo é obtido apenas pela formação de um halo ou nuvem como é denominada essa característica.

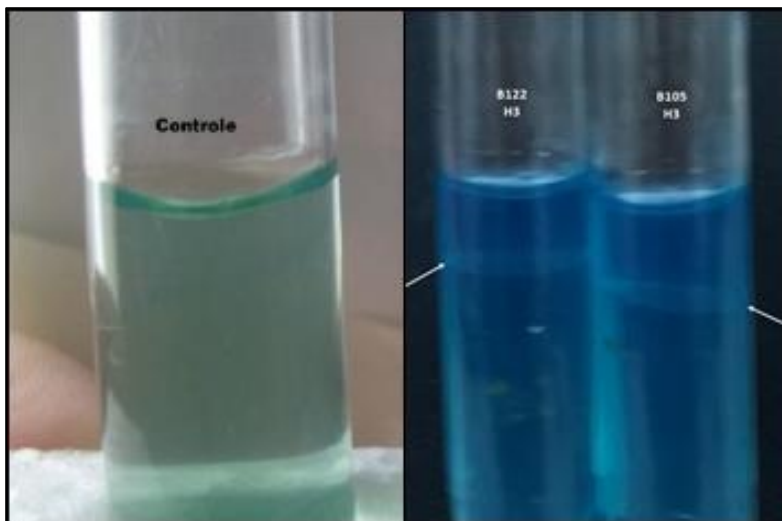


Figura 17: Modificação do meio de cultura NFb semi-sólido do pH básico (controle) para o pH ácido mostrado pelos isolados B122H3 e B105H3 e formação de película aerotóxica

Das linhagens positivas para o teste de fixação de nitrogênio, a classe Betaproteobacteria foi a que mais apresentou representantes entre os fixadores de nitrogênio (128 linhagens, 90,79% das fixadoras), enquanto o gênero *Enterobacter* sp. representou 2,83% (com quatro linhagens entre as fixadoras), o gênero *Acinetobacter* sp. 2,13% (com três linhagens entre as fixadoras), *Pantoea* sp. 4,25% (com seis linhagens entre as fixadoras). A classe Betaproteobacteria se distribuiu nas folhas das três Hospedeiras e pecíolo, assim como na casca onde possuem maior concentração, enquanto o gênero *Enterobacter* aparece de forma pontual no pecíolo e nas folhas da Hospedeira 2, da mesma maneira o gênero *Acinetobacter* localizado nas folhas da Hospedeira 2, e o gênero *Pantoea* concentrado na região do pecíolo.

De acordo com os gêneros encontrados no presente trabalho, observou-se que eles corroboram com aqueles já citados na literatura. Segundo Castro (2011), de 115 isolados bacterianos de manguezais, 51 foram capazes de fixar nitrogênio, destacando os gêneros *Bacillus* e *Pantoea*. Já Batista (2012), de 101 linhagens investigadas de culturas de guaranazeiro, 24 foram capazes de formar película aerotóxica, representando os gêneros

Burkolderia, *Bacillus*, *Ralstonia* e *Delftia*. Assumpção (2009) por sua vez, conseguiu 11 isolados de soja capazes de fixar nitrogênio, e entre estes estavam, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*.

Foi observado neste trabalho um grande número de Betaproteobactérias com capacidade de fixar nitrogênio, o que se assemelha ao estudo feito por Batista (2012) que destacou o gênero *Burkolderia* como aquele que mais apresentou isolados fixadores de nitrogênio, e, este, por sua vez, é pertencente à classe das Betaproteobactérias.

Há poucos relatos de bactérias fixadoras do gênero *Pantoea*, mas o trabalho realizado por Loiret et al. (2004) foi o primeiro a citar *Pantoea* como endofítica fixadora de nitrogênio, isolada de cana-de-açúcar.

Embora uma variedade de organismos sejam capazes de fixar nitrogênio, endófitos têm uma vantagem sobre rizobactérias. A sua localização no interior da planta significa que seu habitat é protegido, mais uniforme e com baixos níveis de oxigênio, favorecendo a fixação de nitrogênio (SALA et al., 2005).

5.4.2 Produção de AIA

A habilidade de sintetizar fitormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas com plantas. Entre eles, a produção de AIA, que estimula tanto a alongação celular quanto a divisão e diferenciação celular nas plantas (DOBBELAERE et al., 2003).

O AIA é estruturalmente relacionado ao aminoácido triptofano, indicando este aminoácido como provável precursor. Muitos estudos têm demonstrado que os vegetais convertem triptofano em AIA através de várias rotas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Esta transformação pode ser realizada por micro-organismos que produzem uma conversão oxidativa quando o triptofano se encontra em presença de peroxidases e de radicais livres (MARCHIORO, 2005).

A análise da produção de AIA *in vitro* com as linhagens bacterianas foi realizada com o intuito de pré-selecionar aquelas que mais produziram o hormônio, baseado nisso, a reta padrão para comparação da absorbância colorimétrica da quantidade de AIA produzido pelos isolados constou de sete concentrações de AIA comercial (25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e gerou a equação $y = 0,0013x + 0,3303$, com $R^2 = 0,9916$ (Figura 18), em que “y” representa a quantidade de auxina secretada na

cultura líquida. O ensaio colorimétrico com o emprego da solução de Salkowski permitiu identificar e quantificar os isolados capazes de produzir auxinas pela manifestação de cor rósea variando de intensidade de acordo com as concentrações de AIA presentes no meio (Figura 19).

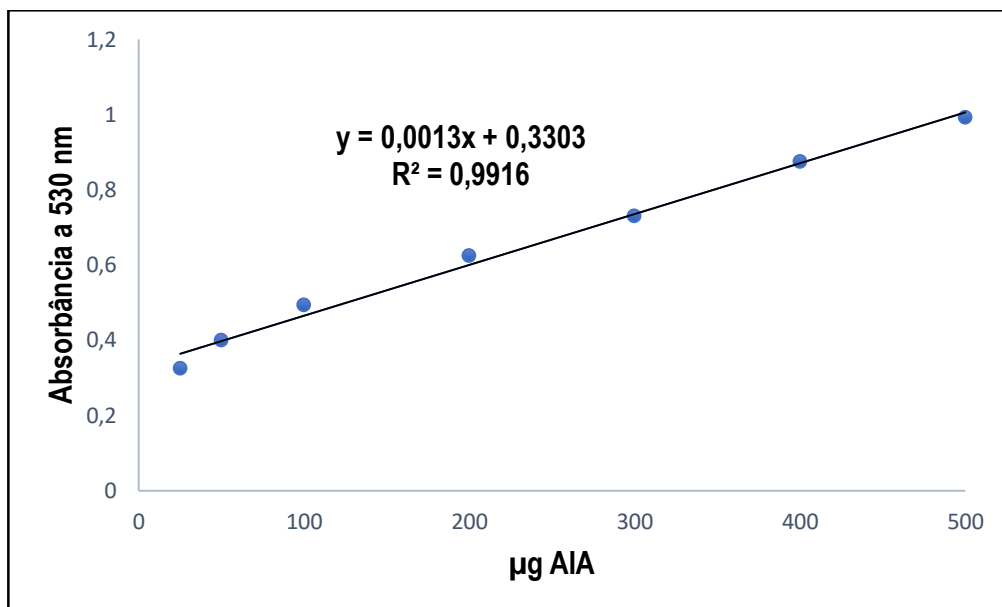


Figura 18: Equação da reta dos padrões de concentrações de AIA comercial



Figura 19: Quantificação de AIA por bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba*

De acordo com as 308 bactérias avaliadas, 83,77% foram capazes de produzir AIA. Os valores obtidos na quantificação variaram entre 20,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 510,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foi considerado como produção significativa, as bactérias que obtiveram valores acima de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dessas, 56 (18,18%) tiveram produções entre 304,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 510,53

$\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, sendo estas mais frequentes entre os grupos isolados de folha e pecíolo do que na casca, como mostra a Tabela 7.

Os gêneros com alta atividade de AIA neste trabalho podem ser considerados super produtores, destacando-se *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea* e *Pseudomonas*. O isolado 37H2 identificado como sendo pertencente ao gênero *Klebsiella* foi o que apresentou a maior produção de AIA ($510,53 \mu\text{g mL}^{-1}$), e este isolado foi obtido da região mediana da copa da Hospedeira 2.

Tabela 7: Produção de ácido indol-3-acético (AIA) obtido em meio de cultura com inoculação de bactérias endofíticas, isoladas de *Himatanthus sucuuba*

PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO					
ISOLADOS	ORIGEM	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$	ISOLADOS	ORIGEM	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$
37H2	FOLHA	510,53	32H1	PECÍOLO	393,61
86H1	FOLHA	509,0	34H2	FOLHA	390,56
143H1	FOLHA	509,0	58H2	FOLHA	390,53
210H3	FOLHA	509,0	39H1	PECÍOLO	389,45
99H1	FOLHA	507,46	38H2	FOLHA	385,15
60H2	FOLHA	506,69	30H1	PECÍOLO	365,89
48H1	FOLHA	498,23	60H2	FOLHA	363,61
35H1	FOLHA	496,70	67H1	FOLHA	353,61
273H3	PECÍOLO	496,69	80H3	PECÍOLO	353,61
132H1	CASCA	496,69	79H2	PECÍOLO	350,53
33H1	PECÍOLO	496,30	25H1	FOLHA	350,53
31H1	FOLHA	493,61	56H2	FOLHA	348,23
52H2	FOLHA	483,61	81H3	PECÍOLO	342,84
73H2	FOLHA	482,84	24H1	FOLHA	342,84
65H1	FOLHA	472,84	131H1	CASCA	342,84
53H1	FOLHA	465,15	11H1	FOLHA	339,00
51H1	FOLHA	462,16	8H2	FOLHA	331,30
60H1	PECÍOLO	459,56	23H2	FOLHA	326,70
71H2	FOLHA	459,0	90H2	FOLHA	323,58
28H2	FOLHA	459,0	116H1	FOLHA	322,84
98H3	PECÍOLO	459,0	67H2	FOLHA	315,15
120H1	FOLHA	455,92	47H2	FOLHA	312,84
21H2	PECÍOLO	444,38	33H1	PECÍOLO	308,20
68H2	FOLHA	432,84	5H2	PECÍOLO	307,89
43H2	FOLHA	421,63	36H1	PECÍOLO	306,69
53H2	FOLHA	420,53	97H2	FOLHA	304,61
62H2	FOLHA	409,76	79H3	PECÍOLO	304,38
27H1	FOLHA	395,92	31H2	FOLHA	304,38

Diversos trabalhos têm identificado linhagens bacterianas produtoras de AIA (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; TSAVKELOVA et al., 2007). A maioria dos relatos destacaram valores abaixo dos encontrados neste trabalho. Porém poucos tem

demonstrado a produção de AIA por bactérias endofíticas. No entanto uma produção elevada de AIA foi encontrada em estudos realizados por Castro (2011) em bactérias endofíticas do manguezal, *Exiguobacterium sibiricum* produziu $750,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, enquanto Batista (2012) obteve produção de $495,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ com *Delftia acidovorans*, isolada de raízes de guaranazeiro.

