

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO EM CACAUEIRO: ESTUDOS TAXONÔMICOS
E DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS.**

HIANNA ALMEIDA CÂMARA LEITE

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2008

HIANNA ALMEIDA CÂMARA LEITE

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO EM CACAUEIRO: ESTUDOS TAXONÔMICOS
E DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS.**

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.**

**Área de concentração: Genética de
Microrganismos.**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2008

HIANNA ALMEIDA CÂMARA LEITE

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO EM CACAUEIRO: ESTUDOS TAXONÔMICOS
E DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS.**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética de
Microrganismos.

APROVADA em 31 de julho de 2008:

Prof^a. Dr^a Edna Dora Newman Luz.
(UESC/ CEPLAC)

Dr. Alan William Vilela Pomella
(Laboratório de Biocontrole
Farroupilha-MG)

Prof. Dr. Eduardo Gross
(UESC)

Prof^a. Dr^a. Karina Peres Gramacho
(CEPLAC / UESC – Co-orientadora)

Dedicatória

À minha família: meu esposo, nosso filhinho, meus pais... A eles dedico este trabalho, pois souberam perder do meu tempo, da minha atenção, da minha companhia, para que eu pudesse crescer, pessoalmente e profissionalmente. Espero, um dia, poder recompensá-los.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força, saúde, me revigorando durante os momentos em que eu achava que não conseguiria prosseguir, por ter cuidado dos meus queridos nos momentos em que eu não pude estar presente. À minha família, meu esposo, meu filho, meus pais pelo apoio, carinho e compreensão.

Minha gratidão especial ao meu orientador Prof. Dr. Leandro Loguercio, por ser mais do que um professor, mas um verdadeiro “mestre” tanto das questões científicas quanto da vida. Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza, por ter compartilhado seus estudos preliminares e conhecimentos sobre este trabalho e à Prof.^a Dr.^a Karina Peres Gramacho pelos conselhos, ajustes metodológicos e à atenção com que sempre me recebeu. À FAPESB pela concessão da bolsa, de grande importância para minha manutenção durante os estudos. Ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular Genética e Biologia Molecular, especialmente, à Prof.^a Dr.^a Fernanda Gaiotto e ao Prof. Dr. Ronan Xavier. Aos professores integrantes do programa e também pesquisadores da CEPLAC, Prof.^a Dr.^a Edna Dora Newman Luz, Prof. Dr. Luiz Bezerra, pela constante acessibilidade ao serem procurados na solução de dúvidas e problemas. Ao Prof. Dr. George Sodré por suas contribuições na montagem dos experimentos em casa-de-vegetação, incluindo as análises de solo. Ao Prof. Dr. Fábio Gomes, pelo tempo que dispensou em me ajudar durante a coleta e análise dos dados referentes às trocas gasosas. À “nossa” secretaria do colegiado do PPGGBM, Luciana Calazans, sempre disposta a nos ajudar.

À CEPLAC pela cessão de toda a estrutura do CEPEC, onde a pesquisa foi realizada, incluindo os laboratórios e seus equipamentos e casa-de-vegetação. Também a todos os funcionários da CEPLAC e colegas, especialmente dos laboratórios de Fitopatologia, Fitopatologia Molecular e Biotecnologia do CEPEC, pela colaboração em diversos momentos. Aos meus colegas de curso, que apesar de envolvidos com as suas próprias atividades, sempre se mostraram prestativos, acessíveis e companheiros. A todos aqueles que direta ou indiretamente me apoiaram durante esta etapa da minha vida.... minha sincera gratidão.

*“De tudo, ficarão três coisas:
A certeza de estar sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de ser interrompido antes de
terminar...”*

*Façamos da interrupção um caminho novo
Da queda, um passo da dança
Do medo, uma escada
Do sonho, uma ponte
Da procura, um encontro...”*

Fernando Sabino

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
EXTRATO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Microrganismos Endofíticos – conceito e histórico	03
2.2. Relação entre endofítico e hospedeiro.....	05
2.3. Penetração e colonização sistêmica dos endofíticos nas plantas.....	07
2.4. Principais espécies de microrganismos endofíticos	08
2.4.1. Fungos	09
2.4.2. Bactérias.....	10
2.5. Endofíticos e potenciais aplicações biotecnológicas.....	12
2.5.1. Promoção de crescimento	12
2.5.2. Indução de resistência sistêmica	14
2.5.3. Produção de fármacos e outros metabólitos secundários	16
2.5.4. Incremento à fitorremediação	17
2.5.5. Controle biológico	18
2.6. Ferramentas moleculares aliadas às pesquisa com endofíticos	20
2.7. Cacao como planta-modelo para o estudo	22
3. METODOLOGIA	24
3.1. Cultivo e manutenção dos estoques dos isolados 344 e 629.	24

3.2. Relação entre UFC e densidade ótica para os isolados 344 e 629, utilizando diluições seriadas	24
3.3. Extração de DNA genômico dos isolados.....	25
3.4. Obtenção de mutantes resistentes a antibióticos para estudos de colonização	25
3.5. RAPD para comparação entre mutantes e isolados selvagens	26
3.6. Estudos metodológicos para inoculação de endofíticos em mudas de cacau e análise da colonização e de efeitos na promoção de crescimento.....	27
3.6.1. Experimento de Inoculação I.....	27
3.6.2. Experimento de Inoculação II.....	29
3.6.3 – Experimento de Inoculação III.....	31
3.7. Efeitos da colonização endofítica nas taxas fotossintéticas e trocas gasosas	33
3.8. Análises Estatísticas	33
3.9. Seqüenciamento dos genes <i>16S rDNA</i> , <i>hsp-60</i> e <i>rpo-B</i>	34
3.10. Identificação molecular dos isolados endofíticos recuperados pós-inoculação.....	35
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	37
4.1. Morfologia das colônias dos isolados 344 e 629.....	37
4.2. Análise de conversão entre Unidades Formadoras de Colônias e densidade ótica das suspensões bacterianas dos isolados 344 e 629.....	38
4.3. Obtenção de mutantes resistentes a antibióticos para estudos de colonização	41
4.4. Estudo da metodologia para inoculação de endofíticos em mudas de cacau	44
4.4.1. Experimento de Inoculação I.....	45
4.4.2. Experimento de Inoculação II.....	49
4.4.3. Experimento de Inoculação III.....	51
4.5. Padrões de colonização endofítica dos isolados 344 e 629.....	53
4.5.1. Recuperação de colônias bacterianas inoculadas a partir de raiz, caule e folha das mudas de cacau.....	54
4.5.2. Análise de PCR de colônias recuperadas pós-inoculação.....	55

4.6. Efeitos da colonização endofítica nas taxas fotossintéticas e trocas gasosas	57
4.7. Efeitos da colonização endofítica na produção de biomassa das mudas	60
4.7.1. Experimento de Inoculação I.....	61
4.7.2. Experimento de Inoculação III.....	63
4.7.2.1. Altura da haste das mudas	63
4.7.2.2. Número de folhas.....	65
4.7.2.3. Matéria seca	66
4.8. Efeitos da colonização endofítica na tolerância à seca.	68
4.9. Taxonomia dos isolados 344 e 629 por seqüenciamento dos genes <i>16S rDNA</i> , <i>hsp-60</i> e <i>rpo-B</i>	71
5. CONCLUSÕES	74
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Sementes de cacau germinadas em placas contendo meio Agar-água (1,5%). (B) Metodologia de inoculação dos isolados endofíticos por pipetagem, com aplicação de 10 µl de suspensão bacteriana de aproximadamente 10⁷ UFC/ml.

Figura 2: Aspecto geral das mudas aos 25 dias após a inoculação (Experimento I – três tratamentos).

Figura 3: Aspecto morfológico das colônias dos isolados 344 (A) e 629 (B), em meio TSA.

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose (2%) para os produtos das reações de RAPD para os mutantes obtidos resistentes a antibióticos, indicando padrão de bandas em relação aos isolados *wild-type* sob estudo. As amostras de 1 a 15 foram testadas com o Primer D7, as amostras de 16 a 28 com o primer M12. Tais amostras correspondem aos seguintes isolados (nesta ordem): 629 WT (1 e 15), 344 WT (2 e 16), mutantes 344-1.1 (3 e 17), 1.2 (4 e 18), 1.3 (5 e 19), 2.1 (6 e 20), 2.2 (7 e 21), 2.3 (8 e 22), 2.4 (9 e 23), 3.1 (10 e 24), e 3.2 (11 e 25), correspondendo ao antibiótico Rifampicina; mutantes 344-1.0 AN (12 e 26), 1.1 AN (13 e 27) e 2.0 AN (14 e 28), correspondendo ao antibiótico Ácido Nalidíxico.

Figura 5: Plaqueamento de raízes (1), caules (2) e folhas (3) das mudas do Experimento de Inoculação I, comparando-se endofíticos recuperados de mudas dos tratamentos ‘controle’ (A), ‘344-1.1’ (B) e ‘344-1.1 +629’ (C), em meio TSA, 36 dias após a inoculação.

Figura 6: Aspecto geral do segundo experimento de colonização, evidenciando perda desuniforme de mudas que não se desenvolveram entre os tratamentos. Mudas inoculadas por imersão (A), por pipetagem (B) e por rega no solo (C).

Figura 7: Morfologia de colônias dos endofíticos recuperadas após plaqueamento de folhas aos 15 dias pós-inoculação por pipetagem. (A) meio TSA+Rifampicina, tratamento ‘344-1.1’, evidenciando morfologia característica de bactérias do gênero *Enterobacter* (isolado 344); (B) meio TSA, tratamento ‘344-1.1+629’, evidenciando morfologia característica de bactérias do gênero *Bacillus* (isolado 629)(ver seção 4.9).

Figura 8: Morfologia de colônias dos endofíticos recuperadas após plaqueamento de órgãos aos 36 dias pós-inoculação por rega no solo (S), em meio TSA. Os órgãos raiz, caule e folhas foram designados por 1, 2 e 3, respectivamente. Mudas controle (A). Tratamento ‘344-1.1’, evidenciando morfologia característica de bactérias do gênero *Enterobacter* (B). Tratamento ‘344-1.1 + 629’,

evidenciando morfologia típica de bactérias do gênero *Bacillus* como forma mais predominante, e *Enterobacter* em menor quantidade (C).

Figura 9: Avaliação de fotossíntese (A) e condutância estomática (gs) para os tratamentos endofíticos inoculados pelo método de imersão (I) de sementes em suspensões bacterianas. As médias e erros padrões correspondem a 6 repetições por tratamento. Os dados referem-se às medições feitas aos 75 dias (em preto) e 90 dias (em cinza) para ambos os parâmetros. Mudanças controle (IC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (IE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (IE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (IB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (IB-5). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey a 5%).

Figura 10: Avaliação de fotossíntese (A) e condutância estomática (gs) para os tratamentos endofíticos inoculados pelo método de aplicação das suspensões bacterianas por rega no solo (S). As médias e erros padrões correspondem a 6 repetições por tratamento. Os dados referem-se às medições feitas aos 40 dias para A e gs (em preto), e aos 90 dias para A e 75 dias para gs (em cinza). Mudanças controle (SC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (SE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (SE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (SB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (SB-5). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey a 5%).

Figura 11: Altura das hastes aos 86 dias após inoculação pelo método de rega no solo (S) no experimento de inoculação III. Mudanças controle (SC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (SE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (SE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (SB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (SB-5). As médias e erros padrões correspondem a 10 repetições por tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5%).

Figura 12: Número de folhas aos 86 dias após inoculação pelo método de rega no solo (S) no experimento de inoculação III. Mudanças controle (SC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (SE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (SE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (SB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (SB-5). As médias e erros padrões correspondem a 10 repetições por tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5%).

Figura 13: Avaliação de matéria seca (g), 90 dias após inoculação pelo método de rega no solo (S) no experimento de inoculação III. Mudanças controle (SC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (SE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (SE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (SB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (SB-5). As médias e erros padrões correspondem a 10 repetições por tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5%).

Figura 14: Mudanças do experimento de inoculação III, após 27 dias submetidas à privação de água. As mudanças controle (A), 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (B), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (C), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (D), e 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (E) foram inoculadas pelo método de imersão; estes mesmos tratamentos nessa mesma ordem, representados pelas letras 'F' a 'J', foram inoculados pelo método de rega no solo.

Figura 15: Brotamento de folhas novas nas mudas, 27 dias após a última irrigação. Tratamentos 344-1.1+629, nas concentrações 10^{10} (A) e 10^7 UFC/ml (B), no método de inoculação no solo; e 344-1.1, concentração 10^7 no método de inoculação por imersão (C). A.1, B.1 e C.1 designam ampliações da região de brotamento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Métodos de inoculação, tratamentos, diluição e repetições (nº mudas) utilizados para o experimento de inoculação II.

Tabela 2: Métodos de inoculação, tratamentos, diluição e repetições (nº mudas) utilizados para o experimento de inoculação III.

Tabela 3: Contagem de UFC em relação às medidas da densidade ótica (D.O.) para o procedimento de diluição seriada dos isolados 344 e 629.

Tabela 4: Cálculos utilizados para conversão entre UFC obtidas e quantidade de UFC para os experimentos de inoculação.

Tabela 5: Mutantes espontâneos de 344, resistentes a Rifampicina e ao Ácido Nalidíxico.

Tabela 6: Análise físico-química do solo utilizado nos experimentos de colonização.

Tabela 7: Unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas a partir dos extratos da raiz, caule e folhas das mudas referentes aos tratamentos 344-1.1 e 344-1.1+629, aos 16 e 36 dias após a inoculação.

Tabela 8: Altura das hastes (em cm) de mudas de cacau no experimento de inoculação I.

Tabela 9: Vitalidade de mudas do experimento de inoculação III, 27 dias após interrupção de rega.

Tabela 10: Identificação taxonômica dos isolados endofíticos por seqüenciamento e análise comparativa (*nblast*) com seqüências do *GenBank* para os genes *16S rDNA*, *hsp60* e *rpo-B*.

EXTRATO

LEITE, Hianna Almeida Câmara, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, julho de 2008. **Bactérias endofíticas promotoras de crescimento em cacauero: estudos taxonômicos e da colonização de mudas.** Orientador: Leandro Lopes Loguercio. Co-orientadores: Karina Peres Gramacho & Jorge Teodoro de Souza.

Microrganismos endofíticos são fungos e bactérias que habitam o interior dos sistemas vegetais em condições de íntima interação, normalmente não-maléfica para a planta. Bactérias endofíticas foram previamente isoladas das hastes de cacaueros jovens e sadios e testadas com relação ao seu potencial como promotoras de crescimento. Dois isolados, denominados 344 e 629, destacaram-se nesse efeito, consistindo o estudo de seus padrões de colonização na planta e a análise dos seus efeitos como promotores de crescimento como principais objetivos deste trabalho. Considerando as vantagens técnicas de se dispor de mutantes espontâneos dos isolados sob estudo que fossem resistentes a antibióticos, testou-se a aplicação de Rifampicina e Ácido Nalidíxico em meio semi-sólido, buscando-se identificar mutantes para os dois isolados. Mutantes resistentes e geneticamente semelhantes ao original, verificados por RAPD, foram obtidos somente para o isolado 344 em relação à Rifampicina. Experimentos de inoculação de sementes de cacauero em casa-de-vegetação demonstraram a recuperação do isolado 629 e do mutante 344-1.1 de todas as partes das plantas, confirmando a colonização sistêmica após 15 a 20 dias de inoculação e cultivo da plântula em solo. Tal período foi independente dos três métodos de inoculação utilizado para as suspensões bacterianas, isto é, pipetagem na radícula, imersão de sementes e aplicação direta da suspensão bacteriana no solo. O isolado 344 mutante e o tipo selvagem do 629 mostraram-se compatíveis para colonização conjunta das mudas. Essa associação entre os dois isolados resultou em aumento significativo da altura das hastes, número de folhas e matéria seca para a inoculação de 100 ml da concentração 10^{10} UFC/ml de cada endofítico

diretamente no solo dos vasos. Diferenças significativas nas taxas fotossintéticas e condutância estomática foram encontradas entre os tratamentos com e sem endofíticos, e um potencial aumento de tolerância ao estresse hídrico foi preliminarmente observado.

Estudos taxonômicos com base em seqüenciamento de genes foram iniciados para a identificação dos isolados. A partir da análise e comparação de seqüências dos genes 16S rDNA, *hsp-60* e *rpoB*, o isolado 344 foi identificado como pertencendo à espécie *Enterobacter cloacae*. Seqüência do gene 16S rDNA para o isolado 629 identificou-o como pertencendo ao gênero *Bacillus*, sendo, contudo, ainda necessário obter-se seqüências de ao menos dois outros genes para sua identificação final em nível de espécie.

ABSTRACT

LEITE, Hianna Almeida Câmara, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, July, 2008. **Plant growth-promoting bacterial endophytes in cacao: taxonomy and seedlings colonization studies.** Advisor: Leandro Lopes Loguercio. Co-advisors: Karina Peres Gramacho & Jorge Teodoro de Souza.

Endophytic microorganisms are fungi and bacteria that live inside the plants, usually under conditions of an intimate and non-detrimental interaction. Endophytic bacteria were previously isolated from stems of healthy young cacao trees and tested for their potential as growth promoters. Two isolates, named 344 and 629, outstood among others, so that the aims of this study were assessing their colonization patterns in the plant and their growth-promoting effects. Considering the technical advantages of having antibiotic-resistant spontaneous mutants from these isolates, the application of Rifampicin and Nalidixic Acid in semi-solid media was tested. Antibiotic-resistant mutants that were genetically similar to the wild-type, based on RAPD tests, were obtained only for the 344 isolate and Rifampicin. Inoculation experiments on cacao seeds performed under greenhouse conditions showed that the 629 isolate and the mutant 344-1.1 were recovered from all parts of the seedlings, thereby confirming a systemic colonization after 15 to 20 days of inoculated-seedlings cultivation in the soil. This period was independent from the three inoculation method employed, which were radicle pipetting, seeds submersion and direct application of bacterial suspension to soil. The mutant 344 and the wild-type 629 showed to be compatible for a joint colonization of plantlets. The association between the two isolates resulted in statistically significant increases in shoot heights, leaf number and dry matter when 100 ml of a bacterial suspension containing 10^{10} CFU/ml of each endophyte were applied directly to the soil. Significant differences in photosynthetic rates and stomatal conductance were found among inoculation treatments with and without endophytes, and a potential increase in drought tolerance was preliminarily observed.

Sequence-based taxonomical studies for identification of the isolates were initiated. Sequencing analysis and comparison for the 16S rDNA, *hsp-60* and *rpoB* genes allowed the identification of the 344 isolate as belonging to the *Enterobacter cloacae* species. Sequencing of the 16S rDNA gene for 629 revealed this isolate as belonging to the genus *Bacillus* although it is yet necessary to sequence at least two more genes for a final identification of this isolate at the species level.

1. INTRODUÇÃO

Os endofíticos são microrganismos que habitam o interior de organismos vegetais superiores, aparentemente em uma relação mutualista, na qual recebem da planta nutrição e um ambiente seguro, em troca promovendo em maior ou menor medida certos benefícios ao seu hospedeiro. A comunidade endofítica é formada por diversas espécies fúngicas e bacterianas, sendo os resultados dessas interações motivo de diversas pesquisas no Brasil e em diversos outros países. A microbiota endofítica de algumas espécies vegetais vem sendo isolada e utilizada como fonte de experimentos que objetivam desvendar desde suas características fenotípicas aos seus efeitos. O interesse por espécies nativas de países de climas mais frios já foi despertado, contudo estudos relacionados à caracterização da microbiota indígena de plantas nativas de países tropicais ainda são poucos. Dentre as pesquisas disponíveis na literatura, pode-se perceber que resultados verdadeiramente promissores têm sido obtidos. Diversos estudos têm demonstrado efeitos benéficos de bactérias endofíticas no cultivo de vegetais, as quais têm sido responsáveis, dentre outras coisas, pela promoção do crescimento da planta, promoção de tolerância ao estresse hídrico e indução de resistência a patógenos, todos considerados como aspectos diretamente relacionados à produtividade das culturas. A importância do estudo de microrganismos endofíticos e o impacto da validação do seu uso na agricultura são algumas das justificativas para este estudo. Amplas são as possibilidades de aplicações biotecnológicas dos endofíticos, especialmente no tocante à possível substituição de insumos químicos em culturas para fins de controle de pragas e adubação, bem como à produção de substâncias de grande interesse à indústria farmacêutica, tais como antibióticos e enzimas. Este trabalho foi motivado a partir do isolamento de bactérias endofíticas das hastes de cacauzeiros jovens e saudáveis,

cultivados em fazendas da Empresa Almirante Cacau – Agrícola, Comércio e Exportação LTDA, que foram experimentados em relação ao seu potencial efeito como promotores de crescimento em experimentos preliminares (J. T. de Souza, A. Pomella, comunicação pessoal). Dois destes isolados, pertencentes aos gêneros *Enterobacter* sp. (isolado 344) e *Bacillus* sp. (isolado 629), se destacaram como excelentes colonizadores do cacauzeiro, cujo efeito na promoção de crescimento em mudas foi positivo. Assim, este trabalho de experimentação foi realizado, no qual foram verificados fatores como concentração do inóculo (UFC/ml), métodos de bacterização e de recuperação dos isolados inoculados, estimativa da dinâmica populacional pós-inoculação, avaliações de parâmetros direcionados à promoção de crescimento (altura das hastes, número de folhas, matéria seca, taxas fotossintéticas), a caracterização taxonômica dos isolados em nível de espécie, além de um ensaio preliminar relacionado ao aumento de resistência ao estresse hídrico nas mudas inoculadas. Nosso objetivo, portanto, consistiu em estudar esses isolados bacterianos, buscando observar os padrões de colonização temporal e espacial, tentando verificar se, e como estão relacionados à promoção do crescimento e tolerância à seca. Três experimentos de inoculação dos isolados endofíticos foram conduzidos. Entretanto, devido às fases de aprendizado, de testes preliminares e experimentos pilotos, às dificuldades encontradas no transcurso destes dois anos de estudos, e o fato deste trabalho ser relativamente novo para a equipe, foi sentida a necessidade de ajustes metodológicos ao longo de todo o trabalho. Assim apenas o último experimento encontra-se realmente completo, com a realização de todas as etapas planejadas e, inclusive, com resultados satisfatórios e promissores. Integram o planejamento da nossa equipe a continuação destes estudos, e a busca por resultados confirmatórios dos aqui apresentados. A partir desses, pretende-se investigar outros efeitos benéficos ao cacauzeiro, como antagonismo a fitopatógenos e aumento de resistência sistêmica, buscando a validação do potencial uso destas bactérias endofíticas no aumento da produtividade dos cultivos de cacau a campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos Endofíticos – conceito e histórico

“Endofíticos” ou “endófitos” são microrganismos que habitam os espaços intercelulares das plantas por um período do seu ciclo de vida, podendo ser encontrados em órgãos e tecidos vegetais vivos, não causando doenças ou produzindo estruturas externas visíveis (WILSON, 1995; AZEVEDO et al, 2000). Essa comunidade nativa é constituída principalmente por bactérias e fungos, sendo que alguns autores defendem também a presença de actinomicetos. Tal comunidade é considerada distinta dos microrganismos “epifíticos”, que habitam a superfície das plantas também em interação benéfica, e dos “patogênicos”, causadores de doenças. Fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio, devido à sua íntima relação com seus hospedeiros, também poderiam ser considerados endofíticos, entretanto, são distintos destes devido à formação de estruturas externas visíveis, como as hifas micorrízicas e os nódulos em raízes (PEIXOTO NETO et al, 2002; AZEVEDO et al, 2000). Alguns endofíticos podem ser isolados de diferentes famílias de plantas, sob diferentes condições naturais, enquanto outros aparentemente estão restritos a certas espécies hospedeiras, ocorrendo particularmente em poucas famílias.

Os microrganismos endofíticos habitam os tecidos internos das plantas hospedeiras, onde recebem um meio ambiente relativamente uniforme e protegido, especialmente quando comparado à rizosfera ou ao rizoplano (CHEN et al, 1995). Essa associação seria uma espécie de interação mutualística, na qual os endofíticos recebem da planta hospedeira nutrientes e a proteção de uma

residência e, em troca, produzem substâncias que podem vir a beneficiar a planta (PEIXOTO NETO et al, 2002).

Maki (2006) comenta que apesar de os microrganismos estarem popularmente associados a doenças, falta de higiene e decomposição de matéria orgânica, são diversas as espécies utilizadas para o benefício da saúde e bem estar do homem, como a fabricação de alimentos, fármacos, enzimas etc. Dentre estes microrganismos benéficos, estão os endofíticos.

A palavra “endofítico”, do grego *endon* – dentro e *phyton* – planta foi um termo cunhado por Anton de Bary, em 1866, citado por Azevedo (1998), quando estes microrganismos foram descritos pela primeira vez, permanecendo então ignorados durante mais de um século. Os relatos seguintes sobre tais microrganismos datam do fim do século XIX, os quais referem, segundo Mundt e Hinkle, citados por Silva et al (2006), a detecção de células bacterianas no interior de tecidos de tomate, cenoura e beterraba açucareira pelo pesquisador Fernbach, em 1888. A primeira narração da detecção de um fungo endofítico, a partir de sementes de *Lolium temulentum* L teria sido em 1898, segundo Vogl (WHITE JR. et al, 1996). Bashan e de-Bashan (2005) relatam que a inoculação de *Rhizobium* em leguminosas tem sido praticada há mais de 100 anos. Estes autores acrescentam que após a falha na inoculação associativa entre *Azotobacter* e *Bacillus* no Leste Europeu, nas décadas de 1930 a 1940, dois trabalhos responsáveis pela renovação do interesse pelas pesquisas com bactérias promotoras do crescimento de plantas ocorreram na década de 70. Um deles, realizado no Brasil pela Dra. Dobereiner e colaboradores, demonstrando a habilidade de promoção de crescimento de *Azospirillum*; e o outro nos EUA, no qual Kloepper e Schroth trabalharam com as espécies *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida* como agentes de biocontrole.

Após 1940, trabalhos versando sobre o isolamento de microrganismos de tecidos vegetais, principalmente bactérias, foram publicados. Nas duas últimas décadas, contudo, a maioria dos estudos tem focado os efeitos benéficos que a aplicação dos endófitos nas plantas pode gerar, como por exemplo, o aumento da produção e a redução da severidade de várias doenças (SILVA et al, 2006). Alguns trabalhos de expressão nesta época podem ser citados, por exemplo, o de Colombo (1978), relatando a ocorrência de bactérias endofíticas no talo de algas

e enfatizando a relação de equilíbrio existente entre bactérias e hospedeiro. A este se seguiram trabalhos como os de Landmark e Webber, publicados em 1981, ambos versando sobre a proteção de plantas contra insetos herbívoros por microrganismos endofíticos. Segundo Azevedo *et al* (2000), o período de 1981 a 1985 pode ser considerado histórico para a pesquisa com os endofíticos, quando diversos trabalhos demonstraram a existência de mecanismos de proteção da planta hospedeira a insetos e animais herbívoros promovidos pelo endofíticos.

No Brasil, segundo Peixoto Neto *et al* (2002), dentre os primeiros estudos sobre o isolamento de endofíticos, estão os trabalhos de Rodrigues e Samuels (1992) e de Rodrigues (1994), relatando o isolamento de várias espécies de fungos a partir do açaí (*Euterpe oleracea*). A partir da década de 1990, tiveram início as pesquisas com fungos endofíticos na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, em Piracicaba-SP, posteriormente sendo ampliados os estudos para abranger também a microbiota endofítica bacteriana (PEIXOTO NETO *et al*, 2002). Desde então, esse grupo tem gerado diversas publicações relacionadas à pesquisa com endofíticos, dentre eles trabalhos sobre a população endofítica em citros (ARAÚJO *et al*, 2002), em soja (SOBRAL, 2003), e em cacau (RUBINI *et al*, 2005; MAKI, 2006). Outros grupos de pesquisa brasileiros têm se dedicado a estudar os endofíticos, podendo ser mencionados o estudo de controle biológico por bactérias endofíticas em plantas de pimenta-do-reino (BENCHIMOL *et al*, 2000), a promoção de crescimento em abacaxizeiro (DE MELLO *et al*, 2002), o isolamento de bactérias endofíticas de alface (GOMES *et al*, 2003), a bacterização em sementes de pepino (SILVEIRA *et al*, 2004) e a promoção de crescimento em helicônias (SANTOS *et al*, 2005) e em alface (SOTTERO *et al*, 2006).

2.2. Relação entre endofítico e hospedeiro

A relação entre endofíticos e hospedeiro tem sido defendida como uma relação endossimbiótica, sendo esta, considerada por alguns autores, uma característica necessária à classificação de um microrganismo como endofítico. Outros defendem que em determinadas condições e dentro de hospedeiros genotipicamente diferentes, os endofíticos podem vir a tornar-se patogênicos

(LODEWYCKX et al, 2002), especialmente em condições de desequilíbrio ou de alterações na fisiologia do hospedeiro (DI FIORE & DEL GALLO, 1995).

Saikkonen et al (2004) afirmam que o termo “endofítico” tem sido controverso desde o seu aparecimento. A relação desenvolvida entre microrganismos e hospedeiro teria levado esse termo a ser associado a “mutualismo”, como se tais palavras fossem sinônimas. Entretanto, referindo-se particularmente aos fungos endofíticos, a associação endofítico-hospedeiro é baseada na mútua exploração. Segundo Azevedo et al (2000), a distinção entre endofíticos, epifíticos e patógenos é uma caracterização de natureza didática, visto que, em determinadas situações torna-se difícil traçar limites para cada categoria.

Peixoto Neto et al (2002), por outro lado, afirmam que os endofíticos não causam prejuízos aos seus hospedeiros, podendo, inclusive desempenhar papel importante na sanidade vegetal ao atuarem como agentes controladores de fitopatógenos, insetos e herbívoros. Kado (1992) defende que bactérias endofíticas são aquelas que residem no interior de tecidos vivos de plantas, sem causar prejuízos aparentes, tendo como benefício apenas a sua proteção. Atualmente tem sido amplamente aceito que os microrganismos endofíticos podem estar incluídos entre os colonizadores de comportamento neutro ou simbiote, ou mesmo dentre aqueles que transitam ora como endofíticos ora como epifíticos (AZEVEDO, 1998).

Cabe ainda aqui mencionar uma importante teoria recentemente lançada, a qual proclama que, do ponto de vista evolutivo, os animais e as plantas, combinados com sua microbiota interna e externa, constituem-se em “holobiontes”, sendo seus genomas considerados em conjunto – os “hologenomas” – como as unidades genéticas básicas que sofrem e reagem às pressões evolutivas (ZILBER-ROSENBERG & ROSENBERG, 2008). Nesse caso, desaparece a necessidade de classificação de tipos de habitantes internos das plantas, bem como sua relação com o hospedeiro. As conseqüências dessa teoria refletem-se em aspectos ecológicos e evolutivos, tanto dos hospedeiros quanto de suas microbiotas.

2.3. Penetração e colonização sistêmica dos endofíticos nas plantas

As plantas são consideradas microssistemas complexos, habitados por ampla variedade de microrganismos. Uma vez dentro desse microssistema, diferentes espécies de fungos e bactérias são capazes de interagir e estabelecer equilíbrio (MCINROY E KLOEPPER, 1995; FISHER et al, 1992).

Os endofíticos são capazes de penetrar a planta, principalmente pela rizosfera, passando a colonizar os tecidos radiculares. A colonização endofítica é abundante, sobretudo nas raízes das plantas hospedeiras, por onde penetram através de aberturas como pequenos ferimentos ocorridos no processo de crescimento natural da planta, de junções epidérmicas, ou locais de emissão de raízes secundárias (PEIXOTO NETO *et al*, 2002). O córtex da raiz torna-se parte do meio ambiente microbiano, resultando numa contínua via apoplástica da epiderme radicular para os ramos, tornando-os capazes de habitar a rizosfera, o córtex radicular e outros órgãos da planta (KLOEPPER et al, 1991). De acordo com Hallman *et al* (1997), uma vez habitando o interior da planta, o endofítico dissemina-se sistemicamente.

Outras rotas de entrada também podem ocorrer pelas partes aéreas da planta, tais como aberturas nas folhas (ex: estômatos), ou através das flores, no caso da população endofítica dos frutos, além de caules e cotilédones das sementes. É possível que alguns desses microrganismos também possam produzir enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular das plantas a fim de conseguir penetrá-las (LODEWYCKX et al, 2002; BASHAN e DE-BASHAN, 2005; SHISHIDO et al, 1999). A detecção de endofíticos em sementes tem sido relatada, entretanto, essa penetração também pode estar associada a pequenos ferimentos (SILVA et al, 2006). A presença intracelular dos endofíticos é pouco relatada.

Trabalhando com cana-de-açúcar, Dong et al (1994) demonstram que, uma vez dentro da planta, os microrganismos endofíticos podem transmitir-se vegetativamente por até duas gerações. A população endofítica introduzida pode variar entre 10^3 e 10^5 UFC/g de tecido fresco, sendo similar à quantidade destes microrganismos encontrada em populações endofíticas indígenas (LODEWYCKX et al, 2002). As devidas proporções na comparação entre microbiota endofítica nativa e endofíticos introduzidos devem ser resguardadas, inclusive atribuindo a

estas variáveis como a idade da planta, o tipo de tecido inoculado, o ambiente natural etc. Também é interessante ressaltar que os níveis de colonização de endofíticos quando tomados individualmente tendem a ser menores que os encontrados para bactérias patogênicas, sendo a concentração destas últimas estimada em 7.0 a 10.0 log₁₀ UFC/g (peso fresco) em plantas susceptíveis infectadas (ZINNIEL et al, 2002).

Na tentativa de recuperação dos endofíticos, McInroy e Kloepper (1995), trabalhando com sementes de milho e algodão, conseguiram isolá-los de todas as partes das plantas testadas, porém a população das raízes foi maior que a dos ramos. De acordo com Lodewyckx et al (2002), em relação à população bacteriana endofítica, densidades mais altas são geralmente observadas nas raízes, decrescendo progressivamente do caule para as folhas, dados que corroboram com a hipótese de serem de fato as raízes o principal local de penetração dos endofíticos nas plantas.

Os tecidos internos das plantas provêm um habitat mais uniforme e protegido aos microrganismos, se comparado à superfície tecidual, onde estes estariam expostos a condições ambientais adversas como radiação ultravioleta, chuvas, variações de temperatura, fatores estes limitantes às condições de vida bacterianas (MCINROY e KLOEPPER, 1995). Outros fatores, entretanto, podem atuar na limitação de populações microbianas nos sistemas vegetais, os mesmos que limitariam o estabelecimento de populações patogênicas (LODEWYCKX et al, 2002). Infere-se, portanto, que o estabelecimento de uma população endofítica necessita de adequada adaptação aos sistemas internos do hospedeiro.

2.4. Principais espécies de microrganismos endofíticos

Conforme já aludido em seções anteriores, a microbiota endofítica das plantas é formada principalmente por fungos e bactérias. Generalidades acerca desses microrganismos serão apresentadas a seguir, bem como exemplos de algumas das ações resultantes de interações com suas plantas hospedeiras.

2.4.1. Fungos

Os fungos são microrganismos eucarióticos que podem apresentar-se unicelulares como as leveduras ou pluricelulares, como os fungos filamentosos (bolors) e os cogumelos. Foram durante muitos anos considerados como vegetais, sendo somente a partir de 1969 que passaram a constituir o reino *Fungi*. Algumas características permitem distingui-los das plantas, dentre elas: a incapacidade de sintetizar clorofila ou outro pigmento fotossintético, a não apresentação de celulose em sua parede vegetal (exceto alguns fungos aquáticos) e o armazenamento de glicogênio como fonte de energia. A parede celular fúngica é composta principalmente por glucanas, mananas e, em menor quantidade, por quitina, proteínas e lipídios (TRABULSI et al, 1999). São ubíquos, apresentando habitat bastante diverso; alguns são aquáticos, mas a maioria, no entanto, vive em habitats terrestres, no solo ou em matéria em decomposição, apresentando papel de grande relevância na mineralização do carbono orgânico. Vários fungos são parasitas de plantas terrestres, sendo indubitavelmente responsáveis pela maioria das doenças vegetais economicamente importantes. Alguns são parasitas de animais, incluindo o homem, apesar de que correspondem a patógenos de animais de menor importância que as bactérias e os vírus (MADIGAN et al, 2004).

Segundo Silva et al (2006), os fungos endofíticos mais comumente isolados pertencem aos gêneros *Neothyphodium*, *Balansia*, *Ephicloë* e *Myriogenopora*. Todavia, diversos outros são citados em estudos recentes como envolvidos de alguma forma em ações benéficas aos seus hospedeiros como *Festuca* (WHITE JR et al, 2002), *Pirimospora* (VARMA et al, 1999), *Beauveria* (WAGNER & LEWIS, 2000), *Taxomyces* (STIERLE et al, 1993), *Cladosporium* (LASOTA et al, 1983), *Colletotrichum* (REDMAN et al, 1993), *Trichoderma* (HOWELL, 2003) etc. As ações relatadas incluem a indução de resistência a insetos, patógenos e herbívoros, a promoção de crescimento vegetal, a produção de substâncias de ação antitumoral, antibióticos e antifúngicos, e o controle biológico.

Alguns estudos têm dirigido sua atenção à microbiota fúngica do cacau. Maki (2006), em sua tese de doutoramento, estudando a diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos do cacau, isolou 26 espécies, distribuídas

em 18 gêneros, dos quais *Aschersonia*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Crinipellis*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Glomerella*, *Lasiodiplodia*, *Myrothecium*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Podospora*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis* e *Verticillium*. Praticamente os mesmos gêneros isolados por Rubini et al (2005), com exceção de cinco deles, *Aschersonia*, *Glomerella*, *Myrothecium*, *Podospora* e *Crinipellis*.