De acordo com Rodrigues et al. (2016) ao isolar e selecionar bactérias promotoras de crescimento associadas à cana-de-açúcar, identificaram sete isolados com resultados significativos quanto à produção de AIA e promoção do crescimento vegetal, estes, pertencendo aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pantoea*, sendo potenciais candidatos a bioinoculantes. Babalola e Odhiambo (2008) também descobriram que o gênero *Klebsiella*, promoveu o crescimento na cultura do milho. *Enterobacter* e *Pantoea* também têm sido descritos como promotores do crescimento desta cultura (MORALES-GARCÍA et al., 2011, KAVAMURA et al., 2013).

Os resultados ora observados com as bactérias testadas sugerem potencial para a promoção de crescimento vegetal. As concentrações obtidas foram bastante variadas entre as estirpes, o que pode beneficiar culturas com diferentes exigências.

5.4.3 Solubilização de fosfato

Diversos estudos foram realizados com bactérias solubilizadoras de fosfato (GYANESHWAR et al., 2002; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; DIAS et al., 2009), para avaliar a capacidade destes isolados de interagir com as plantas e promover seu desenvolvimento, no entanto, diversos fatores interferem na interação, como por exemplo, o genótipo do hospedeiro, nicho, idade do mesmo, entre outros (COMPANT et al., 2010).

A solubilização de fosfato foi observada em 96,42% dos isolados, com índices de solubilização variando entre 0,37 a 2,93 cm. De acordo com Marra et al. (2012), os índices de solubilização abaixo de 2 cm são considerados baixos, entre 2 e 4 cm são médios, e alto acima de 4 cm. A maioria dos isolados foram classificados como baixos solubilizadores, e somente 15 isolados classificados com IS médio aos 15 dias de avaliação (Tabela 8). Estes resultados vão de encontro aos verificados por Chagas Junior et al. (2010) que encontraram maior frequência de linhagens com baixo índice de

solubilização. De 205 bactérias avaliadas, 68 foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio inorgânico, e destes, apenas nove isolados apresentaram IS médio e um IS alto.

Solubilização de fosfato é uma característica altamente variável entre as bactérias. Rodrigues et al. (2016) mostraram que 47,05% dos isolados foram solubilizadores, enquanto Lira et al. (2012) mostraram 75%, já Silva et al. (2012) relataram uma taxa positiva de 90%.

Os gêneros que apresentaram atividade neste ensaio são *Enterobacter* e *Pantoea*, ambos já tem sido descritos na literatura como potenciais solubilizadores, Souza (2013), destaca os gêneros *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pantoea* como solubilizadores de fosfato inorgânico.

Tabela 8: Índice de solubilização de fosfato (ISF) dos isolados que apresentaram médio ISF, segundo Marra et al. (2012)

ISOLADOS	ORIGEM	ISF	ISOLADOS	ORIGEM	ISF
30H1	PECÍOLO	2,93	295H3	FOLHA	2,20
60H1	PECÍOLO	2,87	25H1	FOLHA	2,20
32H1	PECÍOLO	2,81	310H3	FOLHA	2,10
39H1	PECÍOLO	2,79	24H1	FOLHA	2,10
11H1	FOLHA	2,53	300H3	FOLHA	2,00
62H2	FOLHA	2,22	281H3	FOLHA	2,00
27H2	FOLHA	2,20	290H3	FOLHA	2,00
309H3	FOLHA	2,20			

Foi verificado também que a folha foi o nicho que apresentou maior frequência de linhagens solubilizadoras com 70,03%, seguido da casca com 19,87% e pecíolo com 10,10% (Figura 20).

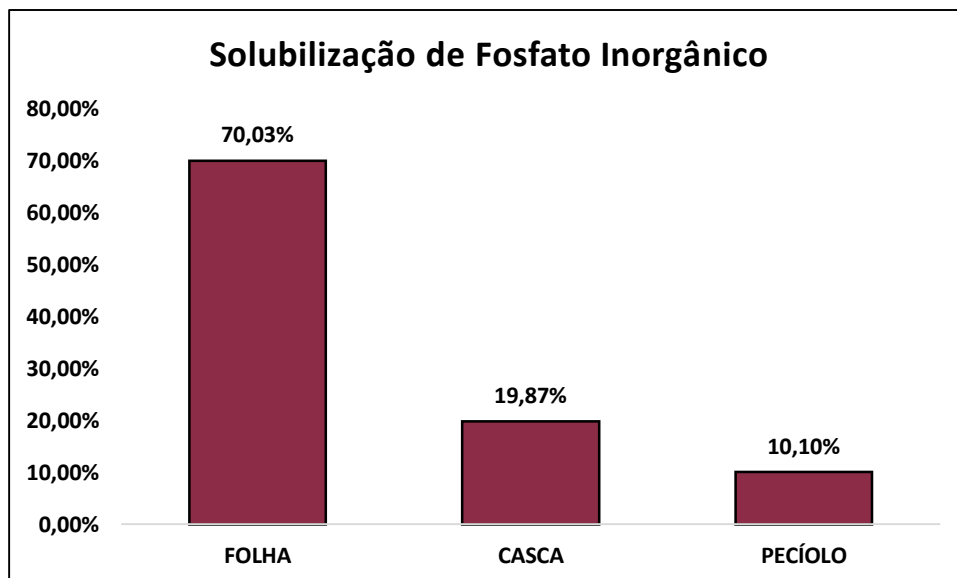


Figura 20: Percentual por tecido da planta das bactérias endofíticas de *Himatanthus sucuuba* com capacidade de solubilizar fosfato de cálcio insolúvel

Para solubilização de fosfato, as bactérias devem estar perto da fonte de fósforo (TAURIAN et al., 2010). Embora rizobactéria sejam mais promissoras como biofertilizantes, bactérias endofíticas também são descritas como solubilizadoras de fosfato, como é o caso de Naik et al. (2008) que testaram 443 linhagens isoladas de banana e arroz, e 18% se mostraram capazes de solubilizar fosfato. E de acordo com Oteino et al. (2015), a inoculação de endófitos na rizosfera aumentou o crescimento em plantas que sofrem de limitação de fosfato.

5.5 SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS POTENCIAIS

5.5.1 Seleção massal

A maior parte dos trabalhos que visam a seleção de antagonistas a fitopatógenos ocorre com testes *in vitro*, que são mais fáceis e rápidos, permitindo que uma grande população seja avaliada (MARIANO, 1993). O teste *in vitro* mais utilizado na seleção em massa de isolados antagonistas é o pareamento de culturas (confronto direto) realizado em meio de cultura à base de ágar (ETHUR et al., 2005).

Quanto à análise qualitativa da capacidade inibitória dos isolados, 308 bactérias endofíticas isoladas de *H. sucuuba* foram submetidos a uma seleção em massa realizada através de confronto direto frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* spp. de três culturas

frutíferas tropicais (mangueira, cajueiro e guaranazeiro) a fim de se obter uma pré-seleção de potenciais antagonistas (Figura 21).

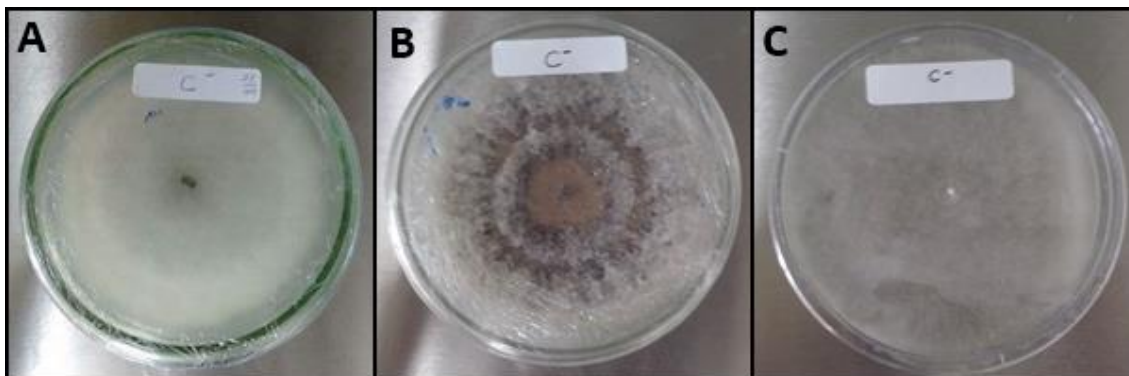


Figura 21: Fitopatógenos testados no antagonismo *in vitro* frente a bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus succuba* (A) *Colletotrichum frutícola* isolado do cajueiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira; (C) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro

Nessa pré-seleção, 219 das 308 bactérias testadas apresentaram alguma forma de atividade antagônica (Figura 22), produzindo bons resultados, ou seja, conseguiram inibir o crescimento do fitopatógeno com formação de um halo entre os isolados e o micélio do fungo, 63,92% proveniente do tecido foliar, 26,95% da casca e 9,13% do pecíolo (Figura 23). Esses isolados selecionados foram testados em ensaios individuais semi-quantitativo com os fitopatógenos.

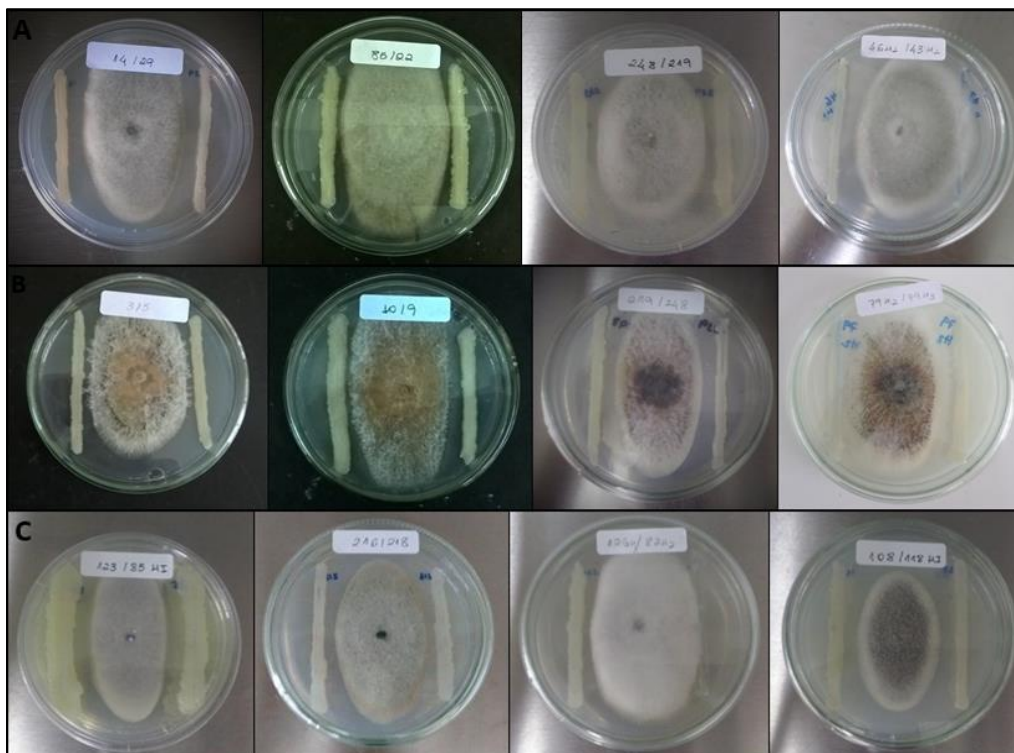


Figura 22: Pré-seleção de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba* frente ao (A) *Colletotrichum fruticola*, isolados do cajueiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados da mangueira; (C) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados do guaranazeiro

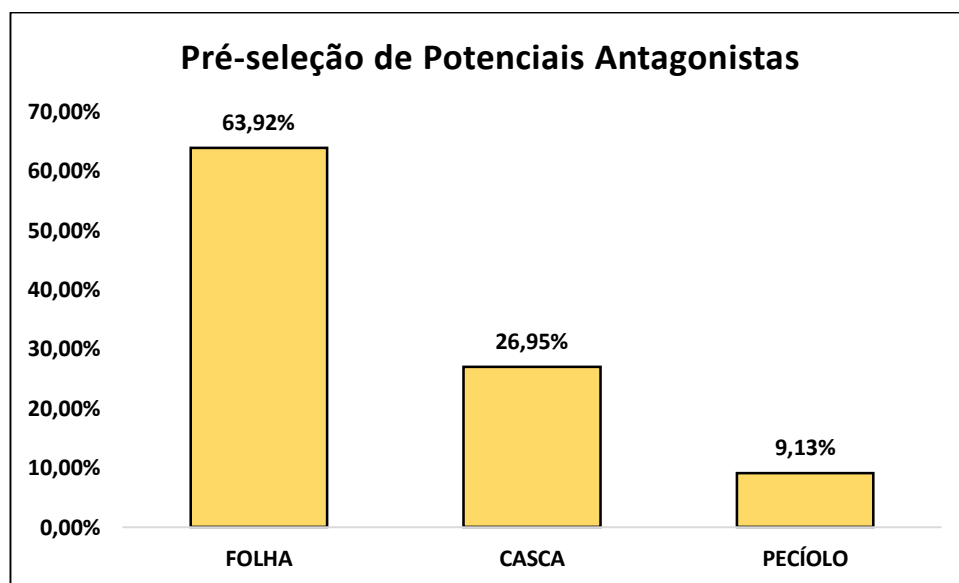


Figura 23: Pré-seleção de bactérias endofíticas de *Himatanthus sucuuba* como potenciais antagonistas a *Colletotrichum* spp.

5.5.2 Cultura pareada

Testes de antagonismo podem indicar potencial para controle biológico de pragas e patógenos, utilizando micro-organismos endofíticos auxiliando o combate de doenças e pragas, sem agredir o ambiente com substâncias tóxicas, como alguns agroquímicos. Esse controle biológico pode ocorrer principalmente devido a atuação direta sobre o patógeno no interior da planta hospedeira, por antagonismo, ou por competição por nutrientes (SOBRAL et al., 2014).

Um total de 219 isolados bacterianos selecionados na etapa anterior foram testados *in vitro* contra *Colletotrichum* spp., e todos apresentaram ação antagônica aos fitopatógenos desafiante. Destes, 150 isolados reduziram substancialmente o crescimento fúngico, estes valores encontram-se subdivididos nas Tabelas 9-13. Foram selecionados 30 isolados por região da planta, e destacados os dez melhores por fitopatógeno investigado. Estes isolados obtiveram índices de redução do crescimento do fitopatógeno entre 11,42% e 49,29%; Os resultados mais expressivos foram com endófitos da classe Betaproteobacteria (Figuras 24-27).

Em trabalho semelhante, Bonatelli (2012) obteve uma porcentagem de inibição do crescimento de *Colletotrichum* sp. que ficou entre 25 e 55%, sendo do gênero *Bacillus* o isolado com resultado mais expressivo. Já Tsui (2012) encontrou 10% de bactérias endofíticas como antagonistas a *Colletotrichum* e uma delas do gênero *Serratia* que foi a melhor, apresentando 30% de inibição. Por sua vez, Silva (2015) obteve 16 isolados bacterianos de guaranazeiro e estes tiveram um índice de redução do *Colletotrichum* de 32,32% e 63,78%.

Alguns isolados apresentaram inespecificidade de ação, reduzindo o crescimento micelial dos três fitopatógenos desafiante, permitindo com isso, vislumbrar a possibilidade de sua utilização em diferentes sistemas patógenos-hospedeiros. Este resultado demonstra que a inibição do crescimento micelial foi devido a antibiose, sugerindo a produção de metabólitos secundários extracelulares pelos isolados bacterianos com ação antifúngica, que podem ser antibióticos, quitinases, glucanases e outros tipos de polipeptídios (KUDAN; PICHYANGKURA, 2009; AMIN et al., 2012).

O isolado 17H1 ficou entre os dez melhores para cada um dos três fitopatógenos, obtendo com isso melhor efetividade, entretanto o que teve melhor destaque frente ao fitopatógeno do guaranazeiro foi o isolado 119H1 com 44,12%, enquanto o da mangueira foi o 3H1 com 29,29% e do cajueiro o 111H1 com 37,22% de inibição (Tabela 9 e Figura 24).

Tabela 9: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos *Colletotrichum* spp. por bactérias endofíticas isoladas das folhas da Hospedeira 1 (*Himatanthus sucuuba*), em testes de antagonismo *in vitro*

<i>C. gloeosporioides</i> *			<i>C. gloeosporioides</i> **			<i>C. fruticola</i>		
Isolados	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	Isolados	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	Isolados	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
Controle	6,98 g	0,00	Controle	6,93 d	0,00	Controle	6,85 e	0,00
119H1	3,90 a	44,12	3H1	4,90 a	29,29	111H1	4,30 a	37,22
45H1	4,00 ab	41,69	17H1	4,90 a	29,29	103H1	4,50 b	34,30
46H1	4,13 bc	40,83	4H1	4,95 a	28,57	119H1	4,77 c	30,36
29H1	4,17 bc	40,25	14H1	5,05 b	27,12	107H1	4,80 c	29,92
96H1	4,20 bcd	39,82	114H1	5,05 b	27,12	115H1	4,80 c	29,92
115H1	4,33 cde	37,96	110H1	5,05 b	27,12	106H1	4,83 c	29,48
17H1	4,40 de	36,96	109H1	5,10 bc	26,40	14H1	4,83 c	29,48
35H1	4,47 e	35,96	117H1	5,13 bc	25,97	17H1	4,90 cd	28,46
5H1	4,50 ef	35,53	46H1	5,13 bc	25,97	45H1	4,90 cd	28,46
14H1	4,70 f	32,66	5H1	5,17 c	25,39	110H1	5,00 d	27,00
CV ³ (%)	1,64			0,60			1,07	

Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro. *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira.

¹Raio médio da colônia (R.C). ²Inibição relativa (I.R). ³Coefficiente de variação (CV)

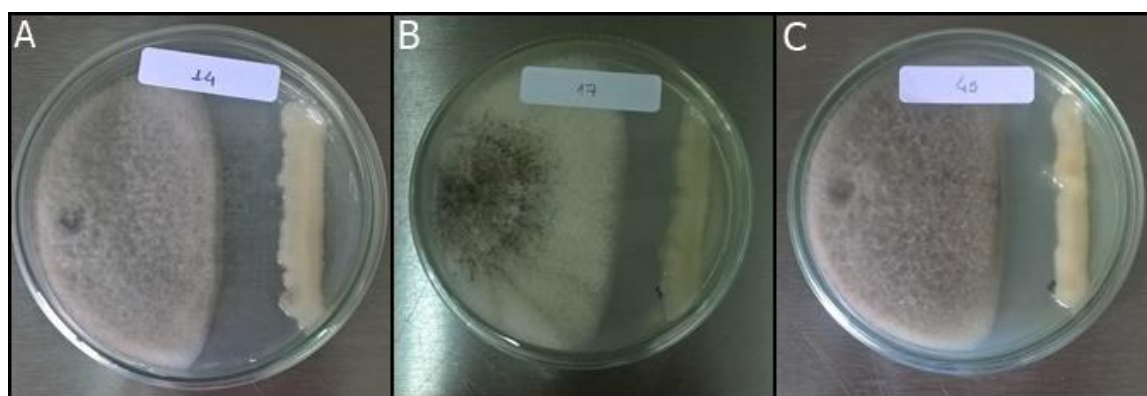


Figura 24: Teste de pareamento de culturas de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba* (Hospedeira 1) frente ao (A) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de mangueira; (C) *Colletotrichum fruticola*, isolado de cajueiro

Já em relação aos isolados da Hospedeira 2 os dez mais promissores isolados foram efetivos frente aos três fitopatógenos, entretanto o isolado 136H2 foi o que obteve melhor atividade frente ao fitopatógeno do guaranazeiro com 34,22% de inibição, o isolado 85H2 foi melhor frente ao fitopatógeno da mangueira com 33,33% e o isolado 205H2 foi melhor frente ao fitopatógeno do cajueiro com 30,43% (Tabela 10 e Figura 25).