2.4.2. Bactérias

As bactérias são microrganismos procariontes filogeneticamente relacionados, compreendidas no domínio *Bacteria*, que inclui uma variedade de domínios morfológicos e fisiológicos (MADIGAN et al, 2004). Assim como os fungos, também possuem habitat diversificado, podendo ser encontradas livres no ambiente aquático ou terrestre, ou habitando o interior de organismos animais e vegetais. Dentre as bactérias capazes de habitar o interior das plantas, estão as espécies incluídas como endofíticas. Segundo Lodewyckx et al (2002), diversos relatos indicam que as bactérias endofíticas existem em uma variedade de tipos de tecidos dentro de numerosas espécies de plantas, sugerindo uma existência ubíqua, na maioria, senão em todas as espécies de plantas superiores, pois têm sido isoladas de monocotiledôneas e dicotiledôneas, desde espécies florestais, como o carvalho (BROOKS et al, 1994) a tubérculos (FROMMEL et al, 1991) e gramíneas (SCHARDL & PHILLIPS, 1997). Essa presença ubíqua em virtualmente todos os indivíduos de todas as espécies do planeta dão suporte a um dos argumentos que sustentam a teoria dos hologenomas (ZILBER-ROSENBERG & ROSENBERG, 2008).

Silva et al (2006), relacionando alguns dos principais gêneros bacterianos endofíticos, citam *Enterobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*. As mais comuns pertencem aos grupos *Pseudomonaceae* (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*) e *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*) (HALLMANN et al, 1997). Os principais relatos, entretanto, referem-se principalmente a bactérias endofíticas isoladas de plantas de clima temperado,

fazendo-se sentir a necessidade de maior número de pesquisas relacionadas a plantas de clima tropical, como o Brasil. Peixoto-Neto et al (2002) listam alguns exemplos de bactérias endofíticas isoladas de plantas no Brasil, dentre as quais *Burkholderia brasilensis*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H.seropedicae* e *Paenibacillus* sp. em repolho (BALDANI et al, 2002), *Alcaligenes* sp., *Bacillus cereus*, *B. lentus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium extorquens*, *Nocardia* sp., *N. nova*, *Nocardiosis spp.*, *Pantoea agglomerans* e *Streptomyces spp* em citrus (ARAÚJO et al, 2002); *Bacillus* spp., *Corynebacterium* sp., *Erwinia* sp., *Listeria* sp., *Microbispora* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. e *Streptosporangium* sp. em milho (SOUZA, 1996; DE ARAÚJO et al, 2000).

Os gêneros *Enterobacter* e *Bacillus*, aos quais pertencem as bactérias estudadas neste trabalho, também têm merecido atenção, sendo já bem documentado na literatura. Ambos foram isolados por Lacava et al (2006) e Araújo et al (2002) em estudos da comunidade bacteriana endofítica de citrus e também em trabalhos relacionados ao desenvolvimento de mudas de pepino (SILVEIRA et al, 2004), resultando em aumento significativo das matérias secas totais, da parte aérea e das raízes, sendo considerados promissores na melhoria da qualidade das mudas. O gênero *Bacillus*, aparentemente mais estudado, foi citado em estudos de dinâmica populacional na rizosfera do trigo (KIM et al, 1997) e em nabo, cevada e *Arabidopsis thaliana* (REVA et al, 2004); também em trabalhos de promoção de crescimento de mudas de alface, apresentando aumento significativo de matéria seca (GOMES et al, 2003).

Rubini (2003) isolou bactérias e fungos endofíticos de mudas de cacauzeiros, as espécies bacterianas identificadas foram *Micrococcus nishinomyaensis*, *Streptomyces* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus* spp., *Bacillus pumilus*, *Kocuria* sp., *Acinetobacter baumannii*, *Methylobacterium* spp. e *Pseudomonas* spp. Silva (2006) estudou a diversidade genética de rizobactérias isoladas de raízes e do solo e o efeito das mesmas na promoção de crescimento em mudas de cacau. Foram isoladas bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia*, *Flavobacterium* e *Bacillus*, sendo que

17 dos isolados testados promoveram aumento de matéria seca da raiz em até 91,8%.

2.5. Endofíticos e potenciais aplicações biotecnológicas.

Diversos trabalhos têm associado os microrganismos endofíticos à promoção de efeitos benéficos aos seus hospedeiros. Em resposta ao recebimento de abrigo e nutrição, os endofíticos podem estar envolvidos na produção de substâncias de interesse à planta (alcalóides, enzimas e antibióticos que afetam patógenos e herbívoros), na promoção de tolerância a situações de estresse, e no controle biológico ao ataque de insetos e fitopatógenos (LODEWYCKX et al, 2002; PEIXOTO NETO et al, 2002; AZEVEDO et al, 2000), dentre outros efeitos importantes. Tais efeitos têm também aplicação biotecnológica e agrícola, o que tem feito dos endofíticos uma importante ferramenta para a agricultura moderna (PEIXOTO NETO et al, 2002).

Os efeitos da interação entre endofíticos e suas plantas hospedeiras têm sido organizados em duas ações principais: a promoção de crescimento e o controle biológico; entretanto, diversos são os mecanismos de atuação, o que nos levou a dividi-los em seções, neste trabalho, para uma abordagem mais didática.

2.5.1 Promoção de crescimento

A promoção do crescimento vegetativo pode estar associada a características como aumento de número de raízes, matéria seca, área foliar e velocidade de germinação das sementes (FROMMEL et al, 1991). Os mecanismos utilizados parecem ser semelhantes aos descritos para as rizobactérias (SILVA et al, 2006), também denominadas Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP), ou PGPR (do inglês, *Plant Growth-Promoting Rhizobacterias*) (LODEWYCKX et al, 2002). Estas podem afetar as plantas direta ou indiretamente. A ação direta pode ser caracterizada como a síntese ou a promoção da síntese de compostos que auxiliem a planta em seu crescimento, podendo ser relacionada à

produção de fitormônios reguladores de crescimento vegetal (auxinas, citocininas), fixação de nitrogênio atmosférico, produção de ácido-indol-acético (AIA); a ação indireta, por sua vez, pode ser concretizada através da diminuição ou prevenção dos efeitos deletérios de fitopatógenos (como a competição por nutrientes e espaço), disponibilização de nutrientes à planta (produção de fosfatases, sideróforos), e a indução de resistência sistêmica (BASHAN & DE-BASHAN, 2005; LODEWYCKX et al, 2002; BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001; SILVA et al, 2006).

A fitoestimulação, uma das vias diretas de promoção do crescimento, foi uma das habilidades reconhecidas em *Azospirillum* spp., capaz de secretar fitormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, além de possuir as habilidades de fixar nitrogênio e produzir ácido-indol-acético (BASHAN & DE-BASHAN, 2005; STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000; BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001). Outros gêneros bacterianos endofíticos relatados como responsáveis pela produção de reguladores do crescimento da planta, tais como etileno, auxinas e citocininas, são *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* e *Azotobacter* (LODEWYCKX et al, 2002).

A fixação de nitrogênio atmosférico (diazotropia) tem sido amplamente citada como uma das capacidades de certos microrganismos endofíticos. Bloemberg e Lugtenberg (2001) relatam que algumas das linhagens bacterianas mais eficientes na fixação do nitrogênio pertencem aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium*. Os produtos gênicos dos genes *nif* (especialmente *nif D* e *nif H*) e *fix* são responsáveis pelo controle da fixação do N₂, sendo utilizados como marcadores em estudos relacionados à elucidação de mecanismos de promoção de crescimento (SILVA et al, 2006; BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001). Os efeitos do ácido-indol-acético (AIA) estariam relacionados à proliferação e alongamento das raízes, proporcionando à planta maior facilidade na retirada de água e nutrientes do solo (VERMA et al, 2001).

Ao competirem pelo mesmo nicho habitado pelos fitopatógenos (HALLMANN et al, 1997), os endofíticos tornam-se agentes controladores de microrganismos deletérios à saúde da planta, inclusive como já foi relatado para plantas de cacau (ARNOLD et al, 2003; HERRE et al, 2007). Esta é uma das habilidades consideradas

como uma ação indireta na promoção de crescimento, pois, geralmente a supressão de doenças pode ser associada ao crescimento da planta. Bevivino et al (1998) utilizaram a bactéria *Burkholderia cepacia* no cultivo do milho, obtendo resultados na supressão de doenças e promoção de crescimento.

A disponibilização de nutrientes como ferro e fósforo também são habilidades reconhecidas em alguns endofíticos que podem atuar indiretamente na promoção de crescimento da planta hospedeira. Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular de alta capacidade de ligação ao Fe^{3+} , produzidos pelas BPCP, que podem dessa forma servir à planta como fontes de ferro, disponibilizando esse nutriente ao seu hospedeiro (BASHAN & DE-BASHAN, 2005; LODEWYCKX et al, 2002). Mecanismo semelhante ocorreria por ação das fosfatases, agentes de solubilização do fósforo.

Outras ações indiretas como a produção de antibióticos e enzimas, atividade antagonista e indução de resistência sistêmica serão abordadas nas seções seguintes.

2.5.2 Indução de resistência sistêmica

A indução de resistência sistêmica (IRS), também conhecida como ISR (do inglês, *Induction of Systemic Resistance*), consiste na indução pelos endofíticos dos mecanismos protetores da planta contra patógenos. Desde 1930 até o presente, diversos termos foram propostos para descrever este fenômeno, dentre eles: imunidade fisiológica adquirida (Chester), resistência sistêmica adquirida (Ross), resistência translocada (Hubert e Helton) e imunização de plantas (Tuzun e Kuc) (citados por RAMAMOORTHY et al, 2001).

Ramamoorthy et al (2001) define a ISR como um aumento da capacidade defensiva geral da planta contra um amplo espectro de patógenos e pestes que é adquirida após estímulo apropriado. Alguns autores ainda utilizam a expressão “resistência sistêmica adquirida” (RSA ou SAR, do inglês, *Systemic Acquired Resistance*) como sinônimo de IRS. Entretanto, de acordo com Van Loon et al (1998), a indução de resistência deve ser um termo restrito ao fenômeno causado pela ação resultante da colonização por promotores do crescimento, enquanto a

RSA estaria relacionada à indução de resistência por mecanismos específicos causada por outros agentes (tanto microrganismos quanto substâncias elicitoras). Neste último caso, pode ocorrer, em seu nível máximo, o desenvolvimento de necrose tecidual, o que diferiria assim da indução de resistência causada pelas RPCPs que não levam a planta a desenvolver necrose.

As plantas possuem um sistema inato de defesa contra microrganismos deletérios; entretanto, esse mecanismo pode não ser eficiente frente a patógenos muito virulentos, ou que disponham de ações dirigidas a suprimir as reações de resistência da planta (VAN LOON et al, 1998). Os microrganismos endofíticos podem desencadear estímulos anteriores ao estabelecimento de infecções, que despertariam o sistema de defesa da planta, à semelhança do que as vacinas fazem com o sistema imunológico humano, tornando a planta mais preparada para defender-se ao entrar em contato com os fitopatógenos. A RSA é um fenômeno bastante estudado e tem sido relatado em diversas espécies vegetais, ao passo que a IRS por ação de bactérias endofíticas conta ainda com poucas descrições. O acúmulo de ácido salicílico (AS) e proteínas relacionadas à patogênese (PRs) são característicos da RSA, enquanto os efeitos da IRS na supressão de fitopatógenos relacionam-se ao aumento de AS, ao incremento da expressão dos lipopolissacarídeos (LPS) e sideróforos, além da não expressão da PRs, da ausência de modificações no metabolismo de fitoalexinas ou inibidores e do estímulo a alterações estruturais celulares quando necessários (VAN LOON et al, 1998; BENHAMOU et al, 1996). Ramamoothy et al (2001) cita alguns outros mecanismos adicionais como a competição por nutrientes e espaço, a produção de antibióticos, além da produção de ácido cianídrico e de enzimas líticas como quitinases e glucanases, e da degradação de toxinas produzidas por patógenos.

Espécies não patogênicas de *Pseudomonas* têm sido descritas, até o momento, como principais portadoras da habilidade de induzir resistência sistêmica em seus hospedeiros, apesar de que outras espécies também já foram citadas como portadoras desta habilidade: *Flavomonas oryzae*, *Serratia marcescens* e *Bacillus pumilus* (LIU et al, 1995). O efeito sinérgico da mistura de algumas linhagens também tem produzido resultados interessantes, como foi relatado por Sing et al (1999) em relação à mistura de *Paenibacillus* sp. e

Streptomyces sp., mais eficiente em comparação à aplicação individual dos isolados no controle da fusariose em pepino.

2.5.3 Produção de fármacos e outros metabólitos secundários

A produção de substâncias de interesse biotecnológico pode ser resultado de outras ações endofíticas relacionadas à promoção de crescimento, indução de resistência sistêmica ou controle biológico. Contudo, dada a importância de certos compostos para a indústria e para a pesquisa, este assunto merece um enfoque específico. Um exemplo da grande importância dessas substâncias é o taxol, um complexo diterpenóide de comprovada ação antitumoral. Estudos conduzidos por Stierle et al (1993) demonstraram que o *Taxomyces andreanae*, um fungo endofítico isolado da planta *Taxus brevifolia* é capaz de produzir tal substância. Anos mais tarde foi encontrada a mesma capacidade no fungo *Pestalotiopsis microspora*, isolado da *T. wallachiana* (STROBEL et al, 1996). O taxol já era uma substância utilizada industrialmente, entretanto, sua única fonte de extração conhecida era a casca das taxeaceas, sendo necessárias mais de 1000 árvores para a obtenção de 1 kg de taxol (PEIXOTO NETO et al, 2004).

Além do taxol, Peixoto Neto et al (2002) citam uma lista de compostos naturais de aplicações farmacológicas, produzidos em quantidades ínfimas pelas plantas, cuja produção por microrganismos já foi detectada, dentre eles: leucinostatina A, composto de atividade antitumoral e antifúngica, produzido por *Acremonium* sp (STROBEL & HESS, 1999); lolitrems, peramina e paxilina, micotoxinas produzidas pelo *A. lolii* (ROWAN, 1993); isocumarinas, aplicadas no controle de *Choristoneura fumiferana*, produzidas por *Conoplea elegantula* (FINDLAY et al, 1995); criptocandina e criptocina, antifúngicos produzidos por *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* (STROBEL et al, 1999; LI et al, 2000); ácido citônico A e B, com ação inibitória de proteases em Citomegalovírus, produzido por *Cytospora* sp. (GUO et al, 2000); subglutinol A e B, um imunossupressivo produzido por *Fusarium subglutinans* (LEE et al, 1995).

A produção de novos antibióticos e antifúngicos também tem despertado o interesse da indústria, o que tem motivado inúmeras pesquisas.

2.5.4 Incremento à fitorremediação

A fitorremediação consiste em utilizar a capacidade de detoxificação de determinadas plantas com o objetivo de remediar ambientes poluídos por resíduos tóxicos. A biorremediação, por sua vez, tem sido um termo aplicado ao uso de microrganismos como agentes degradantes destes resíduos (NEWMAN & REYNOLDS, 2005). Atualmente tem sido estudada a associação de microrganismos e plantas possuidores desta capacidade detoxificante com o objetivo de descontaminar certos ambientes. De acordo com Lodewyckx et al (2002), a utilização de técnicas biológicas pode reduzir significativamente os custos de remediação de locais contaminados por xenobióticos orgânicos.

O envolvimento da bactéria endofítica *Methylobacterium populum* sp. (linhagem BJ001) na degradação de compostos energéticos derivados do tolueno e da triazina foi descrito por Van Aken et al (2004). Newman e Reynolds (2005) afirmam que outros trabalhos sugerem que a presença de determinadas toxinas no meio pode afetar as respostas enzimáticas das populações endofíticas locais; entretanto, a habilidade de degradação de compostos não está presente em todos os endofíticos, bem como nem todos os endofíticos capazes de degradar compostos tóxicos têm a capacidade de fazê-lo em todos os locais onde o contaminante está presente. Por este motivo, a introdução de endofíticos modificados geneticamente tem sido estudada. Barac et al (2004) têm desenvolvido um método para modificar geneticamente endofíticos com a capacidade de degradar o tolueno. Lodewyckx et al (2001) introduziu um sistema níquel-resistente de *Ralstonia metallidurans* (31A) em *Burkholderia cepacia* (L.S.2.4) e *Herbaspirillum soropedicae* (LMG2284). A planta *Lupinus luteus* L. inoculada com a *B. cepacia*, cresceu em um substrato enriquecido com níquel, mostrando aumento de 30% na concentração deste elemento nas raízes.

A combinação entre plantas e bactérias pode aumentar a degradação de contaminantes da rizosfera, entretanto o papel desempenhado pela microbiota indígena durante o desenvolvimento da planta em solos contaminados precisa ser mais bem esclarecido (LODEWYCKX et al, 2002).

2.5.5 Controle biológico

O controle biológico consiste no uso de inimigos naturais na redução dos danos causados por fitopatógenos. De acordo com Cook e Baker (2003), pode ser definido como a redução do inóculo ou da atividade deletéria de um patógeno pela ação de um ou mais organismos, com exceção do homem, mas contando com a participação ativa deste. Neste sentido, difere do controle natural, pois este ocorre sem a intervenção humana.

O potencial dos endofíticos em ações relacionadas ao controle biológico está associado a mecanismos como a ocupação do mesmo nicho ecológico que os fitopatógenos (HALLMANN et al, 1997), a competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira (SCHARDL & PHILLIPS, 1997), a produção de antimicrobianos (STROBEL et al, 1999) e a indução de resistência sistêmica (VAN LOON et al, 1998), também podem ser citados o parasitismo ao patógeno e a insetos/pragas (AZEVEDO et al, 2000). O emprego de endofíticos com fins de biocontrole é uma interessante alternativa à utilização de agrotóxicos, reconhecidamente danosos ao meio ambiente, tornando-se uma alternativa aos anseios da sociedade por um sistema de produção sustentável, com menor impacto ambiental (POMELLA et al, 2007).

Fungos do gênero *Trichoderma* são bastante estudados em suas características aplicáveis ao biocontrole, como o micoparasitismo, a produção de antibióticos e enzimas líticas (quitinases, glucanases), capacidade de competição e competência rizosféricas (HOWELL, 2003). O fungo *Trichoderma stromaticum* tem sido aplicado em estratégias de redução do fungo *Moniliophthora perniciosa* (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005) no cultivo do cacau, sendo até o momento o microrganismo mais promissor utilizado no biocontrole da vassoura-de-bruxa (POMELLA et al, 2007). Os resultados promissores nas pesquisas com o *T. stromaticum* levaram ao desenvolvimento do Tricovab, um produto cuja formulação é baseada nos esporos do fungo, sendo indicado como agente antagonista ao fungo causador da vassoura-de-bruxa. Rubini et al (2005), estudando a diversidade dos fungos endofíticos do cacaueiro e o potencial da mesma no controle do *M. perniciosa*, relata haver encontrado alguns fungos com potencial antagonista. Um deles, inclusive, da espécie *Gliocladium catenulatum*,

foi capaz de reduzir a incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacau em 70%. Outro trabalho também relacionado ao controle biológico em cacauzeiros, foi relatado por Arnold et al (2003), no qual 7 espécies endofíticas de três gêneros endofíticos (*Colletotrichum*, *Xylaria* e *Fusarium*) foram inoculados em folhas de cacauzeiros infectados por *Phytophthora* sp., tendo sido demonstrada a redução da área de necrose induzida pelo patógeno tanto em folhas novas como em maduras.