Tabela 10: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos *Colletotrichum* spp. por bactérias endofíticas das folhas Hospedeira 2 (*Himatanthus sucuuba*), em testes de antagonismo *in vitro*

Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> *		Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> **		Isolados	<i>C. fruticola</i>	
	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)		R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)		R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
Controle	7,10 e	0,00	Controle	6,90 g	0,00	Controle	6,90 d	0,00
136H2	4,67 a	34,22	85H2	4,60 a	33,33	205H2	4,80 a	30,43
95H2	4,70 ab	33,80	14H2	4,80 b	30,43	85H2	4,87 a	29,42
137H2	4,77 bc	32,81	137H2	4,97 c	27,97	164H2	4,90 a	28,98
85H2	4,77 bc	32,81	205H2	5,00 cd	27,53	14H2	5,07 b	26,52
164H2	4,80 c	32,39	22H2	5,03 cde	27,10	136H2	5,07 b	26,52
143H2	4,80 c	32,39	95H2	5,03 cde	27,10	22H2	5,10 bc	26,08
14H2	4,90 d	30,98	164H2	5,07 cdef	26,52	95H2	5,10 bc	26,08
205H2	4,93 d	30,56	209H2	5,10 def	26,08	137H2	5,10 bc	26,08
209H2	4,93 d	30,56	136H2	5,13 ef	25,65	209H2	5,13 bc	25,65
22H2	4,96 d	30,14	143H2	5,17 f	25,07	143H2	5,23 c	24,20
CV ³ (%)	0,63			0,84			1,02	

Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro. *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira.

¹Raio médio da colônia (R.C). ²Inibição relativa (I.R). ³Coefficiente de variação (CV)



Figura 25: Teste de pareamento de culturas de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba* Hospedeira 2 frente ao (A) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira; (C) *Colletotrichum fruticola*, isolado do cajueiro

Com relação à Hospedeira 3 os isolados 217H3, 207H3 e 24H3, foram os que apresentaram melhor efetividade frente aos três fitopatógenos analisados, no entanto o isolado 193H3 teve melhor desempenho frente ao fitopatógeno do guaranazeiro com 42,85% de inibição, o isolado 120H3 foi melhor frente ao fitopatógeno da mangueira com 47,82% e o isolado 182H3 foi melhor frente ao fitopatógeno do cajueiro com 35,79% (Tabela 11 e Figura 26).

Tabela 11: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos *Colletotrichum* spp. por bactérias endofíticas das folhas Hospedeira 3 (*Himatanthus sucuuba*), em testes de antagonismo *in vitro*

Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> *		Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> **		Isolados	<i>C. fruticola</i>	
	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)		R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)		R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
Controle	7,00 e	0,00	Controle	6,90 g	0,00	Controle	6,90 c	0,00
193H3	4,00 a	42,85	120H3	3,60 a	47,82	182H3	4,43 a	35,79
104H3	4,10 ab	41,42	204H3	4,00 b	42,02	194H3	4,47 a	35,21
217H3	4,13 abc	41,00	24H3	4,00 b	42,02	190H3	4,60 ab	33,33
221H3	4,13 abc	41,00	107H3	4,10 bc	40,57	179H3	4,63 ab	32,89
51H3	4,13 abc	41,00	304H3	4,23 bcd	38,69	24H3	4,70 b	31,88
207H3	4,23 bcd	39,57	217H3	4,30 cde	37,68	220H3	4,70 b	31,88
24H3	4,27 cd	39,00	213H3	4,43 def	35,79	216H3	4,73 b	31,44
202H3	4,27 cd	39,00	202H3	4,50 ef	34,78	217H3	4,80 b	30,43
219H3	4,27 cd	39,00	207H3	4,60 f	33,33	109H3	4,80 b	30,43
109H3	4,30 d	38,57	193H3	4,60 f	33,33	207H3	4,80 b	30,43
CV ³ (%)	1,19			1,91			1,52	

Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro. *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira.

¹Raio médio da colônia (R.C). ²Inibição relativa (I.R). ³Coefficiente de variação (CV)

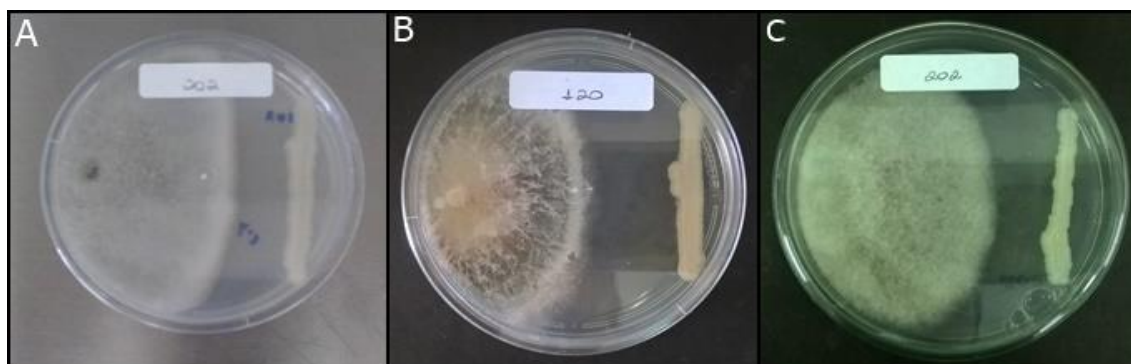


Figura 26: Teste de pareamento de culturas de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba* Hospedeira 3 frente ao (A) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira; (C) *Colletotrichum fruticola*, isolado do cajueiro

A região do pecíolo, levando em consideração as outras partes analisadas, foi a que obteve os índices mais baixos de inibição, no entanto alguns isolados merecem destaque como é o caso do isolado 126H3 e 79H3 que conseguiram inibir os três fitopatógenos. Individualmente o isolado 126H3 obteve a melhor taxa frente ao fitopatógeno do guaranazeiro com 34,28% de inibição, o isolado 32H1 foi melhor frente ao fitopatógeno da mangueira com 25,79% e o 273H3 foi melhor frente ao fitopatógeno do cajueiro com 34,28% (Tabela 12 e Figura 27).

Tabela 12: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos *Colletotrichum* spp. por bactérias endofíticas do pecíolo (*Himatanthus sucuuba*), em testes de antagonismo *in vitro*

Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> *		Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> **		Isolados	<i>C. fruticola</i>	
	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)		R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)		R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
Controle	7,00 g	0,00	Controle	6,90 h	0,00	Controle	7,00 g	0,00
126H3	4,60 a	34,28	32H1	5,12 a	25,79	273H3	4,60 a	34,28
89H1	4,83 b	31,00	9H1	5,33 b	22,75	79H3	4,83 b	31,00
79H3	4,83 b	31,00	126H3	5,33 b	22,75	89H1	4,83 b	31,00
46H1	5,10 c	27,14	124H3	5,40 c	21,73	46H1	5,10 c	27,14
91H2	5,12 c	26,85	82H2	5,59 d	18,98	126H3	5,12 c	26,85
62H1	5,12 c	26,85	46H2	5,60 d	18,84	39H1	5,40 d	22,85
124H3	5,12 c	26,85	79H3	5,77 e	16,37	33H1	5,72 e	18,28
39H1	5,40 d	22,85	60H2	5,77 e	16,37	60H1	5,72 e	18,28
5H2	5,70 e	18,57	79H2	5,85 f	15,21	62H1	6,10 f	12,85
273H3	5,90 f	15,71	91H2	5,90 g	14,49	80H3	6,12 f	12,57
CV ³ (%)	0,59			0,17			0,79	

Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro. *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira.

¹Raio médio da colônia (R.C). ²Inibição relativa (I.R). ³Coefficiente de variação (CV)

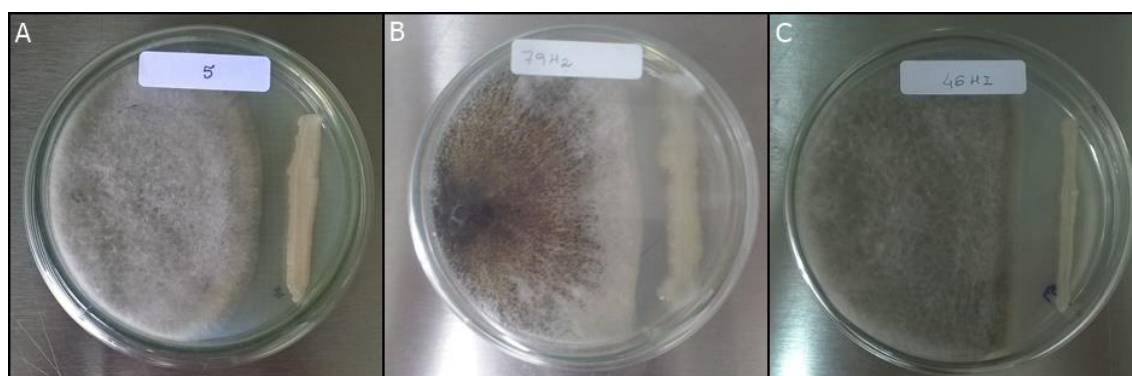


Figura 27: Teste de pareamento de culturas de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba* da região do pecíolo frente ao (A) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira; (C) *Colletotrichum fruticola*, isolado do cajueiro

A casca foi a região da planta com as taxas mais altas de inibição neste ensaio, sendo considerada a mais efetiva, chegando a quase 50% de inibição. Apesar de nenhum isolado se destacar obtendo uma ampla ação frente aos três fitopatógenos, observamos que os isolados da Hospedeira 2 merece atenção individualmente, já que os isolados 1H2 e 75H2 conseguiram a melhor taxa de inibição (43,05%) para o fitopatógeno do guaranazeiro, enquanto o isolado 18H2 teve o melhor desempenho (49,27%) frente ao fitopatógeno da mangueira, já o isolado 2H2 se destacou com 49,14% frente ao fitopatógeno do cajueiro (Tabela 13).

Tabela 13: Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos *Colletotrichum* spp. por bactérias endofíticas da casca (*Himatanthus sucuuba*), em testes de antagonismo *in vitro*

Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> *		Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> **		Isolados	<i>C. fruticola</i>	
	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)		R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)		R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
Controle	7,20 c	0,00	Controle	6,90 d	0,00	Controle	7,00 g	0,00
1H2	4,26 b	43,05	18H2	3,50 a	49,27	2H2	3,56 a	49,14
75H2	4,10 a	43,05	143H2	3,55 ab	48,55	67H2	3,66 b	47,71
24H3	4,10 a	42,63	22H2	3,66 abc	46,95	146H2	3,70 b	47,14
135H1	4,13 ab	42,63	39H1	3,70 bc	46,37	5H2	3,80 c	45,71
114H3	4,13 ab	42,63	93H2	3,70 bc	46,37	24H3	3,83 c	45,28
27H3	4,13 ab	42,36	162H3	3,70 bc	46,37	72H2	3,83 c	45,28
164H3	4,15 ab	42,22	27H3	3,73 c	45,94	162H3	3,93 d	43,85
116H3	4,16 ab	41,67	101H1	3,73 c	45,94	93H2	4,00 d	42,85
155H1	4,20 ab	41,25	155H1	3,75 c	45,65	35H3	4,13 e	41,00
101H1	4,23 ab	40,83	2H2	3,76 c	45,50	33H3	4,46 f	36,28
CV ³ (%)	1,19			1,53			0,75	

Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. **Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaraná. ***Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da manga. ¹Raio médio da colônia (R.C). ²Inibição relativa (I.R). ³Coeficiente de variação (CV)

Embora durante o pareamento não tenha ocorrido sobreposição da colônia bacteriana sobre os fitopatógenos, observou-se escurecimento do micélio do *Colletotrichum* spp. na região de influência dos possíveis metabólitos produzidos pelas bactérias. Tal fato foi citado por Kupper et al. (2003), observaram escurecimento do micélio de *C. acutatum* sob influência de isolados de *Bacillus subtilis*, apresentando com isto modificações celulares, como encurtamento das células e forte engrossamento das paredes das hifas do patógeno. Estas modificações provavelmente estão relacionadas com algum mecanismo de defesa do patógeno. Este efeito observado no micélio do patógeno

foi fungistático, pois o fungo voltou a crescer quando repicado para placas de Petri com BDA. Fuga (2013) relatou as mesmas observações no micélio de *Sclerotium cepivorum*, também através da ação do *B. subtilis*.

5.5.3 Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos pelos isolados endofíticos

Os 219 isolados analisados no item anterior, foram avaliados quanto à termoestabilidade e produção de metabólitos. As substâncias antagônicas produzidas pelas bactérias proporcionaram significativa redução no tamanho das colônias de *Colletotrichum* spp. das culturas frutíferas. Os maiores percentuais de inibição foram promovidos pelos isolados que se encontram descritos nas Tabelas 14-17, estes microorganismos destacaram-se, pois conseguiram inibir o crescimento dos fitopatógenos das três hospedeiras tropicais, revelando um grande espectro de ação, e, mostrando que os metabólitos produzidos demonstraram-se termoestáveis, mantendo suas atividades mesmo após a autoclavagem (Figuras 28-30).

Esse desempenho pode ser comparado aos obtidos por Bettiol e Kimati (1990) ao estudarem o efeito de *B. subtilis* sobre *Pyricularia oryzae*, pois verificaram que a multiplicação da bactéria em meio líquido, com agitação constante, liberou metabólitos em concentrações suficientes para inibir significativamente o crescimento micelial do fungo.

Na tabela 14, destaca-se o isolado 96H1 que se mostrou efetivo frente os três fitopatógenos, obtendo os maiores índices de inibição, mesmo este, não tendo obtido resultados tão expressivos no ensaio de cultura pareada. Observamos também que alguns isolados que se apresentam nesta tabela, não chegaram a atingir índices significativos no ensaio anterior, contudo não aparecendo entre os dez melhores, como é o caso dos isolados 7H1, 16H1, 50H1, 85H1, 93H1, 112H1, 121H1 e 123H1. Isso pode estar relacionado com fatores descritos no parágrafo anterior, como também relacionados com fatores ambientais que influenciam diretamente no crescimento e metabolismo bacteriano (Tabela 14 e Figura 28).

Tabela 14: Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. por bactérias endofíticas da Hospedeira 1 (*Himantanthus sucuuba*) em teste de termoestabilidade

Tratamento	<i>C. gloeosporioides</i> *		<i>C. gloeosporioides</i> **		<i>C. fruticola</i>	
	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
Controle	4,40 i	0,00	4,40 i	0,00	4,00 i	0,00
5H1	1,23 a	72,04	1,67 gh	62,04	1,13 b	71,75
7H1	1,27 a	71,13	0,83 b	81,13	1,13 b	71,75
14H1	1,47 ef	66,59	1,60 fg	63,63	1,93 gh	51,75
16H1	1,80 gh	59,09	1,43 de	67,50	1,93 gh	51,75
29H1	1,97 gh	55,22	1,57 ef	64,31	2,00 h	50,00
45H1	1,33 cd	69,77	1,87 gh	57,50	1,27 ab	68,25
46H1	2,00 gh	54,54	1,37 cd	68,86	1,83 g	54,25
50H1	1,90 gh	56,81	1,67 gh	62,04	2,00 h	50,00
85H1	1,53 fg	65,22	1,07 bc	75,68	1,50 def	62,50
93H1	1,33 cd	69,77	1,37 cd	68,86	1,27 ab	68,25
96H1	0,90 a	79,54	0,50 a	88,63	0,80 a	80,00
103H1	1,83 gh	58,40	2,03 h	53,86	1,93 gh	51,75
106H1	2,00 gh	54,54	1,97 gh	55,22	1,87 gh	53,25
107H1	1,53 fg	65,22	2,00 gh	54,54	1,57 ef	60,75
109H1	2,03 gh	53,86	0,50 a	88,63	2,00 h	50,00
110H1	2,17 h	50,68	1,33 cd	69,77	1,90 gh	52,50
111H1	1,17 a	73,40	0,86 b	80,45	0,76 a	81,00
112H1	1,80 gh	59,09	1,07 bc	75,68	1,63 f	59,25
114H1	1,67 gh	62,04	0,93 b	78,86	1,63 f	59,25
115H1	1,97 gh	55,22	1,87 gh	57,50	1,27 ab	68,25
117H1	1,87 gh	57,50	1,77 gh	59,77	1,37 cd	65,75
119H1	1,60 fg	63,63	0,50 a	88,63	1,43 cde	64,25
121H1	1,53 fg	65,22	1,90 gh	56,81	0,70 a	82,50
123H1	1,37 de	68,86	1,30 cd	70,45	1,37 cd	65,75
CV ³ (%)	10,96		10,23		12,41	

Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey **Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro. ***Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira. ¹Raio médio da colônia (R.C). ²Inibição relativa (I.R). ³Coefficiente de variação (CV)

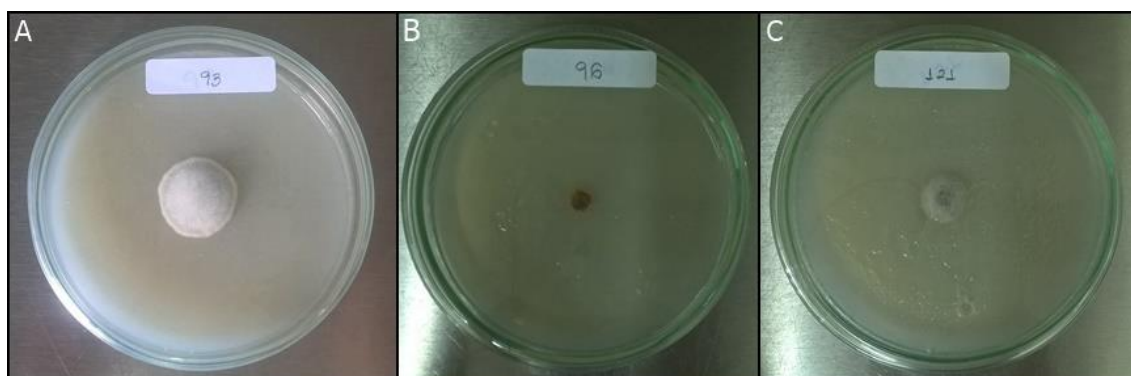


Figura 28: Teste de termoestabilidade de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba* Hospedeira 1 frente ao (A) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira; (C) *Colletotrichum frutícola*, isolado do cajueiro

Já na Tabela 15, os isolados se destacaram de forma individual, o isolado 70H2 teve melhor desempenho (68,33%) frente ao fitopatógeno do guaranazeiro, o 137H2 foi melhor (71,39%) frente ao fitopatógeno da mangueira e o 10H2 (70,00%) frente ao fitopatógeno do cajueiro. No entanto nem o isolado 70H2 e nem o 10H2, obtiveram índices significativos para aparecerem entre os dez melhores no ensaio anterior, o que nos remete às mesmas hipóteses apresentadas no parágrafo anterior (Tabela 15 e Figura 29).