De Boer et al (1999) obtiveram bons resultados ao testar a combinação compatível das linhagens RE8 e RS111-a, respectivamente pertencentes às espécies *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens*, na supressão da fusariose em rabanete. *Pseudomonas cepacia* Burkholder (Pc742) se mostrou eficiente no controle do fungo *Cercospora arachidicola* em amendoim (KNUDSEN et al, 1987). Isolados bacterianos, dentre eles *Bacillus lentimorbus* e *B. cereus*, apresentaram resultado superiores a 50% na supressão da ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* (SHIOMI et al, 2006).

Azevedo et al (2000) citam diversos exemplos da aplicabilidade dos endofíticos no controle ao ataque de insetos herbívoros, dentre eles a proteção de elmos pelo fungo endofítico *Phomopsis oblonga* contra o besouro *Physocnemum brevilineum*, associada a um efeito repelente exercido por compostos tóxicos produzidos pelo fungo (WEBBER, 1981). Anos mais tarde, esta informação foi confirmada por Claydon et al (1985), ao demonstrarem que endofíticos da família *Xylareacea* são capazes de sintetizar metabólitos secundários capazes de afetar as larvas do besouro. As interações são positivas para as plantas hospedeiras, mas podem ser negativas em relação aos insetos pragas.

A ação antagônica também pode se dar pela produção de toxinas pelos endofíticos ou estímulos à produção das mesmas pelas plantas. Algumas dessas substâncias podem também ser responsáveis pela proteção das plantas, especialmente gramíneas, contra animais herbívoros. Em alguns casos, plantas conhecidas por sua toxicidade são hospedeiras de microrganismos produtores de alcalóides e terpenóides, que intoxicam animais silvestres, protegendo assim a planta da herbivoria por vertebrados e invertebrados (PEIXOTO NETO et al, 2002; YOUNG et al, 2006).

2.6. Ferramentas moleculares aliadas às pesquisa com endofíticos

Técnicas clássicas utilizadas no estudo da microbiologia têm sido empregadas nas pesquisas com microrganismos endofíticos, as quais datam de mais de um século. Ao longo dos anos, as ferramentas disponíveis à pesquisa com microrganismos têm fornecido muito mais recursos, permitindo que as possibilidades de aplicações atribuídas a estes microrganismos sejam ampliadas. O advento da era molecular, por exemplo, tem disponibilizado técnicas capazes de auxiliar na obtenção de respostas extremamente procuradas. As aplicações das técnicas moleculares no estudo da microbiota têm prestado informações referentes à caracterização de espécies e análises filogenéticas, estudos da dinâmica populacional pós-inoculação no hospedeiro, expressão gênica relacionada às interações endófito-hospedeiro, além da utilização de mutantes espontâneos ou geneticamente modificados a fim de expressar/silenciar genes de interesse.

Alguns genes cujas seqüências têm como característica a conservação evolutiva e a co-existência em múltiplas espécies são utilizados em estudos filogenéticos. Seqüências individuais dos genes ribossomais (rDNAs) que codificam as sub-unidades 16S, 23S e 5S, por exemplo, são altamente conservadas no genoma e podem ser hibridizadas heterologicamente com os genes de rDNA de muitas espécies de microrganismos (WOESE, 1987). O 23S rDNA tem aplicabilidade na comparação de similaridade entre mutantes resistentes a antibióticos e seus respectivos tipos selvagens (SHISHIDO et al, 1999). O 16S rDNA é sem dúvida o mais utilizado (ARAÚJO et al, 2002; CANKAR et al, 2005; SIQUEIRA JR. & RÔÇAS, 2003), apesar de que esse gene sozinho pode não ser suficiente para a identificação em nível de subespécie (REVA et al., 2004), principalmente devido à existência de múltiplas cópias em uma única célula. Genes ideais para a identificação microbiana devem possuir seqüências altamente conservadas dentro de uma mesma espécie, mas com variações suficientes inter-espécies para permitir a identificação espécie-específica (GOH et al, 1996). A busca por outros genes de aplicabilidade em estudos taxonômicos e filogenéticos tem motivado diversas pesquisas, sendo que a tendência atual é a utilização múltiplos genes para tal finalidade (YAMAMOTO & HARAYAMA, 1995).

Dentre outros genes considerados estão o *gyrA*, que codifica a proteína da subunidade β da enzima DNA girase; o *cheA* que codifica a histidina quinase (REVA et al, 2004), o *rpoB* que codifica a subunidade β da RNA polimerase (DAHLLOF et al, 2000); e o *hsp-60* que codifica a proteína de 60 kDa de resposta a choque térmico (GOH et al, 1996; KWOK et al, 1999).

Além do seqüenciamento, técnicas relacionadas à amplificação específica desses genes têm sido utilizadas, desde a clássica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) até modificações da mesma, tais como RAPD (Reações de Amplificação Aleatória de Polimorfismos de DNA), Nested-PCR (SIQUEIRA JR. & RÔÇAS, 2003) e ARDRA (Análises de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado). Na detecção destas amplificações, além das técnicas de eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida, também têm sido utilizadas variações como DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) e TGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura) (MUYZER & SMALLA, 1998).

Em estudos dirigidos a espécies ou gêneros conhecidos ou mesmo previstos, a PCR tornou-se uma das estratégias mais utilizadas na identificação e comparação de microrganismos; entretanto, em se tratando de estudos nos quais não se disponibiliza de informações acerca do genoma de interesse, o RAPD que utiliza como iniciadores oligonucleotídeos curtos (geralmente decâmeros) de seqüência arbitrária consiste no método mais indicado (OLIVEIRA et al, 2000). Este método resulta na amplificação de fragmentos aleatórios que refletem as características particulares de um dado genoma, cuja separação por eletroforese produz um padrão de bandas denominado *DNA fingerprint* – uma impressão digital genômica que permite distinguir diferentes espécies e mesmo populações distintas de uma mesma espécie (FUNGARO & VIEIRA, 1998). Apesar de sua utilidade e ampla aplicabilidade em diversos casos, esta técnica sofre críticas associadas a problemas de reproducibilidade entre laboratórios (por ex. JONES et al, 1997; PÉREZ et al, 1998).

2.7. Cacau como planta-modelo para o estudo

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma planta perene, umbrófila, de porte arbóreo, típica de clima tropical e nativa de floresta úmida do sub-bosque (SOUZA & DIAS, 2001), pertence à família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, ao qual pertence também o cupuaçu (*T. grandiflorum*), representando as duas únicas espécies exploradas comercialmente no Brasil, das 22 que compreendem o gênero. Outras características do cacauero incluem ser uma planta dicotiledônea, cujas sementes representam a parte mais aproveitável economicamente. Também classificado como cauliflora, dada à apresentação de almofadas florais ao longo do tronco e ramificações mais desenvolvidas; suas flores são hermafroditas e pentâmeras, apresentando pétalas, sépalas, estames e estaminóides (MONTEIRO & AHNERT, 2007). Normalmente apresenta uma raiz principal, denominada pivotante, da qual partem ramificações laterais.

A origem provável do cacauero é a região do alto Amazonas, de onde a planta haveria se espalhado em duas direções principais, resultando nos grupos 'Criolo' e 'Forastero', sendo o primeiro cultivado na Venezuela, Colômbia e Equador, no norte da América Central e no México, e o segundo no norte do Brasil e nas Guianas. Na Ásia, tem relevância econômica na Indonésia, principalmente, enquanto no continente africano é um cultivo de grande importância em países como Costa do Marfim, Gana e Nigéria, apesar de ter perdido espaço neste último após a descoberta de reservas de petróleo (SOUZA & DIAS, 2001).

A lavoura cacauera, especialmente no âmbito sul-baiano, tem atravessado um período popularmente denominado de "crise do cacau", cujo início data aproximadamente do ano de 1987. As razões desta crise têm sido principalmente atribuídas à invasão epidêmica e infestação das lavouras pelo fungo *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005). Entretanto, segundo Souza e Dias (2001), diversos outros fatores podem ter contribuído como causas da crise, tais como a descapitalização dos produtores em função da baixa cotação do cacau à época; a baixa competitividade do setor, em função das lavouras se apresentarem já antigas; à ocorrência de estresse hídrico por mais de seis anos consecutivos na região etc. De fato, alternativas de

revitalização desta cultura têm sido estudadas e propostas. Segundo Pomella et al (2007), uma das grandes promessas para o controle de doenças do cacau deu-se a partir da descoberta de microrganismos endofíticos no interior de cacauzeiros. Ainda segundo os autores, a ação destes microrganismos, sejam bactérias ou fungos, necessita ainda de muitas pesquisas até que sejam alternativas seguras e adequadas aos produtores de cacau brasileiros. Sendo assim, os estudos apresentados neste trabalho constituem esforços de investigação científica nesse sentido.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultivo e manutenção dos estoques dos isolados 344 e 629.

As primeiras colônias correspondendo aos isolados denominados '344' e '629' foram cedidas pelo Centro de Estudos do Cacau da empresa Almirante Cacau Agrícola, Comércio e Exportação LTDA, tendo sido originalmente isoladas de cacauzeiros jovens e sadios, juntamente com outros isolados endofíticos (J.T. de Souza & A.W.V. Pomella, não publicado). Para a obtenção de estoques de armazenamento por longo prazo destes isolados, colônias foram transferidas para microtubos de 1,7 ml, contendo 600 µl de meio líquido TS (Tryptocaseína de Soja), cuja composição inclui 15 g de triptona, 5 g de peptona, 5 g de NaCl por litro de meio. Após 48h de incubação, foram adicionados 400 µl de glicerol a 80% em cada tubo, sendo estes armazenados a -80°C. Estes estoques foram utilizados ao longo de todo o trabalho. Para os diversos procedimentos de cultivo dos isolados ao longo do trabalho, foi padronizada a utilização do meio de cultura TSA (Tryptocaseína de Soja-Ágar), adicionando-se 12 g de ágar para cada 1 L de meio TS.

3.2. Relação entre UFC e densidade ótica para os isolados 344 e 629, utilizando diluições seriadas.

Três séries de experimentos de diluições seriadas foram realizadas para esta finalidade. Para a obtenção da suspensão inicial (10^0), uma colônia individual do isolado de interesse foi disposta ao centro de uma placa de Petri contendo meio de cultura TSA, sendo adicionados 100 µl de água destilada estéril e espalhada por toda a placa com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Após 48 h de incubação à temperatura ambiente ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), uma cobertura de células em

toda a placa era obtida. A esta cobertura foram adicionados 10 ml de água destilada estéril para obter a suspensão inicial de células, constituindo este o tubo '10⁰'. A partir desta suspensão foram feitas as diluições de 10⁻¹ a 10⁻¹² (correspondendo a diluições de 10 a 10¹² vezes), adicionando-se 1 ml de cada diluição em tubos estéreis de 15 ml, contendo 9 ml de água destilada estéril. Foram plaqueados 100 µl das diluições 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ e 10⁻¹² em meio TSA, em triplicata. Após 48 h de incubação, o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi contado. Esses valores de UFCs foram associados a diluições 10⁻² e 10⁻³, visto que foi observado que as respectivas leituras de D.O. situavam-se entre 0,1 e 1,0, consideradas como dentro da faixa de linearidade padrão do espectrofotômetro, para comprimento de onda de 600 nm. Desse modo, estas foram as diluições padronizadas para as leituras de D.O. nos experimentos subsequentes. Utilizou-se um espectrofotômetro Micronal™, modelo B380.

3.3. Extração de DNA genômico dos isolados

Colônias individuais dos isolados de interesse cultivadas em meio TSA foram colhidas com o auxílio de alça de Platina e adicionadas a microtubos de 1.7 ml contendo 100 µl de Tampão de Lise Celular (NaOH 0,05 M; SDS 0,25%). Estas suspensões bacterianas foram então submetidas à fervura em banho-maria por 15 min e centrifugadas a 10.000 rpm, 2 min. Após este procedimento, os sobrenadantes foram separados e diluídos na proporção 1:20 em água 'MiliQ' estéril, sendo armazenados a -20 °C.

3.4. Obtenção de mutantes resistentes a antibióticos para estudos de colonização.

Inicialmente, foram preparados meios acrescidos de Rifampicina e de Ácido Nalidíxico, separadamente, a partir de soluções padrão de 100 mg/ml em metanol e em etanol, respectivamente (para a diluição do Ácido Nalidíxico neste álcool foi necessário alcalinizar a solução até pH=10). Após o preparo de diluições de 10⁶, 10⁷ e 10⁸ UFC/ml (ver 3.2) dos isolados selvagens 344 e 629, 50 µl de

cada suspensão foram espalhados com alça de Drigalsky em meio TSA acrescido de um dos antibióticos a 50 µg/ml, em triplicata, e incubado a temperatura ambiente ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) *overnight*. Uma colônia de cada isolado crescida no meio TSA+antibiótico a 50 µg/ml foi transferida para uma placa com meio TSA+antibiótico a 100 µg/ml, adicionados 100 µl e espalhado com alça de Drigalsky, novamente incubadas à temperatura ambiente *overnight*, em triplicata. O procedimento foi repetido em meio TSA+antibiótico a 150 µg/ml, e os mutantes espontâneos foram transferidos individualmente para microtubos contendo meio líquido TS+glicerol 80% (proporção 3:2), incubadas por 48 h ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e estocadas a -80°C (ver item 3.1) (MEYNEL & MEYNEL, 1970; ZINNIEL et al, 2002).

3.5. RAPD para comparação entre mutantes e isolados selvagens

O DNA dos isolados 344 e 629 e dos mutantes espontâneos resistentes à Rifampicina e ao Ácido Nalidíxico foi extraído conforme descrito acima (item 3.3) e quantificado para ser utilizado em reações de amplificação aleatória de polimorfismos de DNA (RAPD). Foram utilizados os primers decâmeros 'D7' (5'-TTGGCACGGG-3'), 'M12' (5'-GGGACGTTGG-3') e 'M13' (5'-GGTGGTCAAG-3'), conforme sugeridos por Keel et al (1996). As reações foram procedidas de acordo com o seguinte protocolo: 1x tampão de Taq polimerase (+KCl), MgCl_2 a 2 mM, cada dNTP a 0,2 mM, *primer* a 40 pmol, ~30 ng de DNA e água MiliQ estéril para um volume final de 25 µl. As amostras foram amplificadas em termociclador PTC-100 (MJ Research™), seguindo uma programação de desnaturação inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min, seguida por 40 ciclos compostos por $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s, anelamento a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s e extensão a 72°C por 1 min e 30 s, com um passo de extensão final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 min. Após adição de 5 µl do corante Azul de Bromofenol (0,25%), as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,2%) por 90 min a 100 W, 300 mA e 100 V, sendo corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

3.6. Estudos metodológicos para inoculação de endofíticos em mudas de cacau e análise da colonização e de efeitos na promoção de crescimento.

Foram realizados três experimentos de inoculação dos endofíticos sob estudo, em casa-de-vegetação do setor de Fisiologia Vegetal do CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau – CEPLAC). Em todos eles, as sementes foram plantadas em vasos de poliestireno, nos quais foram colocados aproximadamente 500 g de uma mistura não estéril de terriço e areia lavada na proporção 1:1. O solo utilizado nos experimentos de colonização teve a mesma origem, isto é, foi obtido em área de terra do CEPEC (aqui denominado como ‘solo CEPEC’). Amostras do mesmo foram submetidas a análises química e física, realizadas pelo Laboratório de Solos do CEPEC. O sistema de rega foi manual e as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação por 90 dias.

3.6.1. Experimento de Inoculação I

O experimento I foi realizado de dezembro de 2006 a março de 2007, envolvendo 90 mudas, obtidas a partir de sementes de cacau comum, originadas de cacauzeiros da CEPLAC. Inicialmente, o tegumento das sementes foi extraído com o auxílio de pinças e bisturis, em câmara de fluxo laminar (Figura 1). Após esta etapa, as sementes foram desinfestadas em etanol 70% por 1 min, seguido de NaClO a 2% de cloro ativo por 10 min, mais três lavagens em H₂O estéril, sendo dispostas em placas contendo meio Agar-Água a 1,5%. Após um período de 5 a 6 dias, as sementes germinadas foram selecionadas para a inoculação, realizada através da pipetagem das suspensões bacterianas dos isolados 344-1.1 (mutante) e 629 (selvagem), com concentração 10⁷ UFC/mL (J.T. de Souza, comunicação pessoal). Foram utilizadas:

- 30 sementes inoculadas com 10 µl de H₂O estéril, para servirem como mudas controle (tratamento ‘ctrl’).

- 30 sementes inoculadas com 10 µl de uma suspensão de 10⁷ UFC/mL do mutante ‘1.1’ do isolado 344, escolhido dada a sua semelhança com o tipo selvagem pelo método de RAPD descrito acima (tratamento ‘344-1.1’).

- 30 sementes inoculadas com 10 µl de uma suspensão de 10⁷ UFC/mL do mutante 344-1.1 acima e mais 10 µl de uma suspensão de 10⁷ UFC/mL do isolado selvagem 629 (tratamento '344-1.1 + 629').

Devido à impossibilidade de seleção de mutantes espontâneos do isolado 629 resistentes a antibiótico, não foi realizada a inoculação do mesmo separadamente, visto que o método planejado para a recuperação dos endofíticos a partir das mudas era o plaqueamento em meio acrescido de antibiótico. Optou-se, assim, pela inoculação associada de 344-1.1 e 629, cientes da perda de informação em relação ao 629 isoladamente que se teria nesse caso (ver seção 4.3).

A compatibilidade entre os isolados foi previamente confirmada *in vitro* pelo método de antibiose bactéria x bactéria (MARIANO et al, 2000). As colônias foram co-inoculadas em placas de Petri contendo meio TSA, incubadas *overnight* e observadas após 24h e 48h.

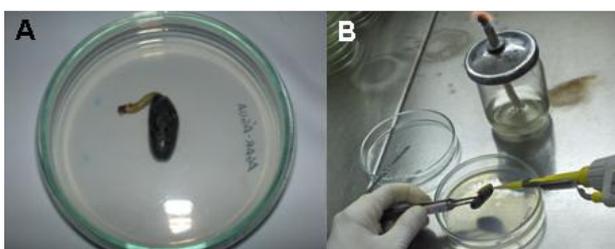


Figura 1: (A) Sementes de cacau germinadas em placas contendo meio Agar-água (1,5%). (B) Metodologia de inoculação dos isolados endofíticos por pipetagem, com aplicação de 10 µl de suspensão bacteriana de aproximadamente 10⁷ UFC/ml.

As mudas foram observadas e tiveram a altura da haste medida aos 16, 36, 50 e 86 dias de inoculação. A cada avaliação, 5 mudas foram retiradas do experimento para maceração (extrato) ou plaqueamento de segmentos da raiz, caule e folhas, visando a recuperação dos isolados endofíticos inoculados. Estes órgãos separadamente foram pesados para aferição da matéria fresca (em g), desinfestados com etanol e NaClO conforme descrito acima, e 1g de cada órgão foi macerado com 10 mL de H₂O estéril. A partir deste macerado, 100 µl do extrato obtido foi plaqueado em triplicata e, após 48 h, as colônias endofíticas obtidas foram avaliadas, contadas e reisoladas em meio TSA e TSA+Rifampicina, para posteriormente serem estocadas em meio TS + glicerol 80%, à -80°C. Os extratos dos órgãos da planta foram utilizados somente para as avaliações aos 16

e 36 dias após a inoculação. O aspecto geral do desenvolvimento das mudas nesse experimento pode ser visto na Figura 2.



Figura 2: Aspecto geral das mudas aos 25 dias após a inoculação (Experimento I – três tratamentos).

Devido à impossibilidade de obtenção de resultados de quantificação precisos através do plaqueamento dos extratos das raízes, caules e folhas em meio TSA+Rifampicina (100 mg/ml)(ver seção 4.4.1), a partir da terceira avaliação aos 50 dias pós-inoculação foi utilizada a metodologia de plaqueamento direto de segmentos de aproximadamente 3 cm das raízes, caules e folhas das mudas. Nas datas correspondentes a 50 e 86 dias após a inoculação, os segmentos foram pesados, desinfestados, plaqueados e, após 48 h, as colônias endofíticas bacterianas obtidas foram avaliadas visualmente em relação à presença ou ausência de semelhanças morfológicas aos isolados inoculados. Tanto os possíveis isolados inoculados quanto alguns contaminantes foram reisolados em meio TSA ou TSA+Rifampicina (100 mg/ml), de acordo com a sua placa de origem, para posteriormente serem estocadas em meio TS + glicerol 80%, à -80°C. O isolamento dos contaminantes visou fornecer material para extração posterior de DNA correspondente a controles negativos para os testes moleculares de recuperação dos endofíticos (seção 3.10)

3.6.2. Experimento de Inoculação II

Este segundo experimento de colonização envolveu 225 mudas, tendo sido realizado de março a julho de 2007, utilizando-se também sementes de cacau

comum de cacauzeiros da CEPLAC. Foi utilizada a mesma metodologia para extração do tegumento das sementes, seguida da desinfestação e germinação em meio Agar-Água 1,5%. Após um período de germinação de 5 a 6 dias, as sementes foram selecionadas para a inoculação (Figura 1).

Além da inoculação por pipetagem, foram testados outros dois métodos neste segundo experimento: a inoculação por *imersão* das sementes (SILVEIRA et al, 2004) em suspensões contendo os isolados endofíticos sob estudo, seguida do plantio das mesmas; e a aplicação de 100 ml dessas suspensões por rega, diretamente no *solo* dos vasos onde foram plantadas as sementes germinadas, 20 dias após o plantio (BRINGEL et al, 2001). Para o procedimento de inoculação por imersão (I), 10 sementes foram submersas por aproximadamente 60 min em cerca de 300 ml de suspensões contendo o(s) isolado(s) de interesse, nas diluições 10^{-2} ($\sim 10^{10}$ UFC/ml) e 10^{-5} ($\sim 10^7$ UFC/ml), a partir das suspensões iniciais (seção 3.2). As sementes correspondendo ao tratamento controle (ctrl) foram imersas em água destilada estéril pelo mesmo tempo. As sementes dos tratamentos com endofíticos foram imersas em suspensões contendo somente o isolado 344-1.1 (mutante), bem como contendo este em conjunto com o isolado 629 (tipo selvagem), de forma semelhante à descrita anteriormente para o experimento I.

Para o procedimento de inoculação por rega no solo (S), as sementes também foram submetidas à extração do tegumento, desinfestação e pré-germinação, sendo, entretanto, imediatamente plantadas após estas etapas. Decorridos 20 dias deste plantio, 100 ml das suspensões contendo células vegetativas do(s) isolado(s) de interesse nas concentrações acima foram adicionados ao solo dos vasos onde as sementes foram plantadas. Nessa fase, as mudas já estavam desenvolvidas e a maioria já exibia as primeiras folhas (Figura 2). O sumário dos tratamentos de endofíticos e controle, tipos de inoculação e repetições estão descritos na Tabela 1.

Não foram realizadas as medidas de altura da haste e matéria fresca nas mudas do experimento II devido a problemas relacionados à perda desuniforme de mudas nos diferentes tratamentos (ver seção 4.4.2). Entretanto, foram realizados plaqueamentos aos 15 e aos 30 dias após a inoculação, nas mesmas condições das últimas avaliações realizadas no experimento anterior; foram

plaqueados segmentos de aproximadamente 3 cm das raízes, caules e folhas das mudas, após serem separadamente pesados e desinfestados.

Tabela 1: Métodos de inoculação, tratamentos, diluição e repetições (nº mudas) utilizados para o experimento de inoculação II.

Método de inoculação	Tratamento	Diluição	D.O. ¹ (600 nm)	Mudas
Pipetagem (P)	ctrl	H ₂ O estéril		15
	344-1.1	10 ⁻²	0,228	15
		10 ⁻⁵		15
	344-1.1+629	10 ⁻²	0,164 / 0,380	15
		10 ⁻⁵		15
	Imersão (I)	ctrl	H ₂ O estéril	
344-1.1		10 ⁻²	0,215	15
		10 ⁻⁵		15
344-1.1+629		10 ⁻²	0,237 / 0,427	15
		10 ⁻⁵		15
Solo (S)		ctrl	H ₂ O estéril	
	344-1.1	10 ⁻²	0,189	15
		10 ⁻⁵		15
	344-1.1+629	10 ⁻²	0,189 / 0,378	15
		10 ⁻⁵		15
	Total			

¹ Valores de densidade ótica (D.O.) à esquerda correspondem ao isolado 344 e à direita ao 629.

3.6.3 – Experimento de Inoculação III

O terceiro experimento foi realizado de outubro de 2007 a fevereiro de 2008, envolvendo 150 mudas. Foram usadas sementes de cacau comum (variedade SIAL 70), de cacauzeiros da Fazenda Almirante Cacau (Itajuípe-BA). O procedimento de extração do tegumento das sementes, desinfestação e germinação em ágar-água (1,5 %) foi seguido da mesma forma descrita para os experimentos anteriores. Apenas as sementes pré-germinadas foram selecionadas para a inoculação. Neste experimento, por questão de praticidade e com base nos resultados do experimento anterior, foram repetidos somente os métodos de inoculação por imersão das sementes (I) em suspensões contendo os isolados endofíticos sob estudo, e a rega de 100 ml dessas suspensões diretamente no solo (S). Foram também repetidas as duas concentrações

utilizadas no experimento anterior – 10^{10} UFC/ml (diluição 10^{-2}) e 10^7 UFC/ml (dil. 10^{-5}). Os tratamentos passaram a ser designados por siglas a fim de simplificar sua forma de apresentação, sendo assim referidos ao longo do trabalho. Os métodos, tratamentos, diluições e repetições utilizados estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Métodos de inoculação, tratamentos, diluição e repetições (nº mudas) utilizados para o experimento de inoculação III.

Método inoculação	Tratamento	Diluição	D.O. ¹ (600 nm)	Sigla	Mudas
Imersão (I)	ctrl	H ₂ O estéril		IC	15
	344-1.1	10^{-2}	0,227	IE-2	15
		10^{-5}		IE-5	15
	344-1.1+629	10^{-2}	0,230 / 0,406	IB-2	15
		10^{-5}		IB-5	15
Solo (S)	ctrl	H ₂ O estéril		SC	15
	344-1.1	10^{-2}	0,172	SE-2	15
		10^{-5}		SE-5	15
	344-1.1+629	10^{-2}	0,181 / 0,371	SB-2	15
		10^{-5}		SB-5	15
Total					150

¹ Valores à esquerda correspondem ao isolado 344 e à direita ao 629.

Neste terceiro experimento, as mudas foram avaliadas em relação à altura da haste e ao número de folhas aos 20, 36, 50 e 86 dias após a inoculação. A cada avaliação, 1 plântula de cada tratamento (2 métodos de inoculação x 3 tratamentos de endofítico) foi retirada do experimento para plaqueamento de segmentos da raiz, caule e folhas, devidamente desinfestados, visando análise de recuperação dos endofíticos inoculados. Ao final de 90 dias, 6 mudas de cada tratamento foram submetidas à avaliação da matéria seca. As mudas foram medidas e pesadas, dispostas individualmente em sacos de papel, e em seguida permaneceram em estufa para secagem, a $60 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 72h. As 5 mudas restantes foram avaliadas em relação à sua tolerância à seca, sendo submetidas à privação de rega por 27 dias.

3.7. Efeitos da colonização endofítica nas taxas fotossintéticas e trocas gasosas

As mudas do experimento de inoculação III foram submetidas à coleta de dados quanto às trocas gasosas e taxas fotossintéticas. Foram realizadas três aferições, entre as 8:00 h e 11:00 h, sendo a idade das mudas respectivamente 40, 75 e 90 dias, padronizando-se para tal medida a primeira folha completamente expandida de cada plântula. Foram tomadas as medidas de seis repetições (mudas) por tratamento, utilizando sistema portátil de medição fotossintética LI-6400 (Li-Cor, Nebraska, USA), equipado com fonte de luz artificial 6400-02B 'RedBlue', ajustada para uma densidade de fluxo de fótons compatível com o sombreamento da casa de vegetação. Este sistema realiza automaticamente uma avaliação em triplicata dos parâmetros de fotossíntese (A), condutância estomática (g_s), concentração interna (C_i) e atmosférica de CO_2 (C_a), em relação a outras variáveis como a taxa de transpiração, o déficit de pressão de vapor entre folha e ar, temperatura do ar e da folha, umidade relativa do ar, e intensidade de radiação interna fotossinteticamente ativa.

3.8. Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas referentes à quantidade de UFC e medidas de altura da haste e biomatéria fresca da raiz, caule e folhas (experimentos de inoculação I e III), bem como do número de folhas, taxas fotossintéticas e matéria seca ao final do experimento (experimento III), os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES & AYRES JR, 2007) de acesso livre (<http://www.mamiraua.org.br/download>), sendo a comparação de médias realizada através do teste de Tukey. O nível de significância estatística considerado para as análises foi de 5% ($P < 0,05$). Para os dados relacionados à quantidade de UFC, foram trabalhados apenas os parâmetros utilizados em estatística descritiva (médias, desvios padrão e coeficiente de variação). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado nos três experimentos realizados.

3.9. Seqüenciamento dos genes *16S rDNA*, *hsp-60* e *rpo-B*

Foram selecionados três genes para o seqüenciamento: *16S rDNA* (subunidade 16S do DNA ribossomal), *hsp-60* (*heat-shock protein* 60 kDa) e *rpo-B* (subunidade β da RNA polimerase DNA-dependente). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do CEPEC/CEPLAC. A amplificação dos fragmentos gênicos acima foi realizada a partir de reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* *16S rDNA Forward* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e *Reverse* (5'-CGGCTACCTTGTACGACTT-3'), *Hsp60 F* (5'-GAATTCGAIIGCIGGIGA(TC)GG IACIACIAC-3') e *R* (5'-CGCGGGATCC(TC)(TG)I(TC)(TG)ITCICC(AG)AAICCI GG IGC(TC)TT-3'); *rpoB F* (5'-GTTTTCC CAGTCACGACGTTGTAGGCGAAA TGGCWGAGAACCA-3') e *R* (5'-TTGTGAGCGG ATAACAATTTTCGAGTCTTTCGA AGTTGTAACC-3') (SIQUEIRA JR. & RÔÇAS, 2003; GOH et al, 1996; DIANCOURT et al, 2005).

As PCRs seguiram o seguinte protocolo de reação: 1x tampão para *Taq* polimerase (+KCl), $MgCl_2$ a 1,5 mM, cada *primer* a 20 pmol (F e R), cada dNTP a 200 μ M, ~10 ng/ μ l de DNA genômico, *Taq* DNA polimerase a 2 U (Fermentas™), e água miliQ estéril para um volume de reação de 50 μ l. As amostras foram submetidas a um programa de amplificação de 2 min a 94 °C para desnaturação do DNA, seguido por 10 ciclos de 94 °C por 45 s, temperatura de anelamento dos *primers* de 58 °C por 45 s com decréscimo de 1,0 °C por ciclo, e 72 °C por 1 min para alongamento, mais 30 ciclos nestas condições descritas, com um passo de extensão final a 72 °C, por 5 min. Para esta reação e subseqüentes, foi utilizado o termociclador PTC-100 (MJ Research™ – Peltier Effect Cycle).

Os produtos das reações de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA [pH 8]), corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV. As bandas correspondentes aos fragmentos de tamanho esperado foram excisadas do gel, submetidas à temperatura de -80 °C por 1 h e centrifugadas por 15 min, a 14.000 rpm. O sobrenadante obtido foi utilizado para o seqüenciamento, cuja reação foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: 1,0 μ l tampão de sequenciamento (5x), *primers F* ou *R* 2 pmol, DNA 30 ng (10 ng/ μ l) e 0,5 μ l BigDye mix versão 3.1 (*BigDye Deoxy Terminator Sequencing Kit* – Applied

Biosystems™), para um volume final de reação de 5 µl. O programa de amplificação seguido foi de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 58 °C por 30 s e extensão final a 72 °C por 4 min. As amostras foram, então, precipitadas com isopropanol 65% (20 µl), sendo cobertas com papel alumínio para um período de 15 min no escuro, à temperatura ambiente. As amostras foram mais uma vez centrifugadas (4.000 rpm, 40 min). Após esse período, o sobrenadante foi descartado e a placa contendo as amostras foi invertida sobre papel toalha para retirar o excesso de isopropanol. Foram acrescentados 100 µl de etanol 60 % e as amostras foram novamente centrifugadas (4000 rpm, 8 min). Para descarte do etanol, a placa foi invertida e centrifugada (700 rpm, 10 s) sobre papel toalha, sendo deixada a temperatura ambiente por 15 min para secar totalmente. Foram adicionados 10 µl de formamida a cada amostra e a placa foi, então, levada ao termociclador para desnaturação do DNA a 94 °C por 3 min. Em seguida, as amostras foram aplicadas no sequenciador automático modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems™).

As seqüências obtidas foram unidas pelo programa BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999) e alinhadas com o programa MEGA 3.1 (KUMAR et al., 2004). Bancos de dados públicos foram utilizados na comparação e identificação das seqüências, através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al, 1997).

3.10. Identificação molecular dos isolados endofíticos recuperados pós-inoculação

Dois procedimentos baseados em PCRs foram estudados. No primeiro, foram desenhados *primers* com base em seqüências de outros isolados pertencentes aos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus*, para serem utilizados em reações de amplificação gene-específicos. Alinhamentos múltiplos com essas seqüências (J.T. de Souza, informação pessoal) buscaram regiões que fossem específicas para as espécies *Enterobacter cloacae* (344) e *Bacillus subtilis* (629). Foram utilizadas seqüências dos genes *hsp60* (*heat shock protein*),

presente no gênero *Enterobacter*, e *spoA*, gene de esporulação em *Bacillus* spp. Estes genes foram seqüenciados para isolados de origem semelhante aos endofíticos aqui testados (Silva, 2007). Para o isolado 344, desenharam-se três *primers*: P1 (*forward*: 5'-TGA CTGCTCAGAACGAC-3'); P2 (*reverse* externo: 5'-AGCTACAGATGCCGCT-3') e P3 (*reverse* interno: 5'-TTCACGTTGTTCCGCAACC-3'). Para o 629, desenhou-se o par P4 (*forward*): 5'-GCGGAAATGCCAGCAG TG-3') e P5 (*reverse*: 5'-AGTATAACCAAACAACGAG). Os testes destes *primers* e das condições de amplificação ainda não foram concluídos.

No outro procedimento, tem-se utilizado cinco *primers* decâmeros de RAPD (AU-10, AU-14, OPT-14, OPS-08, OPW-05) buscando-se padrões de amplificação semelhantes entre os isolados pré-inoculação e pós-plaqueamento, de forma análoga à descrita acima (seção 3.4).

Não se apresentou aqui detalhes protocolares das amplificações (reagentes, concentrações, ciclos, temperaturas etc.), visto que as mesmas não foram ajustadas até este momento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Morfologia das colônias dos isolados 344 e 629

Devido à necessidade de reconhecimento das colônias dos isolados sob estudo quando cultivadas em meio TSA, imprescindível aos experimentos de plaqueamento pós-inoculação dos extratos/segmentos dos órgãos das mudas inoculadas, as colônias foram caracterizadas em relação ao seu aspecto morfológico. O isolado 344 forma colônias pequenas, circulares, convexas, brilhantes, lisas, de coloração levemente amarelada (Figura 3A). Esta coloração se intensifica especialmente quando o isolado é cultivado em meio TSA acrescido de Rifampicina. As colônias do isolado 629 são grandes, ligeiramente irregulares, de bordo elevado, cremosas, coloração branca brilhante (Figura 3B) (critérios de descrição de acordo Oplustil et al, 2004). Quando as colônias desses isolados crescem ao redor do órgão da plântula de onde foram recuperadas, a tendência é o isolado 344 formar um contorno mais definido e restrito ao redor do tecido, enquanto que o 629 apresenta um contorno geral mais expandido, de bordos irregulares (ver seção 4.4.2).

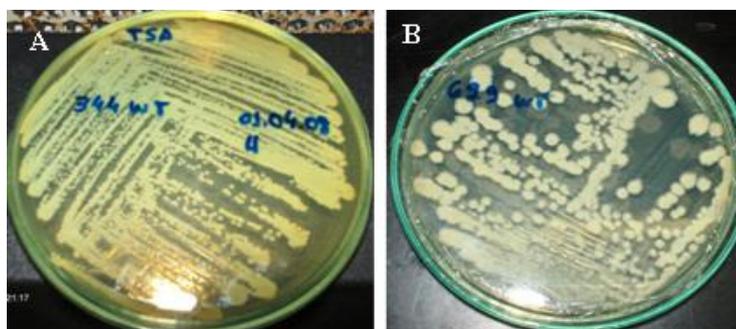


Figura 3: Aspecto morfológico das colônias dos isolados 344 (A) e 629 (B), em meio TSA.

Apesar de que microrganismos diferentes em relação às suas características metabólicas ou fisiológicas podem parecer muito semelhantes ao microscópio (MADIGAN et al, 2004), o reconhecimento das características morfológicas é um primeiro e importante passo na identificação, útil nos procedimentos de plaqueamento de extratos ou órgãos das mudas inoculadas com os endofíticos. Para a realização deste estudo foi necessária a habilidade de reconhecimento das colônias formadas pelos isolados 344 e 629 em meio TSA (e em meio TSA+Rifampicina, no caso do 344-1.1), a fim de que pudesse ser realizado o reisolamento das colônias obtidas com os plaqueamentos pós-inoculação.

4.2. Análise de conversão entre Unidades Formadoras de Colônias e densidade ótica das suspensões bacterianas dos isolados 344 e 629.

Com o objetivo de estabelecer uma relação entre Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e densidade ótica (D.O.) das suspensões bacterianas dos isolados 344 e 629 para serem utilizadas tanto nos experimentos de inoculação dos endofíticos em sementes de cacau, quanto na avaliação quantitativa posterior da colonização *in planta*, foram preparadas três séries de experimentos de diluições seriadas. As médias obtidas para a quantidade de UFC nos plaqueamentos em triplicata constam na Tabela 3 em relação às respectivas D.O. das diluições 1:100, a 600 nm.