Tabela 15: Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. por bactérias endofíticas da Hospedeira 2 de (*Himatanthus sucuuba*) em teste de termoestabilidade

Tratamento	<i>C. gloeosporioides</i> *		<i>C. gloeosporioides</i> **		<i>C. fruticola</i>	
	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
Controle	4,20 f	0,00	4,30 d	0,00	4,00 c	0,00
9H2	1,77 c	57,85	1,30 ab	69,76	2,00 c	50,00
10H2	1,90 de	54,76	1,63 bc	62,09	1,20 a	70,00
14H2	2,00 e	52,38	2,03 c	52,79	1,97 c	50,75
22H2	1,87 de	55,47	1,77 bc	58,83	2,00 c	50,00
70H2	1,33 a	68,33	1,60 bc	62,79	1,77 bc	59,77
85H2	1,83 cd	56,42	2,03 c	52,79	1,53 bc	61,75
136H2	1,97 de	53,09	1,93 c	55,11	1,57 bc	60,75
137H2	1,53 b	63,57	1,23 a	71,39	1,87 bc	53,25
143H2	2,00 e	52,38	1,87 c	56,51	1,63 bc	59,25
164H2	1,87 de	55,47	2,03 c	52,79	1,33 ab	66,75
205H2	1,50 b	64,28	1,67 bc	61,16	1,47 bc	63,25
209H2	1,93 de	54,04	1,80 bc	58,13	2,00 c	50,00
CV ³ (%)	3,03		11,07		11,46	

Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey **Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro. ***Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira. ¹Raio médio da colônia (R.C). ²Inibição relativa (I.R).

³Coefficiente de variação (CV)

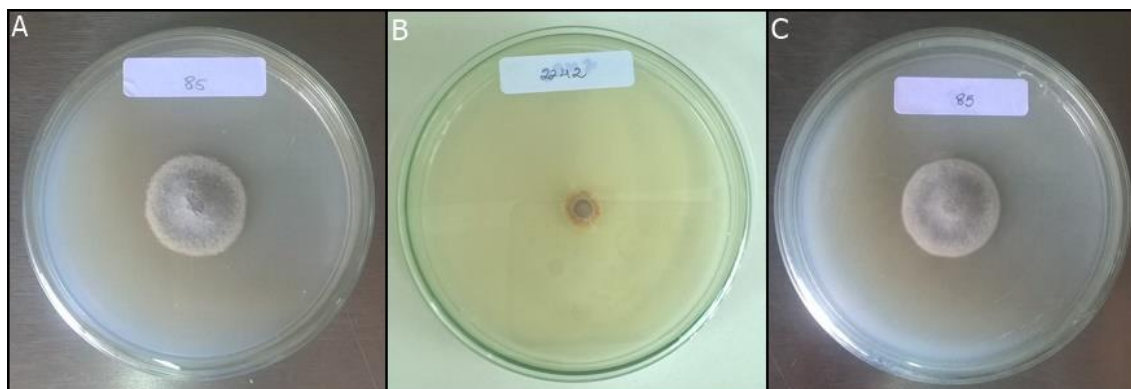


Figura 29: Teste de termoestabilidade de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba* Hospedeira 2 frente ao (A) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira; (C) *Colletotrichum frutícola*, isolado do cajueiro

Quanto à Tabela 16 os isolados 220H3 (72,04%) e 248H3 (72,72%) tiveram os melhores índices de inibição frente ao fitopatógeno do guaranazeiro, já o isolado 24H3, foi melhor frente aos demais fitopatógenos, 88,37% para a mangueira e 75,68% para o cajueiro (Tabela 16 e Figura 30).

Tabela 16: Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. por bactérias endofíticas da Hospedeira 3 de (*Himatanthus sucuuba*) em teste de termoestabilidade

Tratamento	<i>C. gloeosporioides</i> *		<i>C. gloeosporioides</i> **		<i>C. fruticola</i>	
	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
Controle	4,40 f	0,00	4,30 e	0,00	4,40 g	0,00
24H3	1,67 cd	62,04	0,50 a	88,37	1,07 a	75,68
103H3	1,67 cd	62,04	1,80 bc	58,13	2,20 f	50,00
104H3	1,27 ab	71,13	2,03 d	52,79	2,20 f	50,00
105H3	1,53 bc	65,22	1,43 b	66,74	1,47 b	66,59
107H3	1,87 d	57,50	1,50 b	65,11	2,03 ef	53,86
193H3	1,47 bc	66,59	2,00 cd	53,48	1,80 de	59,09
202H3	1,87 d	57,50	1,97 cd	54,18	2,20 f	50,00
204H3	2,20 e	50,00	2,00 cd	53,48	2,20 f	50,00
207H3	1,77 cd	59,77	2,03 d	52,79	1,53 bc	65,22
216H3	1,77 cd	59,77	2,00 cd	53,48	1,83 de	58,40
217H3	1,30 ab	70,45	1,97 cd	54,18	1,80 de	59,09
220H3	1,23 a	72,04	1,80 bc	58,13	2,07 ef	52,95
221H3	1,60 cd	63,63	2,03 d	52,79	2,03 ef	53,86
247H3	1,63 cd	62,04	1,77 bc	58,83	1,93 ef	56,13
248H3	1,20 a	72,72	1,97 cd	54,18	1,60 cd	63,63
CV ³ (%)	7,00		4,20		6,77	

Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey **Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro. ***Colletotrichum*

gloeosporioides, isolado da mangueira. ¹Raio médio da colônia (R.C). ²Inibição relativa (I.R).
³Coefficiente de variação (CV)

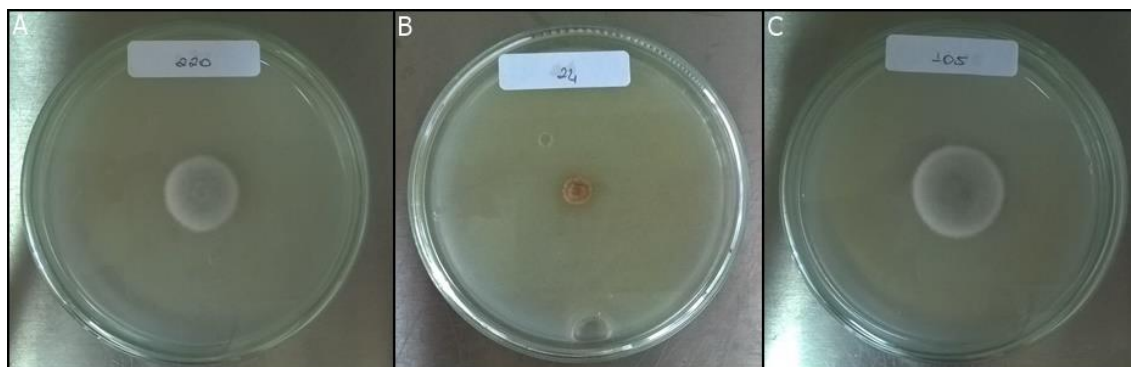


Figura 30: Teste de termoestabilidade de bactérias endofíticas isoladas de *Himatanthus sucuuba* Hospedeira 3 frente ao (A) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira; (C) *Colletotrichum frutícola*, isolado do cajueiro

Os isolados da região do pecíolo não obtiveram resultados significativos neste ensaio, por este motivo não possuem isolados destacados. Já da casca, o isolado 154H1 teve o melhor índice de inibição (86,66%) frente ao fitopatógeno do guaranazeiro, 93H2 (82,19%) foi melhor frente ao fitopatógeno da mangueira e 33H3 (87,67%) foi melhor frente ao fitopatógeno do cajueiro. Com exceção do isolado 154H1, os demais tiveram resultados expressivos no ensaio de cultura pareada, demonstrando assim seu amplo espectro tanto em meio estático, quanto em meio submetido à agitação e posteriormente autoclavagem (Tabela 17).

Tabela 17: Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. por bactérias endofíticas da casca (*Himatanthus sucuuba*) em teste de termoestabilidade

Tratamento	<i>C. gloeosporioides</i> *		<i>C. gloeosporioides</i> **		<i>C. fruticola</i>	
	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
Controle	4,50 j	0,00	4,10 d	0,00	4,30 h	0,00
1H2	1,93 h	57,11	1,67 bc	59,26	1,30 ef	69,09
16H3	1,07 cd	76,22	1,57 bc	61,70	1,60 fg	62,79
18H2	1,50 f	66,66	1,53 bc	62,68	1,27 ef	70,46
19H2	0,93 b	79,33	2,00 c	51,21	1,20 de	72,09
22H2	2,00 h	55,55	0,77 a	81,21	1,67 fg	61,16
24H3	1,33 e	70,44	1,23 ab	70,00	0,86 bc	80,00
27H3	2,20 i	51,11	2,00 c	51,21	2,00 g	53,48

Continua ...

Tratamento	<i>C. gloeosporioides</i> *		<i>C. gloeosporioides</i> **		Conclusão <i>C. fruticola</i>	
	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)	R.C ¹ (cm)	I.R ² (%)
33H3	0,70 a	84,44	0,93 a	77,31	0,53 a	87,67
72H1	1,93 h	57,11	1,53 bc	62,68	1,43fg	66,74
75H2	1,33 e	70,44	1,23 ab	70,00	1,37 ef	68,13
76H2	1,10 d	75,55	2,00 c	51,21	1,07 de	75,11
93H2	0,93 b	79,33	0,73 a	82,19	1,17 de	72,79
94H2	1,13 d	74,88	1,17 ab	71,46	0,93 cd	78,37
102H2	1,10 d	75,55	1,53 bc	62,68	1,60 fg	62,79
129H1	1,93 h	57,11	0,97 a	76,34	1,53 fg	64,41
136H1	0,96 bc	78,66	1,53 bc	62,68	1,47 fg	65,81
137H1	1,27 e	71,77	1,83 c	55,36	1,87 fg	56,51
143H2	0,93 b	79,33	1,00 a	75,60	1,23 ef	71,39
144H2	0,87 b	80,66	2,00 c	51,21	0,83 bc	80,69
145H2	0,87 b	80,66	0,93 a	77,31	1,15 de	73,25
153H1	1,67 g	62,88	1,77 c	56,82	1,87 fg	56,51
154H1	0,60 a	86,66	1,23 ab	70,00	0,63 ab	85,34
174H1	1,50 f	66,66	1,67 bc	59,26	1,47 fg	65,81
CV ³ (%)	6,12		10,58		15,93	

Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey **Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro. ***Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira. ¹Raio médio da colônia (R.C). ²Inibição relativa (I.R). ³Coefficiente de variação (CV)

Outros isolados obtiveram efeito contrário, estimulando o crescimento do patógeno, ultrapassando o crescimento da testemunha, como foi o caso dos isolados descritos na Tabela 18. Neste caso, o que se supõe, é que a molécula que atuava na inibição dos fitopatógenos, durante o processo de autoclavagem tenha se desnaturado, e alguma outra molécula se ativado, estimulando o crescimento micelial desses fungos (Figura 31).