É possível observar que, de um modo geral, houve tendência a um aumento da variação experimental com o aumento da diluição, o que pode ser percebido pela magnitude dos desvios padrões e, como consequência, pelos respectivos coeficientes de variação (CV). Em termos práticos, os resultados foram pouco promissores para o processamento de um grande número de amostras, pois os menores CV foram encontrados em diluições que forneceram um nº de UFC muito elevado. Isto implica que procedimentos mais laboriosos são necessários para maior precisão do método. A variação absoluta de experimento para experimento do nº de UFC numa mesma diluição em relação a um mesmo isolado foi relativamente grande, como, por exemplo, entre 100 e 1000 para a

diluição 10^{-11} , e 1 e 10 para a diluição 10^{-12} no caso do 629; para 344, a variação foi de 0 a 10 para diluição 10^{-12} , e de ~4 a 8 vezes para 10^{-10} (Tabela 3). De maneira geral, as variações encontradas podem ser consideradas compatíveis com o processo de diluição, pois geraram aproximadamente 1 log a menos em cada diluição para cada experimento, sendo essa tendência mais bem observada para o 344 que para o 629. Contudo, a variação encontrada entre experimentos indicou certo grau de incerteza quanto à confiabilidade em dados fornecidos por apenas um experimento isolado. Tais condições, obviamente, tornam o método ainda mais laborioso, apresentando uma baixa relação benefício/custo, pois indicam a necessidade de vários experimentos de plaqueamento-contagem para se obter uma estimativa média entre eles.

Tabela 3: Contagem de UFC em relação às medidas da densidade ótica (D.O.) para o procedimento de diluição seriada dos isolados 344 e 629.

Isol	Dil ¹	Experim. 1			Experim. 2			Experim. 3		
		D.O. ²	nº UFC ³	CV ⁴	D.O.	nº UFC	CV	D.O.	nº UFC	CV
344	-10		365 ± 37	10.1		122,7 ± 15,6	12.7		707,7 ± 335,8	47.5
	-11	,185	88,7 ± 31,9	35.9	,157	50,3 ± 39,5	78.5	,250	43,7 ± 13,5	30.9
	-12		10,3 ± 5,9	56.7		8 ± 6,6	82.0		0 ± 0	0
629	-10		907 ± 167,4	18.5		962,7 ± 35,9	3.7		462 ± 133,4	23.7
	-11	,375	566,7 ± 153	27.0	,450	257 ± 32,9	12.8	,354	43 ± 26,7	62.0
	-12		8,7 ± 6,1	70.5		79,7 ± 24,9	31.3		7,3 ± 4,5	61.5

¹ Expoente da base '10', referente ao passo correspondente da diluição seriada.

² Para a conversão, foram sempre consideradas densidades óticas entre 0,150 e 0,250 para o isolado 344 e entre 0,350 e 0,450 para o isolado 629 no espectrofotômetro, a 600 nm, correspondendo às diluições 10^{-2} (1:100) das culturas saturadas.

³ Média e desvio-padrão de 3 repetições (placas) por experimento.

⁴ Coeficiente de Variação (em %)

Não foi possível obter colônias de forma adequada a partir da diluição dos extratos das mudas e, portanto, aplicar a metodologia para a contagem de UFC de tal modo que esta análise de conversão (Tabela 3) pudesse ser utilizada. Desse modo, os resultados apresentados serviram apenas como referência metodológica para as suspensões a serem utilizadas nos experimentos de inoculação dos endofíticos. Com base na diluição com melhor relação custo/benefício para avaliação (10^{-11}), estabeleceu-se uma relação entre diluições da cultura concentrada e as respectivas estimativas do nº de UFC (Tabela 4), que serviu de base para os experimentos de inoculação (seção 4.4). Conforme

indicado, as diluições em relação às culturas concentradas (suspensões iniciais) que foram utilizadas nos experimentos de colonização dos endofíticos em sementes de cacau foram as diluições 10^{-2} , correspondente a 10^{10} UFC/ml, e 10^{-5} , correspondente a 10^7 UFC/ml.

Tabela 4: Cálculos utilizados para conversão entre UFC obtidas e quantidade de UFC para os experimentos de inoculação.

Diluições	Médias UFC ¹	Correspondência em UFC para inoculação
10^{-2}	---	1 a 6×10^{10}
10^{-5}	---	1 a 6×10^7
10^{-10}	414.3	$4,1 \times 10^2$
10^{-11}	56.4	$5,6 \times 10^1$
10^{-12}	6,4	6×10^0

¹ Foram considerados em conjunto os resultados para os três experimentos do 344 + o 3º experimento do 629 (Tabela 3), sendo estas, portanto, médias referentes a 4 entradas de dados.

A definição das concentrações a serem estudadas foi compatível com aquelas encontradas em outros trabalhos. Por exemplo, Shishido et al (1999) utilizaram bactérias ressuspensas em tampão fosfato estéril 10 mM, a concentrações de 10^6 UFC/ml para a suspensão de *Bacillus* e 10^8 UFC/ml para *Pseudomonas*, em experimentos de inoculação destas bactérias em mudas de abeto com o objetivo de verificar efeitos de promoção de crescimento. Os mesmos autores descrevem a utilização de suspensões de 10^7 UFC/ml para inoculação também de *Bacillus* em mudas de pinho e abeto (SHISHIDO et al, 1996). Frommel et al (1991) descrevem a inoculação de *Pseudomonas* em culturas de batata a partir de suspensões centrifugadas e ressuspensas em água destilada estéril, ajustadas por espectrofotometria em aproximadamente $2,8 \times 10^8$ UFC/ml, para a verificação de efeitos de promoção de crescimento. Benchimol et al (2000), trabalhando com inoculação de bactérias endofíticas para o controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino, utilizaram uma concentração de 10^9 UFC/ml, obtida de suspensões bacterianas centrifugadas e ressuspensas em

água destilada estéril, ajustando tal concentração por turbidimetria a 550 nm. Gomes et al (2003) solubilizaram as colônias em MgSO₄, após ajuste de concentração em fotocolorímetro a 580 nm, mesmo método descrito por Silveira et al (2004).

4.3. Obtenção de mutantes resistentes a antibióticos para estudos de colonização

Considerando o potencial uso de mutantes resistentes a antibióticos em experimentos de inoculação de endofíticos (ZINNIEL et al, 2002; FISHER et al, 1992; Kim et al, 1997), foram selecionados mutantes espontâneos resistentes à Rifampicina e Ácido Nalidíxico. No trabalho de Zinniel et al (2002), 90% de suas linhagens bacterianas tanto gram-positivas quanto gram-negativas foram sensíveis à Rifampicina. Os principais motivos para obter-se mutantes espontâneos estão relacionados (i) à possibilidade de recuperação diferenciada dos endofíticos em meio contendo o antibiótico e (ii) à inibição do crescimento de contaminantes, teoricamente permitindo uma identificação mais clara e precisa dos microrganismos inoculados.

A metodologia aplicada para obtenção de mutantes espontâneos resistentes aos antibióticos Rifampicina e Ácido Nalidíxico levou à obtenção de mutantes apenas para o isolado 344 (Tabela 5).

Tabela 5: Mutantes espontâneos de 344, resistentes a Rifampicina e ao Ácido Nalidíxico.

	Rifampicina				Ácido Nalidíxico		
Placa 1 (50 µm/ml)	1.1	1.2	1.3		Placa 1 (50 µl)	1.0	1.1
Placa 2 (50 µm/ml)	2.1	2.2	2.3	2.4	Placa 2 (50 µl)	2.0	
Placa 3 (50 µm/ml)	3.1	3.2			Placa 3 (50 µl)	---	

Uma vez obtidos os mutantes, era necessário verificar a semelhança genotípica entre eles e o isolado selvagem, baseando a escolha daqueles que pudessem ser utilizados nos experimentos de colonização como sendo os mais semelhantes ao isolado original, mas resistentes ao(s) antibiótico(s). Assim, foi

realizada a comparação do perfil de amplificação dos isolados selvagens e mutantes por RAPD com os primers decâmeros de seqüência aleatória D7 e M12.

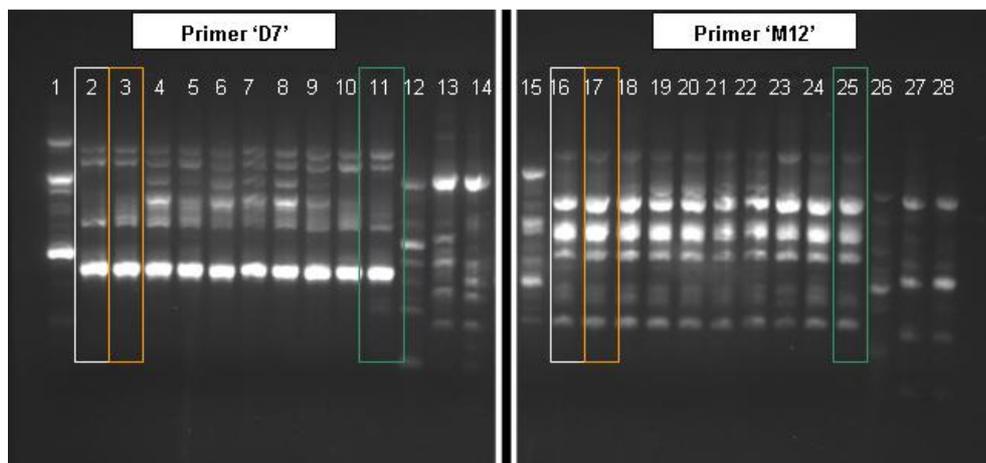


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose (2%) para os produtos das reações de RAPD para os mutantes obtidos resistentes a antibióticos, indicando padrão de bandas em relação aos isolados *wild-type* sob estudo. As amostras de 1 a 15 foram testadas com o Primer D7, as amostras de 16 a 28 com o primer M12. Tais amostras correspondem aos seguintes isolados (nesta ordem): 629 WT (1 e 15), 344 WT (2 e 16), mutantes 344-1.1 (3 e 17), 1.2 (4 e 18), 1.3 (5 e 19), 2.1 (6 e 20), 2.2 (7 e 21), 2.3 (8 e 22), 2.4 (9 e 23), 3.1 (10 e 24), e 3.2 (11 e 25), correspondendo ao antibiótico Rifampicina; mutantes 344-1.0 AN (12 e 26), 1.1 AN (13 e 27) e 2.0 AN (14 e 28), correspondendo ao antibiótico Ácido Nalidíxico.

Conforme indicado na Figura 4, o isolado 344 e os respectivos mutantes '1.1' e '3.2', espontaneamente resistentes ao antibiótico Rifampicina, foram escolhidos para os experimentos de colonização, devido à presença de um padrão de amplificação muito semelhante ao do tipo selvagem, para os dois primers testados. Ambos foram confirmados após ser testada a estabilidade de sua resistência espontânea, em meio TSA adicionado de 150 µg/ml deste antibiótico. A morfologia geral das colônias formadas pelo 344-1.1 são indistinguíveis do isolado selvagem original.

Os mutantes do isolado 344 considerados resistentes ao antibiótico Ácido Nalidíxico não produziram um padrão de amplificação semelhante ao deste isolado, por isso não foram utilizados nos experimentos de colonização. Também não foi possível obter mutantes resistentes a nenhum destes antibióticos para o

isolado 629, o que dificultou uma avaliação específica do mesmo de forma isolada em relação ao 344.

Com estes resultados, optou-se por focar a análise ao redor do isolado 344, aplicando um tratamento combinado dos dois endofíticos, com dupla finalidade: (i) verificar se a colonização combinada dos dois nas mudas era mais ou menos favorável ao crescimento das mesmas do que em relação ao 344 somente, e (ii) testar se haveria alguma alteração no padrão de colonização do 344 quando inoculado em conjunto com 629. Este tratamento dos dois isolados associados foi seguido em todos os experimentos de colonização realizados neste estudo. Considerando que foi utilizado meio contendo antibiótico para a análise de plaqueamento pós-inoculação, compreendeu-se que o entendimento dos efeitos específicos do isolado 629 foi prejudicado com a não inoculação do mesmo de forma separada.

Cabe salientar que os resultados de testes de antagonismo *in vitro* para estes dois isolados foram negativos, o que permitiu considerá-los compatíveis entre si (dados não mostrados). É reconhecido que a aplicação de mistura de diferentes isolados compatíveis entre si consiste numa estratégia importante tanto na promoção de crescimento como em ações de biocontrole (DE MELLO et al, 2002).

Em estudos de isolamento e caracterização de bactérias endofíticas, Zinniel et al (2002) relatam ter trabalhado com 17 linhagens selvagens e 14 mutantes resistentes a antibióticos, conseguindo demonstrar a persistência bacteriana em níveis médios de 3,4 e 6,1 log₁₀ UFC/g (peso fresco), 78 dias após as inoculações; neste estudo foram utilizados mutantes resistentes aos antibióticos rifampicina, kanamicina e tetraciclina. Os autores expõem que os níveis de colonização dos mutantes foram em média similares àqueles obtidos para os tipos selvagens. Entretanto, em alguns dos experimentos foi verificada média significativamente menor. Outros autores mencionam não haver encontrado diferenças significativas comparando a habilidade de colonização de linhagens mutantes com a dos seus respectivos tipos selvagens (KOBAYASHI & PALUMBO, 2000; FROMMEL et al, 1993). Apesar do conhecimento de que variações indeterminadas poderiam ser encontradas ao comparar-se inoculações do isolado selvagem e seus mutantes separadamente, optou-se neste estudo pelo trabalho

de inoculação com um dos mutantes, dadas as vantagens antevistas para este método no tocante à recuperação dos isolados inoculados em meio seletivo contendo antibiótico.

4.4. Estudo da metodologia para inoculação de endofíticos em mudas de cacau

Os experimentos de inoculação dos isolados endofíticos 344-1.1 e 629 em sementes de cacau tiveram como objetivos estudar os padrões de colonização dos mesmos *in planta*, bem como validar o seu efeito como promotores de crescimento vegetativo em mudas de cacau, em casa-de-vegetação. Para isso, foi necessário estabelecer a metodologia a ser empregada, analisando-se diferentes formas de inoculação, tempo de recuperação dos isolados inoculados, forma de avaliação da colonização, e concentrações adequadas de bactérias para a inoculação.

Uma análise preliminar das características físico-químicas do solo utilizado nos três experimentos foi realizada, com o intuito de prover uma referência entre os experimentos, bem como para estudar comparativamente o solo utilizado com as condições usuais de fertilidade encontrada em lavouras de cacau (Tabela 6).

Tabela 6: Análise físico-química do solo utilizado nos experimentos de colonização.

H ₂ O (pH)	Análise Química											Análise Física ¹			
	Al	Ca	Mg	K	N C		P	Fe	Zn	Cu	Mn	Ar. G	Ar. F.	Silte	Argila
	(cmol _c /dm ³)				(g/dm ³)		(g/dm ³)					(g/kg)			
5,5	0	6,2	1,6	0,14	0,36	7,3	48	35	6	5	102	618	126	171	85

¹ Ar. G = Areia Grossa; Ar. F = Areia Fina

As análises revelaram um solo de textura leve arenosa, com teores adequados ao cultivo de cacau, tanto em relação aos macronutrientes (N, K, Mg, Ca, P) como aos micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu). Apenas magnésio e potássio estão discretamente abaixo do recomendado por Chepote et al (2007), mas que se considerou como não relevante para os estudos dos endofíticos. Importante observar que alumínio não foi detectado (Tabela 6). Por outro lado, os níveis de

nitrogênio e carbono podem ser considerados altos, indicando alto teor de matéria orgânica. Sendo a fertilidade do solo uma característica desejável ao cultivo do cacau (GRAMACHO et al, 1992), tais condições de solo foram consideradas satisfatórias para nossos estudos, visto que, não somente forneceram ambiente semelhante ao encontrado em situações práticas, mas também criaram condições apropriadas para a presença de microrganismos competidores, importantes para uma análise mais realística do potencial de promoção de crescimento dos isolados sob estudo.

4.4.1. Experimento de Inoculação I

Os resultados de quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir do plaqueamento dos extratos da raiz, caule e folhas, obtidos 16 e 36 dias após a inoculação, aparecem na Tabela 7. Foram consideradas apenas as colônias de morfologia semelhante à dos endofíticos inoculados nos respectivos tratamentos, sendo, portanto, desconsideradas as contaminações fúngicas, presentes principalmente nas placas das mudas controle (não mostrado).

Tabela 7: Unidades formadoras de colônias (UFC)¹ recuperadas a partir dos extratos da raiz, caule e folhas das mudas referentes aos tratamentos 344-1.1 e 344-1.1+629, aos 16 e 36 dias após a inoculação.

dias / tratam.	Órgãos da plântula						
	raiz		caule		folhas		
16 dias			(CV) ²		(CV)		(CV)
C	0			0		0	
344-1.1	10 ± 7,9	79,0		2,2 ± 3,0	137,9	1,0 ± 2,2	223,6
344-1.1+629	4,8 ± 4,1	85,4		0,4 ± 0,9	223,6	0	
36 dias							
C	0			0		0	
344-1.1	11,6 ± 6,8	58,6		5,4 ± 4,0	73,6	4,0 ± 2,5	62,5
344-1.1+629	10,2 ± 4,7	46,1		2,6 ± 3,3	126,9	1,8 ± 1,3	72,4

¹ média ± desvio-padrão

² Coeficiente de variação (em %)

Aos 16 e 36 dias pós-inoculação dos tratamentos, foi encontrada presença de colônias morfológicamente semelhantes às dos isolados inoculados em todas as placas correspondentes a raízes, caules e folhas dos tratamentos 344-1.1 e 344-1.1+629, mas apenas para aqueles plaqueados em meio TSA (Tabela 7). Estes resultados sugerem que os endofíticos atingiram toda a plântula com 15 dias de colonização, pois os mesmos foram recuperados de todos os órgãos. Entretanto, a não recuperação do mutante 344-1.1 em nenhum dos plaqueamentos em meio TSA+Rifampicina, antes que as mesmas fossem tomadas por contaminantes fúngicos (dados não mostrados) impediram a confirmação deste fato. Não foram observadas colônias morfológicamente semelhantes às dos isolados 344 e 629 nas placas que corresponderam ao plaqueamento dos extratos das mudas controle.

Em geral, uma maior quantidade de UFC pôde ser contada nas placas com meio TSA correspondentes aos extratos das raízes, o que poderia sugerir uma maior concentração dos endofíticos nesse órgão. Esse resultado corrobora informações disponíveis na literatura, que caracterizam a população bacteriana das raízes como freqüentemente maior que os níveis encontrados nos caules e folhas (LAMB et al, 1996; MCINROY & KLOPPER, 1995; LODEWYCKX et al, 2002). Seguindo a tendência observada anteriormente (Tabela 3), essa maior quantidade de UFC em raízes correspondeu também a menores CV (Tabela 7). Foram também obtidas colônias, tanto semelhantes quanto diferentes aos endofíticos inoculados, em alguns caules e folhas, entretanto, em menor quantidade. Pela metodologia utilizada, não se observou nenhuma colônia bacteriana em nenhuma das placas contendo meio TSA+Rifampicina (100 mg/ml), não sendo possível recuperar os mutantes inoculados através do plaqueamento dos extratos das raízes, caules e folhas nesse meio. Esse resultado, também obtido no terceiro experimento de inoculação (seção 4.5.1), pode ser atribuído a uma perda da viabilidade ou da capacidade de resistência ao antibiótico após a introdução do mutante na planta, uma preocupação freqüente no trabalho com mutantes (KIM et al, 1997), devido a modificações relacionadas à sua necessidade de adaptação ao organismo do hospedeiro. Com esses resultados, mais testes relacionados à estabilidade (manutenção) da resistência ao antibiótico no mutante *in planta* são necessários. Além disso, esses resultados indicam a necessidade de se testar os

isolados selvagens 344 e 629, tanto combinados quanto isoladamente, buscando esclarecer essas questões.