Tabela 18: Bactérias endofíticas de *Himatanthus sucuuba* que estimularam o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. através do teste de termoestabilidade

Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> *	<i>C. gloeosporioides</i> **	<i>C. fruticola</i>
¹ HOSP 1 Controle	4,4	4,4	4,0
38H1	-	-	4,5
82H1	4,5	-	-
108H1	4,5	-	-
118H1	4,5	-	4,5
² HOSP 2 Controle	4,2	4,3	4,0

Continua ...

Isolados	Conclusão		
	<i>C. gloeosporioides</i> *	<i>C. gloeosporioides</i> **	<i>C. fruticola</i>
7H2	-	4,5	4,5
9H2	4,5	4,5	-
18H2	-	-	4,5
32H2	4,5	-	4,5
35H2	-	-	4,5
39H2	4,5	4,5	4,5
41H2	4,5	-	-
44H2	4,5	4,5	-
53H2	-	-	4,5
59H2	4,5	-	4,5
61H2	-	-	4,5
64H2	4,5	-	-
74H2	4,5	-	4,5
79H2	4,5	-	-
91H2	4,5	4,5	4,5
96H2	-	-	4,5
³ HOSP 3 Controle	4,4	4,3	4,4
122H3	-	4,5	4,5
131H3	4,5	-	-
149H3	-	-	4,5
178H3	-	4,5	4,5
189H3	-	4,5	4,5
98H3	4,5	4,5	4,5
280H3	4,5	-	-
315H3	-	4,5	-

Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro. *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira. ¹HOSP, Hospedeira 1. ²HOSP, Hospedeira 2. ³HOSP, Hospedeira 3

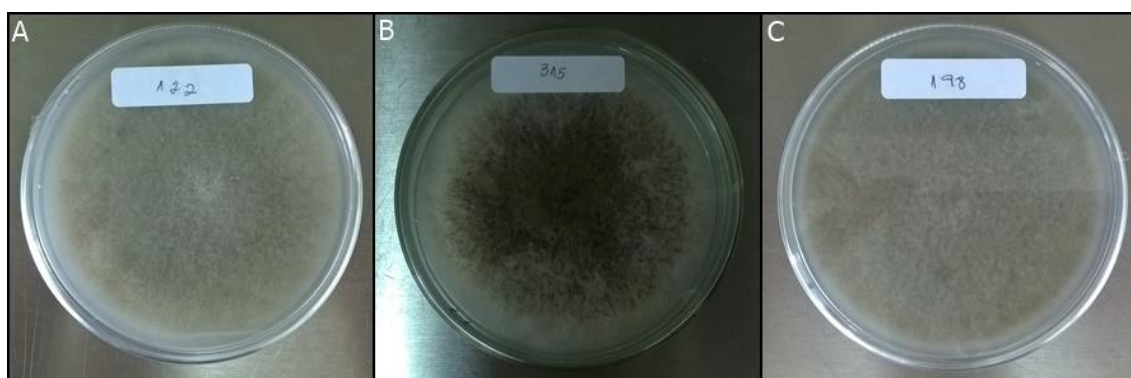


Figura 31: Bactérias endofíticas de *Himatanthus sucuuba* que estimularam o crescimento micelial dos fitopatógenos (A) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do guaranazeiro; (B) *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mangueira; (C) *Colletotrichum fruticola*, isolado do cajueiro

Na literatura encontram-se pesquisas avaliando termoestabilidade de metabólitos produzidos por bactérias com resultados positivos sobre outros patógenos, corroborando

com os resultados encontrados neste trabalho. Soria et al. (2012) ao estudarem o efeito de *B. subtilis* e *Burkholderia* sp. sobre *Fusarium circinatum*, verificaram que ao utilizar meio de cultura BDA acrescido de 10% de meio BD autoclavado contendo metabólitos termoestáveis inibiram em até 50% o crescimento micelial do fungo, após quatro dias de incubação. Kupper et al. (2003) relataram a produção de metabólitos termoestáveis de 67 isolados de *Bacillus* capazes de inibir o crescimento micelial de *C. acutatum*.

A produção rápida e eficiente de metabólitos termoestáveis pelas bactérias endofíticas tornam estes organismos atraentes para estudos de controle biológico. A constatação da produção de substâncias inibidoras ao *Colletotrichum* spp., produzidas pelos diversos isolados, é especialmente importante para o entendimento do mecanismo de ação de tal antagonismo, possibilitando, dessa forma, o controle da doença pelo uso das substâncias produzidas e, não apenas pela introdução massal dos agentes de biocontrole.

6 CONCLUSÕES

A comunidade bacteriana endofítica cultivável de *H. sucuba* foi constituída por diferentes gêneros: *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Ochrobactrum* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. e a classe Betaproteobacteria. Este é o primeiro estudo da comunidade endofítica de sucuba.

Dentre os isolados obtidos e estudados, a classe Betaproteobacteria foi a mais frequente, sendo obtida em todos os tecidos avaliados.

Baseado nos ensaios *in vitro* grande parte dos isolados apresentaram atividade quanto à síntese de AIA, mas o que merece destaque em expressividade é o isolado 37H2 identificado como *Klebsiella*.

Quanto à fixação de nitrogênio a classe Betaproteobacteria foi a predominante.

Já na solubilização de fosfato, quem se destacou foram os gêneros *Enterobacter* e *Pantoea*. Demonstrando com isso, seu potencial para promover o crescimento vegetal.

Nos testes *in vitro* de controle biológico frente ao agente causal da antracnose *Colletotrichum* spp. as linhagens bacterianas apresentaram potencial para controlar *in vitro* os fitopatógenos avaliados, dando destaque para os isolados da classe Betaproteobacteria que reduziram substancialmente o crescimento dos fungos das três culturas frutíferas tropicais.

Em uma próxima etapa, será analisado o efeito das bactérias endofíticas que demonstraram bons resultados no presente estudo quando inoculadas em culturas de interesse comercial da região Amazônica, como o guaranazeiro, assim como o efeito de possíveis consórcios no crescimento e controle biológico do guaraná e das demais culturas testadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARI, G.A. et al. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat root. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 4, p. 523-529, 2007.
- AMBROSINI, A. et al. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Soil**, v. 356, p. 245-264, 2012.
- AMORIM, L. et al. Manual de fitopatologia. 4. ed. Piracicaba: **Editora Agronômica Ceres**, 2011. 704p.
- ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M.A. Bioindicadores para uma análise de risco ambiental. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 34, p. 13-21, 2005.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Org.). **Fungi: multifaceted microbes**. p. 189-207, 2007.
- ARAVIND, R. et al. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis thorne*) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**, v. 29, p. 318-324, 2010.
- ALVES, G.C. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- ASSUMPÇÃO, L.C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.
- ANDREOTE, F.D. et al. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of microbiology**, v. 42, n. 3, p. 169-173, 2004.
- BABALOLA, O.O.; ODHIAMBO, G.D. Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* '10 mkr 7' on striga suicidal germination in *Zea mays*. **World Applied Sciences Journal**, v. 3, n. 1, p. 57-62, 2008.
- BABALOLA, O.O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 11, p. 1559-70, 2010.
- BACON, C.W.; HINTON D.M. Microbial endophytes: Future challenges. **Advances in Endophytic Research**, n. 7, p. 441-451, 2014.
- BAILEY, A.J.; JEGER, J.M. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Reista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 131-133, 2006. **British Society for Plant Pathology**, Oxford, p. 388, 1992.

- BALACHANDAR, D. et al. Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in plants nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 707-712, 2006.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-79, 2005.
- BALDOTTO, L.E.B. et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.
- BARRETTI, P.B. et al. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 731-739, 2008.
- BARROSO, C.B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 529-535, 2008.
- BATISTA, B.D. Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbillis*) 2012. 129f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.
- BENCHIMOL, R.L. et al. 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.
- BENEDUZI, A. et al. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in Southern Brazil. **Research in Microbiology**. v. 159, p. 244-250, 2008.
- BENTES, J.L.S.; BARRETO, R.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. agente causal da antracnose do guaranazeiro. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, p. 129-131, 2004.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-13, 2009.
- BERGER, B. et al. Nitrogen supply influences plant growth and transcriptional responses induced by *Enterobacter* 81 radicincitans in *Solanum lycopersicum*. **Plant and Soil**, v. 370, n. 1-2, p. 641-652, 2013.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, p. 1165-1174, 1990.
- BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

- BOMFIM, M.P. et al. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.
- BONATELLI, M.L. Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose. 2012. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.
- BONETT, L.P. et al. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra agente causal da antracnose em feijoeiro comum. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 1, p. 27-35, 2013.
- BRASIL, M.S. Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz. 2005. 136f. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.
- BRIC, J.M. et al. Rapid *in situ* assay for indoleacetic-acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 535–538, 1991.
- BULHÕES, C.C. et al. Produtos alternativos no controle de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), cladosporiose (*Cladosporium herbarum*) e bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) em maracujazeiro no Norte do Mato Grosso. **Revista Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, Mato Grosso, v. 7, n. 1, p. 12-19, 2012.
- CASTRO, R.A. Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga-SP. 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Meio Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- CHAGAS JUNIOR, A.F. et al. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e manuseio. 2. ed. Lavras, 1990. 793p,
- CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance. **Microbiological Research**, v. 164, p. 493-513, 2009.
- CHUBATSU, L.S. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1, p. 197-207, 2012.
- COMPANT, S. et al. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanism involved and prospects for utilization. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, n. 30, p. 669-678, 2010.
- COSTA NETO, P.Q. Caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos *Colletotrichum* spp. isolados do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K. (Mart.) Ducke). 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