Considerando (i) a inesperada impossibilidade de obter colônias do isolado 344-1.1 aplicado nos dois tratamentos de inoculação com endofíticos através do plaqueamento dos extratos em meio TSA+Rifampicina (100 mg/ml), (ii) a grande variabilidade existente entre nº de colônias e densidade ótica verificada (Tabela 1), e (iii) que 36 dias pareceram suficientes para recuperar endofíticos colonizadores das plantas, optou-se por descartar essa forma de análise com base nos extratos. Assim, foi testada outra metodologia para avaliar a recuperação dos endofíticos inoculados, isto é, o plaqueamento direto de segmentos de raízes, caules e folhas, sem aplicar o procedimento de obtenção de extratos (Metodologia, seção 3.4). Com este plaqueamento de segmentos, contudo, a colonização foi avaliada apenas em termos qualitativos, ou seja, em relação à presença ou ausência de colônias bacterianas de morfologia semelhante à dos endofíticos inoculados.

O aspecto geral do crescimento bacteriano a partir dos diversos órgãos das mudas aparece na Figura 5. Quando contaminações foram detectadas, elas eram de natureza fúngica, principalmente de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, e ocorreram principalmente nas placas correspondentes às mudas controle.

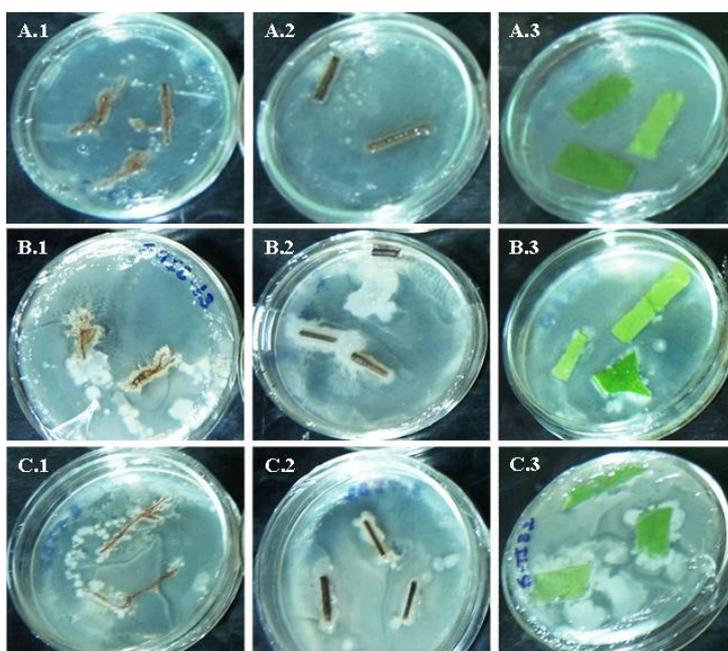


Figura 5: Plaqueamento de raízes (1), caules (2) e folhas (3) das mudas do Experimento de Inoculação I, comparando-se endofíticos recuperados de mudas dos tratamentos 'controle' (A), '344-1.1' (B) e '344-1.1 +629' (C), em meio TSA, 36 dias após a inoculação.

Conforme pode ser observado na Figura 5, colônias com morfologia semelhante ao isolado 344 aparecem em ambos os tratamentos com endofíticos (Figura 5, B e C), enquanto que semelhantes ao isolado 629 somente no tratamento em que o mesmo foi aplicado (C).

Este método de análise permitiu identificar os endofíticos inoculados pelo plaqueamento de raiz, caule e folhas também em meio TSA+Rifampicina (dados não mostrados). Contudo, os resultados obtidos foram pouco conclusivos. Nas placas correspondentes aos tratamentos de endofíticos, as colônias morfologicamente semelhantes às dos mutantes inoculados cresceram mais tardiamente, 72 h ou mais após o plaqueamento, sugerindo uma possível alteração em sua fisiologia pós-colonização, seja pela mutação em si ou por efeitos adversos das interações ocorridas no interior da planta; não foi possível discernir se o crescimento mais demorado foi devido a uma menor quantidade inicial de células recuperadas da planta ou se devido a uma taxa de crescimento mais lenta. Além disso, as contaminações fúngicas, nesse período, dificultaram a visualização e o reisolamento dessas colônias. Entretanto, em todas as placas com meio TSA+Rifampicina (100 mg/ml) correspondentes aos controles cresceram apenas contaminações fúngicas, não sendo visualizadas colônias bacterianas que fossem semelhantes aos endofíticos sob estudo, nem de outras espécies.

As dificuldades encontradas neste primeiro experimento no tocante às contaminações fúngicas em ambos os meios de cultura (TSA e TSA+Rifampicina) e à inconsistência de resultados para plaqueamento de extratos dos órgãos das mudas, impossibilitaram uma avaliação adequada da colonização dos endofíticos. Esses resultados sugerem a necessidade de repetições desse experimento, utilizando-se compostos antifúngicos no meio TSA que dificultem a proliferação dessa categoria de endofíticos.

Até este momento, suspeitou-se de que a inoculação por pipetagem poderia não ter provido condições adequadas para a colonização. Além disso, a experiência nesse primeiro experimento indicou tratar-se de um método de inoculação laborioso. Considerando a existência de outros métodos de inoculação descritos na literatura que se mostraram eficientes em outros sistemas (MARIANO

et al, 2000; BRINGEL et al, 2001; SILVEIRA et al, 2004), realizou-se um segundo experimento onde os mesmos foram testados em comparação com pipetagem.

4.4.2. Experimento de Inoculação II

Neste experimento, além da inoculação por pipetagem, testaram-se a imersão de sementes (Silveira et al, 2004) e a aplicação direta da suspensão no solo (Bringel et al, 2001) como outros métodos de inoculação. Contudo, apesar da seleção das sementes pré-germinadas anterior à inoculação, diversas mudas não se desenvolveram neste segundo experimento de colonização. Aos 30 dias após as inoculações por pipetagem (P) e imersão (I), correspondendo à 10 dias após a rega no solo (S) dos vasos, as perdas de plantas verificadas foram desuniformes entre os tratamentos, sendo mais intensas para o tratamento I, intermediárias para P e menores para S (Figura 6). Não foi estabelecida com certeza a causa destas perdas nessa forma e condições; dentre algumas possíveis especulações, foram considerados problemas com a rega (qualidade da água fornecida no período), com a dureza do solo, ou mesmo a contaminação prévia das sementes com algum patógeno. A perda de mudas não foi correlacionada aos tratamentos com endofíticos, visto que diversas sementes não inoculadas (controle) também não se desenvolveram.



Figura 6: Aspecto geral do segundo experimento de colonização, evidenciando perda desuniforme de mudas que não se desenvolveram entre os tratamentos. Mudanças inoculadas por imersão (A), por pipetagem (B) e por rega no solo (C).

Essa condição prejudicou o desenho experimental e as possibilidades de análises estatísticas do experimento para outros parâmetros avaliados (seções 4.6 e 4.7), pois devido à quantidade de mudas desenvolvidas em cada um dos três métodos não ter sido uniforme, não se obteve número adequado de repetições para todos os tratamentos. Na medida do possível, foram realizados os procedimentos de análise da colonização através do plaqueamento de segmentos em separado das raízes, caule e folhas aos 15 e aos 30 dias após as inoculações. Esses procedimentos permitiram identificar os endofíticos inoculados em alguns dos tratamentos (dados não mostrados). Novamente, observou-se que o crescimento do mutante 344-1.1 nas placas contendo meio TSA+Rifampicina ocorria mais tardiamente em relação ao crescimento do 629, geralmente após 48 h e em alguns casos após 72 h. O crescimento de contaminações fúngicas (provavelmente endofíticos) ocorreu paralelamente nesse período, novamente dificultando as análises. Na Figura 7, aparecem exemplos do aspecto das colônias recuperadas após o plaqueamento em alguns dos tratamentos, evidenciando a recuperação dos respectivos endofíticos inoculados.

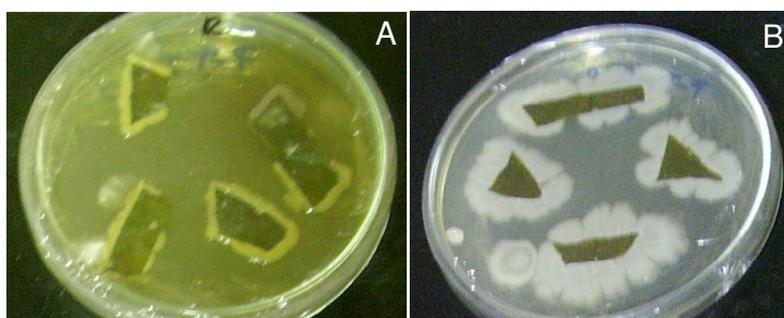


Figura 7: Morfologia de colônias dos endofíticos recuperadas após plaqueamento de folhas aos 15 dias pós-inoculação por pipetagem. (A) meio TSA+Rifampicina, tratamento '344-1.1', evidenciando morfologia característica de bactérias do gênero *Enterobacter* (isolado 344); (B) meio TSA, tratamento '344-1.1+629', evidenciando morfologia característica de bactérias do gênero *Bacillus* (isolado 629)(ver seção 4.9).

Os resultados de plaqueamento indicaram ser possível recuperar os endofíticos após 15 dias de inoculação, considerando-se praticamente todos os

três métodos de inoculação testados. Desse modo, entendeu-se não ser justificada a utilização do método de inoculação por pipetagem. Além disso, a recuperação dos isolados a partir de folhas sugere que nesse período de incubação, da mesma forma que no primeiro experimento, os respectivos endofíticos já foram capazes de colonizar praticamente toda a muda. Aparentemente, quando incubados em conjunto, o isolado 629 apresentou uma maior colonização em relação ao 344 (Figura 7), pois sempre foi detectado de forma predominante no meio TSA sem antibiótico (dados não mostrados). É reconhecido que diferentes isolados podem apresentar comportamento distinto, especialmente considerando as interações *in planta*, que permitem melhores condições de adaptabilidade a determinadas linhagens. Kim et al (1997), por exemplo, obteve diferenças entre os níveis de colonização comparando a dinâmica de uma linhagem de *Bacillus* (L324-92R₁₂) à uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens* (2-79RN₁₀), sendo a população recuperada do *Bacillus* aproximadamente 3 log UFC menores que a de *P. fluorescens* num primeiro momento; entretanto, os níveis do primeiro aumentaram ao longo das avaliações, enquanto os níveis deste último decaíram.

Devido ao fato dos dados coletados para este experimento não haverem provido informações suficientes para os parâmetros inicialmente planejados (seções 4.6 e 4.7), foi obviamente necessário estabelecer outro experimento de inoculação que permitisse a realização de todas as medições e análises estatísticas correspondentes, bem como confirmação das tendências observadas até aqui.

4.4.3. Experimento de Inoculação III

Para este terceiro experimento, foi possível a realização de todas as análises anteriormente planejadas, permitindo os estudos apresentados nas próximas seções.

Em relação à recuperação pós-colonização dos endofíticos inoculados, algumas fotografias foram selecionadas a fim de permitir a visualização dos resultados do plaqueamento de segmentos superficialmente desinfestados das

raízes, caules e folhas das mudas, em diferentes datas após a inoculação. Foram selecionadas fotos de mudas do método de inoculação por rega no solo (S), devido a este ter fornecido um quadro mais completo de endofíticos recuperados (Figura 8), apesar do problema das contaminações fúngicas. Contudo, o padrão de recuperação dos endofíticos entre os diferentes métodos de inoculação foi semelhante (dados não mostrados).

Pôde-se observar que não foram isoladas colônias endofíticas bacterianas a partir dos segmentos desinfestados dos órgãos das mudas controles, o que se sucedeu na maioria das placas referentes a essas mudas (Figura 8A), sendo que ocorrências de endofíticos fúngicos só vieram a ser percebidas para observações após 48 h de plaqueamento e cultivo. Para as mudas do tratamento 344-1.1 foi obtida a recuperação deste isolado em aproximadamente 60% das placas observadas. Um crescimento delimitado com contornos definidos de colônias bacterianas endofíticas pôde ser observado circundando os segmentos dos órgãos plaqueados. A coloração ligeiramente amarelada, característica deste isolado, pôde ser percebida, principalmente em torno das secções das folhas (Figura 8B.3).

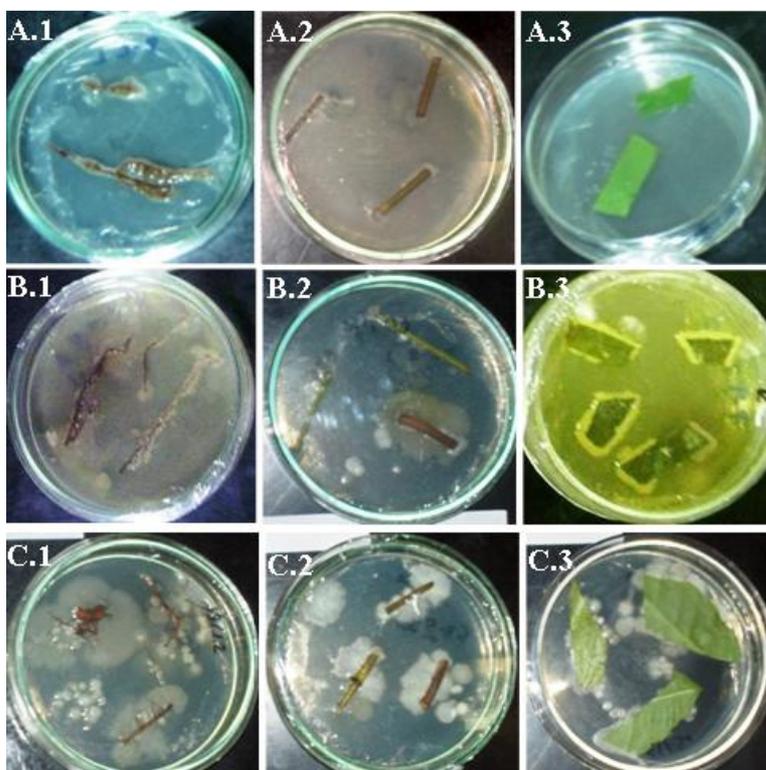


Figura 8: Morfologia de colônias dos endofíticos recuperadas após plaqueamento de órgãos aos 36 dias pós-inoculação por rega no solo (S), em meio TSA. Os órgãos raiz, caule e folhas foram designados por 1, 2 e 3, respectivamente. Mudas controle (A). Tratamento '344-1.1', evidenciando morfologia característica de bactérias do gênero *Enterobacter* (B). Tratamento '344-1.1 + 629', evidenciando morfologia típica de bactérias do gênero *Bacillus* como forma mais predominante, e *Enterobacter* em menor quantidade (C).

As mudas inoculadas com a associação 344-1.1+629 confirmaram as tendências indicadas no experimento anterior, nas quais o isolado 629 apresentou uma maior predominância de recuperação em relação ao 344. Isto pode sugerir que o isolado 629 seja melhor colonizador do que o mutante, permitindo que sejam suas colônias sejam mais facilmente obtidas; ou, alternativamente, pode apenas decorrer do fato do mutante 344-1.1 apresentar crescimento mais lento que o 629. Tais afirmações, contudo, necessitam do estabelecimento de uma forma consistente para se quantificar essa recuperação de ambos os isolados e, assim, confirmar ou não a maior eficiência de colonização do 629. Além disso, reforçam a necessidade de testes utilizando o isolado 344 tipo selvagem.

De acordo com Sturz et al (1999), as limitações inerentes a estudos populacionais bacterianos usando métodos de contagem de UFC em placas e procedimentos de amostragem associados, conferem resultados que podem ser considerados como apenas uma estimativa de avaliação da atividade e complexidade totais de populações microbianas, permitindo somente descrições relativas das populações endofíticas sob estudo. Outros métodos de quantificação de UFC após a inoculação dos endofíticos (ZINNIEL et al, 2002; BRINGEL et al, 2001; MARIANO et al, 2000; DONG et al, 1994; FROMMEL et al, 1991) têm sido estudados, sendo que testes dos mesmos serão realizados por nossa equipe de pesquisa em experimentos futuros.

4.5. Padrões de colonização endofítica dos isolados 344 e 629

A capacidade de colonizar sistemicamente a planta é uma das características dos endofíticos (LODEWYCKX et al, 2002; HALLMAN et al, 1997). No presente trabalho buscou-se estudar os padrões de distribuição espacial e temporal dos endofíticos inoculados, através da recuperação por plaqueamento de amostras de raízes, caule e folhas seccionadas, após desinfestação superficial. Foi realizada a comparação desses padrões temporais e espaciais de recuperação dos endofíticos inoculados nos diferentes métodos de inoculação em relação aos tratamentos de endofíticos testados.

4.5.1. Recuperação de colônias bacterianas inoculadas a partir de raiz, caule e folha das mudas de cacau.

Com o intuito de verificar o tempo mínimo necessário para os endofíticos colonizarem as mudas de cacau internamente, foram verificados os tempos de recuperação (em dias) dos endofíticos aplicados nos experimentos de inoculação I, II e III, a partir dos respectivos órgãos principais. Os resultados obtidos mostraram que ambos os isolados foram identificados em plaqueamentos de todos os 3 órgãos testados, a partir de 15 a 20 dias pós-inoculação, indicando a colonização integral das mudas nesse período, independentemente da forma de inoculação e da concentração de UFC das suspensões utilizadas para a inoculação. Tais resultados claramente ratificam a distribuição sistêmica dos isolados (HALMANN et al, 1997), de modo que, uma vez inoculados nas sementes ou no solo, os endofíticos penetram na plântula e distribuem-se internamente por todos os órgãos. Também ficou comprovado ao longo do trabalho que, ao menos quanto aos isolados 344-1.1 e 629, o método de inoculação utilizado é indiferente em relação à eficiência de penetração e colonização. É interessante ressaltar que, apesar dos problemas inesperados terem dificultado algumas análises, os tempos de recuperação de ambos os endofíticos foram essencialmente os mesmos em todos os três experimentos de inoculação. Kim et al (1997) obtiveram a recuperação dos isolados 5 dias após o plantio de sementes de trigo inoculadas com bactérias endofíticas, havendo ainda encontrado a presença das mesmas transcorridos 6 meses do plantio, relatando a recuperação a partir de raízes e brotos. Van Loon et al (1998) relatam a recuperação de endofíticos inoculados a partir de raízes superficialmente desinfestadas, sendo que, contudo, nenhuma das linhagens foi obtida a partir das folhas; após a injeção dos cotilédones de sementes de pepino, as bactérias *Pseudomonas putida* (89B-27) e *Serratia marcescens* (90-166) foram capazes de multiplicar-se nos tecidos, mas não foram recuperadas dos caules aos níveis de 1 ou 2 cm acima ou abaixo dos cotilédones.