- CUNHA, M.M. et al. Manga fitossanidade. Brasília: Mandioca e Fruticultura - EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, **Frutas do Brasil**, Brasília, v. 6, p. 104, 2000.
- DALLA SANTA, O.R. et al. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 843-850, 2004.
- DEAN, R. et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.
- DE SOUZA MOREIRA, F.M. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.
- DIAS, A.C.F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.
- DONATO, V.M.T.S. et al. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 134-141, 2005.
- DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Washington, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J. et al. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. **Embrapa-SPI**, Itaguaí, 1995. 60p.
- DROGUE, B. et al. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants. **Research in Microbiology**, France, v. 163, p. 500- 510, 2012.
- DUDEJA, S.S. et al. Interaction of endophytic microbes with legumes. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 248-260, 2012.
- ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P.V. A revised classification of the Apocynceae s.l. **The Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000.
- ETHUR, L.Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.
- FERNANDES, M.Z.L.C.M. et al. Determinação da toxicidade aguda de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson (Apocynaceae) em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 81, p. 98-100, 2000.
- FISHER, I.H. et al. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. **Agronômica Ceres**, Piracicaba, p. 467-474, 2005.
- FORCHETTI, G. et al. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): Isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1145-1152, 2007.
- FRANCHE, C. et al. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plants and Soil**, Dordrecht, v. 321, p. 35-59, 2009.

- FRANZOLIN, M.R. Fundamentos da identificação bioquímica das bactérias. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, São Paulo, p. 463-476, 2008.
- FUGA, C.A.G. Prospecção de microrganismos e substância de origem vegetal para o controle de *Sclerotium cepivorum*. 2013. 43f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba – Minas Gerais, 2013.
- GOVINDARAJAN, M. et al. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 997-1006, 2007.
- GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 83-93, 2002.
- HARDOIM, P.R. et al. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.
- HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.
- IGUAL, J.M. et al. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agricultural: Use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, v. 21, n. 2, p. 561-568, 2001.
- INIGUEZ, A.L. et al. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 18, n. 2, p. 169-178, 2005.
- JADOSKI, S.O. et al. Características da lixiviação de nitrato em áreas de agricultura intensiva. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 3, n. 1, p. 193-200, 2010.
- JHA, C.K.; SARAF, M. Hormonal signaling by PGPR improves plant health under stress conditions. In: MAHESHWAR, D.K. (Ed.). *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. **Springer-Verlag**, p. 119-140, 2012.
- KANG, S.M. et al. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 277- 281, 2009.
- KAVAMURA, V.N. et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.
- KHALID, A. et al. Screening plantgrowth-promoting rhizobacteria for improving growth and yeld of wheat. **Journal of Appled Microbiology**, v. 96, p. 473-480, 2004.
- KHAN, M.S. et al. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, p. 29-43, 2007.
- KUDAN, S.; PICHYANGKURA, R. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* SK-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 23–35, 2009.

- KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, New York, v. 6, p. 1244-1251, 2004.
- KUPPER, K.C. et al. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 251-257, 2003.
- KUPPER, K.C. et al. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum* agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.
- KUSS, A.V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.
- LEE, S. et al. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter* 88 diazotrophicus strains with mutations in cytochrome biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 16, p. 5384-91, 2004.
- LIMA FILHO, R.M. et al. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 620-625, 2003.
- LIRA, C.L. et al. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 122-129, 2012.
- LOIRET, F.G. et al. A putative new endophytic nitrogenfixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 504-511, 2004.
- LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. Doenças do pimentão: Diagnose e controle. **Embrapa Hortaliças**, Brasília, p. 26, 2003.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369-409, 1993.
- MARIANO, R.L.R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.
- MARCHIORO, L.E.T. Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.
- MARRA, L.M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, p. 289-307, 2012.
- MARQUES, H.I.P. et al. Inibição do crescimento micelial de *Trichoderma harzianum* por fertilizantes líquidos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 2040, 2014.
- MEJÍA, L.C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, v. 46, p. 4-14, 2008.

- MELNICK, R. L. et al. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**, v. 46, p. 46-56, 2008.
- MELNICK, R.L. et al. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. **Biological Control**, v. 57, p. 236-245, 2011.
- MELLO, S.C.M.; SILVA, J.B.T. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 2007.
- MENDOZA, A.R.; SIKORA, R.A. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **Biological Control**, v. 54, p. 263-272, 2009.
- MIRANDA, A.L.P. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p. 284-286, 2000.
- MORALES-GARCÍA, Y. et al. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 43, n. 4, p. 287-293, 2011.
- MOTA, A.J. et al. A practical and rapid microplate method for yeast genomic DNA extraction. In: **Mycoses**. Commerce Place, 350 Main ST, Malden 02148, MA USA: Wiley-Blackwell Publishing, INC, p. 94-94, 2009.
- NAIR, D.N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-11, 2014.
- NAIK, P.R. et al. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonas isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, London, v. 8, p. 230, 2008.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 265-270, 1999.
- OTEINO, N. et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2015.
- OLIVEIRA, S.J., Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia veterinária. Canoas, 2. ed, 2000. 260p.
- PERES, F. et al. Os impactos dos agrotóxicos sobre a saúde e o ambiente. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 4, 2007.
- PINOTTI, M.M.Z.; SANTOS, J.C.P. From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1797-1803, 2013.
- PEREIRA, J.A. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. 1993. 135f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1993.

- PEREIRA, M. et al. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.
- PERDUE, G.P.; BLOMSTER, R.N. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus succuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 9, p. 1322-1323, 1978.
- PLOETZ, R.C. Mango diseases caused by fungi: Antracnose. In: PLOETZ, R.C. et al. (Eds.). **Compendium of Tropical Fruit Diseases**, Minnesota, p. 35-36, 1994.
- PLUMEL, M.M. Le genre *Himatanthus* (Apocynaceae). Révision taxonomique. **Bradea**, v. 5, p. 118, 1991.
- PELZER, G.Q. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.
- PÉREZ-GARCÍA, A. et al. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of *Bacillus* in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 187-193, 2011.
- QUINN, P.J. et al. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: Diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, Marburg, v. 6, n. 4, p. 139-144, 1998.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: Bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.
- RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, Washington, v. 156, p. 989-996, 2011.
- RODRIGUES, A.A. et al. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária**, Goiânia, v. 46, n. 2, p. 149-158, 2016.
- ROHLFS, M.; CHURCHILL, A.C.L. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 23-34, 2011.
- SALA, V.M.R. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 3, p. 345-352, 2005.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. p. 2344, 2001.
- SCHULZ; B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SEVILLA, M. et al. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif mutant strain. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 358:366, 2001.

SERRANO, L.A.; CATTANEO, L.F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 657-959, 2010.

SHIOMI, H.F. Bioprospecção de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole da mancha de *Exserohilum turcicum* e como promotoras do crescimento de plantas do milho (*Zea mays* L.). 2007. 57f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

SILVA, M.C.S. Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.). 2015. 76f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2015.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por micro-organismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311-319, 2000.

SILVA, M.O. et al. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 4, p. 1113-1121, 2012.

SILVA, L.M. et al. Seleção de material genético de cajueiro resistente à antracnose. **Anais do 8º Seminário Anual de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pesquisa da Universidade Federal Rural da Amazônia**, 2010.

SILVA, J.R.A. et al. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, v. 21, p. 702-704, 1998.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SINGH, N. et al. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1669-1679, 2008.

SOBRAL, J.K. et al. Aspectos gerais de micro-organismos endofíticos. In: ARAÚJO, W.L. et al. (Ed). Micro-organismos endofíticos: Aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização. Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, p.11-27, 2014.

SPAEPEN, S. et al. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

SPAEPEN, S. et al. Effects of *Azospirillum brasilense* índole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant Soil**, v. 312, p.15-23, 2008.

SPINA, A.P. Estudos taxonômicos, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. Ex Shult (Apocinaceae: Rauvolfioideae-plumeiae). 2004. 191f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

- SORIA, S. et al. Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg e O'Donnell. **Journal Agricultural Research**, v. 72, p. 281-284, 2012.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª. Ed., 2003. 604p.
- STEPNIEWSKA, Z.; KUZNIAR, A. Endophytic microorganisms-promising applications in bioremediation of greenhouses gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 22, p. 9589-9596, 2013.
- STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of natural products**, Pittsburg, v. 67, p. 257-258, 2004.
- SOUZA, R.D. et al. Antagonistic activity to pathogenic microorganisms by endophytic bacteria isolated from *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 3, p. 229-232, 2015.
- SOUZA, A.J. et al. Solubilização de fosfato inorgânico por bactérias diazotróficas sob diferentes doses do pesticida fipronil. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX-UFRPE: Recife, 2013.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V.J. et al. Strategies for characterization of agriculturally important bacteria. In: SINGH, D.P. et al. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. **Springer**, p. 1-21, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TAURIAN, T. et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: Screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, v. 329, n. 1-2, p. 421-431, 2010.
- TSUI, S. Diversidade de bactérias endofíticas cultiváveis do guaranazeiro e o controle da antracnose. 2012. 69f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- TORTORA, G.J. et al. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934p.
- TROTEL-AZIZ, P. et al. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, p. 21-32, 2008.
- TSAVKELOVA, E.A. et al. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 188, p. 655-664, 2007.
- VARMA, A. et al. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2741-2744, 1999.
- VAZQUEZ, P. et al. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 460-468, 2000.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

WAKELIN, S.A. et al. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 40, p. 36-43, 2004.

WOOD, C.A. et al. Bioactive spirolactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 1477-1478, 2001.

YU, X. et al. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 138-145, 2011.

ZHANG, Y.F. et al. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. **Chemosphere**, v. 83, p. 57-62, 2011.

ZHAO, Z. et al. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 292-297, 2010.