Conforme discutido anteriormente (seção 4.4.1), uma quantificação numérica mais precisa dessa colonização foi impossibilitada pelo método de plaqueamento dos extratos dos órgãos sob estudo. Uma vez que os endofíticos cresciam ao redor das amostras plaqueadas, sem ter sido possível uma referência volumétrica

ou de área, o plaqueamento direto de segmentos de raízes, caule e folha possibilitou apenas uma avaliação qualitativa (presença ou ausência). Esta forma de avaliação qualitativa permitiu inferir o perfil temporal e espacial de distribuição somente de modo indireto.

A presença dos isolados inoculados em todos os órgãos permitiu-nos verificar a existência de uma habilidade de rápida colonização para ambos os isolados testados. Possivelmente, habilidades como a rapidez em atingir a colonização sistêmica e a capacidade de ampla reprodução no interior da plântula possam estar relacionadas aos efeitos de promoção do crescimento. Ambos os gêneros dos isolados estudados, *Enterobacter* e *Bacillus* (detalhamento taxonômico na seção 4.9), têm sido relatados dentre gêneros bacterianos conhecidos como endofíticos relacionados a efeitos benéficos às plantas hospedeiras, tais como o de promoção de crescimento vegetal (OLIVEIRA et al, 2003). A capacidade de colonização destas espécies e seus efeitos *in planta*, contudo, dependem de diversos fatores, sendo o principal deles a interação adaptativa entre os genótipos do vegetal e do microrganismo (DONG et al, 1995).

4.5.2. Análise de PCR de colônias recuperadas pós-inoculação

A identificação molecular dos isolados inoculados tem dois propósitos: primeiro, confirmar de forma inequívoca as evidências morfológicas (plaqueamento e inspeção visual de colônias) quanto à recuperação dos mesmos a partir dos órgãos das mudas sob tratamento; segundo, fornecer uma alternativa para quantificação da colonização, a partir de técnicas sensíveis como PCR quantitativo em tempo real (NOVAIS et al, 2004).

No primeiro conjunto de experimentos, foram desenhados *primers* gene-específicos para serem utilizados em reações de PCR, baseados em seqüências de outros isolados pertencentes aos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus* obtidas pelo grupo de pesquisa (SILVA, 2007; J.T. de Souza, não publicado). Foram utilizadas seqüências dos genes *hsp-60* (*heat shock protein* 60 kDa, presente no gênero *Enterobacter*) e *spoA* (gene de esporulação em *Bacillus* spp). O gene *hsp-60* tem sido utilizado principalmente em estudos relacionados à identificação microbiana

de diferentes espécies, dada à sua existência ubíqua e às regiões de seqüência altamente conservadas (GOH et al, 1996); enquanto o gene *spoA* foi descrito como um dos genes envolvidos no processo de esporulação microbiana, uma característica presente em microrganismos do gênero *Bacillus* (BAI et al, 1990). Entretanto, após diversos testes sob diferentes condições de concentração de reagentes, temperatura de anelamento, ciclagem e amplificação, o padrão de bandeamento obtido não correspondeu ao esperado (dados não mostrados), mostrando-se inconsistente entre os experimentos realizados, sugerindo que, aparentemente, os *primers* desenhados não foram adequados à finalidade proposta. Alguns testes finais serão realizados antes de se decidir por descartá-los dos trabalhos. No segundo conjunto de experimentos, foi testado o uso de *primers* RAPD que pudessem fornecer padrões de bandeamento semelhantes para os isolados antes da inoculação e após a sua recuperação, mantendo um padrão reprodutível em mais de uma série de análises. Tais experimentos encontram-se em andamento e serão concluídos em futuro próximo.

Alternativas de identificação dos isolados endofíticos recuperados pós-inoculação em organismos vegetais têm sido estudadas. Além do trabalho com mutantes resistentes a antibióticos, outras possibilidades são descritas. Frommel et al (1991), por exemplo, relatam a utilização de microscopia eletrônica em seus trabalhos de inoculação de uma espécie não-fluorescente de *Pseudomonas* em batata, mesmo recurso utilizado por Dong et al (1994) em seu trabalho com endofíticos fixadores de N₂ em cana. Esse método, no entanto, é criticado por Fisher et al (1992) devido à impossibilidade de diferenciação entre células vivas e mortas. Outra técnica mais recentemente descrita é o uso do CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*), que combina vários marcadores fluorescentes para visualizar e monitorar populações bacterianas na rizosfera (Bloemberg e Lugtenberg, 2001). De acordo com Lacava et al (2006), técnicas de biologia molecular têm sido empregadas a fim de melhorar a caracterização e análise de comunidades endofíticas em seu habitat, independentemente da possibilidade de as espécies serem cultiváveis ou não. Esses autores empregaram a análise do gene 16S rDNA em associação à técnica do gradiente desnaturante em gel de eletroforese para caracterização da comunidade bacteriana endofítica em citros, não havendo menção ao reisolamento de microrganismos inoculados. Em seu

trabalho de tese de doutorado, Torres (2005) utilizou dois isolados transformados com pPAGfp, um plasmídeo contendo um gene de resistência ao antibiótico ampicilina e o gene *gfp* codificador de uma proteína verde fluorescente. Os isolados foram inoculados em vinca (*Catharantus roseus*), e o reisolamento foi feito através da técnica ARDRA, mostrando que os isolados expressando o gene fluorescente haviam colonizado as raízes e os caules das plantas inoculadas.

4.6. Efeitos da colonização endofítica nas taxas fotossintéticas e trocas gasosas

Avaliações do comportamento fisiológico de plantas inoculadas com microrganismos endofíticos têm em vista a verificação de mudanças fisiológicas associadas à colonização, especialmente em mudas tratadas com endofíticos com potencial de biocontrole, visando comprovar alterações metabólicas e/ou fisiológicas, comparando-as às alterações relacionadas a infecções provocadas por patógenos (ZHANG et al, 1996). Além disso, para que os efeitos da interação endofítico-planta sejam benéficos do ponto de vista de promoção de crescimento, as alterações eventualmente provocadas não devem causar estresse, ou devem induzir melhores desempenhos fisiológicos que redundem em acúmulo maior de matéria-seca.

Buscando verificar potenciais alterações fisiológicas nas mudas inoculadas com os endofíticos sob estudo, foram avaliadas as taxas fotossintéticas apresentadas pelas mudas do terceiro experimento de inoculação. As principais variáveis analisadas foram fotossíntese (A) e condutância estomática (gs) obtidas nos dias correspondentes a três das avaliações realizadas. Dentre os parâmetros medidos, uma análise preliminar indicou que os melhores para a análise estatística foram a relação entre fotossíntese e condutância estomática (A/gs), e entre concentração interna e atmosférica de CO_2 (C_i/C_a). Apesar de medidos, outros parâmetros fisiológicos vinculados à avaliação da fotossíntese e trocas gasosas foliares (seção 3.7) não foram analisados, devido ao fato de sofrerem influência das variações climáticas que ocorrem entre datas diferentes de medição (F.P. Gomes, comunicação pessoal). Desse modo, dificulta-se a

obtenção de médias com significado biológico para tais parâmetros. Os valores médios das medidas de 'A' e 'gs' para os três dias avaliados são apresentadas nas Figuras 9 e 10. Importante ressaltar que foram apresentados apenas os resultados para aquelas avaliações em que os valores diferiram significativamente entre si (Tukey a 5%).

É possível observar que os valores de 'A' em todos os tratamentos de inoculação, e em todas as medições, variaram entre 2 e 5 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figuras 9 e 10), o que sugere pouco efeito dos endofíticos nas taxas fotossintéticas. Observaram-se diferenças significativas para os tratamentos de endofíticos entre si e em relação ao controle, porém não se identificou nenhum padrão específico ou consistente em favor deste ou daquele endofítico, ou das concentrações. Isso sugere que, ao longo do período de colonização das mudas, ocorrem alterações fisiológicas detectáveis causadas pelos endofíticos; por exemplo, aos 75 dias, as mudas inoculadas com 344-1.1 tenderam a aumentar ligeiramente a fotossíntese em relação ao controle, ao passo que nas inoculadas com 344-1.1 e o 629 associadamente, a fotossíntese diminuiu (Figura 9). Por outro lado, aos 90 dias, o efeito foi ligeiramente invertido (Figura 10). Comportamento fotossintético satisfatório em plantas tratadas com bactérias endofíticas para controle de fusariose foi também encontrado em pimenta-do-reino, apesar de não terem sido obtidas diferenças significativas entre as plantas inoculadas e as controle (BENCHIMOL et al, 2000).

De modo distinto às taxas fotossintéticas, os valores de condutância estomática demonstraram uma queda de aproximadamente 10 vezes nos valores médios após 75 dias, considerando-se os tratamentos em conjunto. Aos 40 dias, os valores de 'gs' caíram da faixa entre 0,25 e 0,45 moles $\text{H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 10) para valores entre 0,02 a 0,04 moles $\text{H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ aos 75 e 90 dias (Figuras 9 e 10). Como esses valores incluem os tratamentos controle, esses resultados sugerem que a redução na condutância estomática após 40 dias provavelmente se deve a efeitos de estresse causados pela relação entre o tamanho das mudas e o volume de solo disponível – as mudas tornam-se estritamente dependentes das regas para absorção da umidade necessária à sua manutenção; desse modo, tende a haver redução no período em que os níveis de água permanecem satisfatórios à uma adequada condutância estomática, aumentando a chance das

medições ocorrerem em períodos de fechamento mais acentuado de estômatos. Interessante observar que até os 75 dias inclusive, independentemente da queda geral nos valores médios para *gs*, a presença do isolado 629 junto ao 344-1.1 causou diminuição significativa ($P < 0,05$) na condutância estomática, efeito este que desapareceu ou inverteu-se aos 90 dias (Figuras 9 e 10). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem a existência de alterações na fisiologia das mudas inoculadas pelo 344 e 629, em momentos diferentes do período de colonização. Tais alterações podem estar relacionadas à promoção de crescimento ou tolerância ao déficit hídrico (ver seção 4.8).

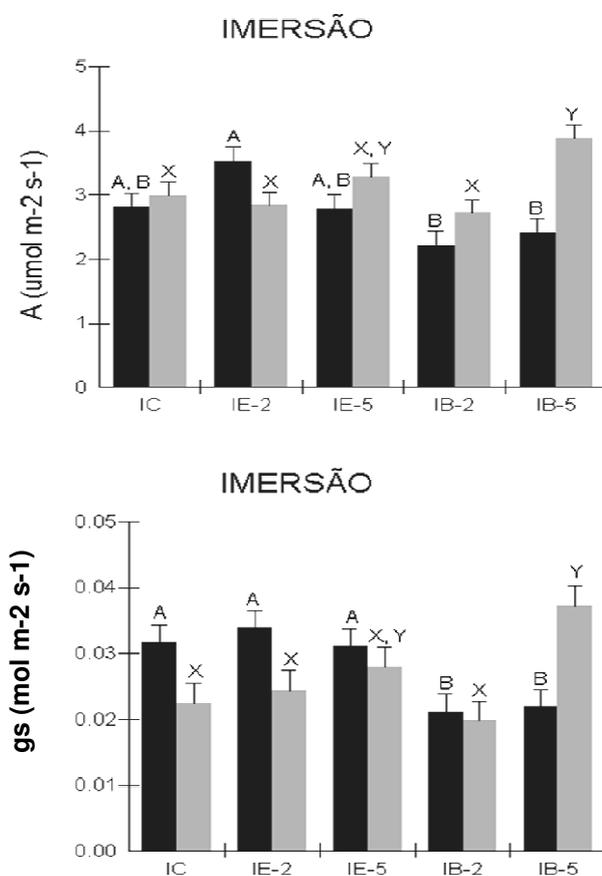


Figura 9: Avaliação de fotossíntese (A) e condutância estomática (*gs*) para os tratamentos endofíticos inoculados pelo método de imersão (I) de sementes em suspensões bacterianas. As médias e erros padrões correspondem a 6 repetições por tratamento. Os dados referem-se às medições feitas aos 75 dias (em preto) e 90 dias (em cinza) para ambos os parâmetros. Mudas controle (IC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (IE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (IE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (IB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (IB-5). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey a 5%).

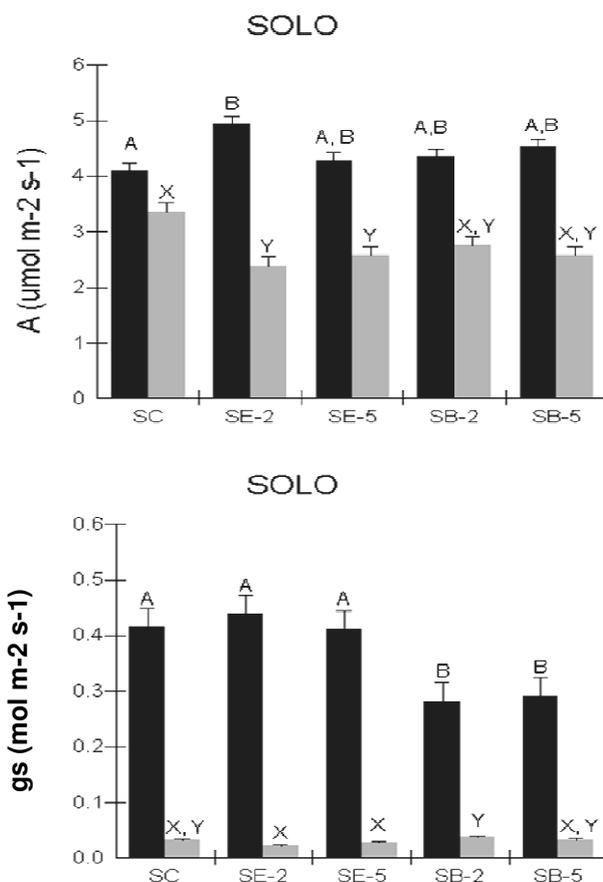


Figura 10: Avaliação de fotossíntese (A) e condutância estomática (*gs*) para os tratamentos endofíticos inoculados pelo método de aplicação das suspensões bacterianas por rega no solo (S). As médias e erros padrões correspondem a 6 repetições por tratamento. Os dados referem-se às medições feitas aos 40 dias para A e *gs* (em preto), e aos 90 dias para A e 75 dias para *gs* (em cinza). Mudanças controle (SC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (SE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (SE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (SB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (SB-5). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey a 5%).

4.7. Efeitos da colonização endofítica na produção de biomassa das mudas

Evidências fenotípicas do eventual efeito positivo dos endofíticos na promoção de crescimento vegetativo de mudas de cacau deveriam ser observadas ao se analisar parâmetros relacionados à produção de biomassa ao longo e ao final dos experimentos de inoculação. Experimentos preliminares com os isolados 344 e 629 haviam sugerido potencial de utilização na promoção de

crescimento vegetativo em cacau (J.T de Souza & A.W.V. Pomella, não publicado). Assim, com o objetivo de confirmar esses resultados, analisando mais aprofundadamente esses efeitos da colonização endofítica nas mudas, avaliou-se a promoção de crescimento pós-inoculação dos endofíticos, utilizando-se como principais critérios as medidas de altura da haste, o número de folhas e as biomassas úmidas e secas, sendo estas ao final dos experimentos de inoculação (MARIANO et al, 2000). A seguir, descrevem-se os resultados obtidos para as medições em cada experimento.

4.7.1 Experimento de Inoculação I

Buscando-se avaliar o progresso do crescimento das mudas inoculadas em relação às controle, a altura da haste das plantas e a matéria fresca foram avaliados nos mesmos dias em que houve coleta de material para extrato e plaqueamento, isto é, aos 16, 36, 50 e 86 dias após a inoculação. Conforme mostrado na Tabela 8, o crescimento das mudas em todos os tratamentos foi de mesma magnitude. Apesar de um ligeiro incremento médio maior para os tratamentos com endofíticos, os resultados de análise de variância indicaram que tais diferenças não são significativas ($P_{16\text{dias}} = 0,28$; $P_{36\text{dias}} = 0,093$; $P_{50\text{dias}} = 0,156$ e $P_{86\text{dias}} = 0,138$).

Tabela 8: Altura das hastes (em cm)¹ de mudas de cacau no experimento de inoculação I.

Tratamentos	Dias pós-inoculação							
	16	(C.V.) ²	36	(C.V.)	50	(C.V.)	86	(C.V.)
ctrl	14,88 ^a	8,2	17,96 ^b	10,1	19,44 ^c	12,4	23,77 ^d	14,1
344-1.1	14,95 ^a	16,5	18,82 ^b	9,5	20,48 ^c	11,4	25,8 ^d	15,9
344-1.1 + 629	15,53 ^a	7,5	18,88 ^b	6,9	26,5 ^c	8,9	25,95 ^d	15,2

¹ Dados referentes a médias de 30 repetições aos 16 e aos 36 dias, e de 20 repetições aos 50 e aos 86 dias.

² Coeficiente de variação (em %).

³ Letras iguais, numa mesma data, indicam ausência de diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5%).

Antes do plaqueamento, as raízes, caules e folhas foram pesados com o objetivo de ser verificado se havia a promoção de aumento de biomatéria fresca (em g) numa análise dos órgãos separadamente. Estes resultados, aos 16, 36 e aos 50 dias após a inoculação, indicaram que não houve diferença significativa para as médias de biomassa fresca para nenhum dos três órgãos, em nenhuma das datas em que foram realizadas as pesagens, para nenhum dos tratamentos. Tais resultados confirmam aqueles obtidos para altura da haste. Inferiu-se, portanto, que a avaliação de matéria seca ao final do experimento não seria necessária, visto que as análises anteriores não apresentaram diferença significativa, motivo pelo qual a mesma não foi realizada para as mudas deste experimento.

Apesar de esses resultados indicarem ausência de efeito na promoção de crescimento, é preciso salientar que apenas uma única concentração inicial de inóculo foi utilizada ($\sim 10^7$ UFC/ml), a qual foi aplicada nas radículas das sementes por pipetagem (ver seção 3.6.1). É válido considerar a possibilidade de que a quantidade inicial de inóculo pode não ter sido suficiente para disparar um processo de colonização mais efetivo, isto é, que causasse uma interação hospedeiro-endofítico de efeitos mais intensos. É importante considerar, contudo, que são diversos os mecanismos de ação dos microrganismos endofíticos com efeito promotor de crescimento, sendo que a mesma espécie pode, inclusive, utilizar-se de modos de ação diferentes durante o mesmo ciclo vegetal (OLIVEIRA et al, 2003). Os impactos no crescimento da planta serão dependentes das interações entre microrganismo e organismo hospedeiro, da adaptabilidade à microbiota indígena e às condições nutricionais do próprio cultivo (solo, disponibilidade de nutrientes, água, temperatura etc) e, por conseqüência, da própria planta. Como o relacionamento entre hospedeiro e bactérias endofíticas não é estático, a adaptação e reação aos tecidos do hospedeiro precisam ser desenvolvidas (STURZ & NOWAK, 2000). Tais autores acrescentam ainda que o sucesso do estabelecimento de benefícios ao hospedeiro será influenciado, em vários níveis, por uma rede de conexões entre espécies num ecossistema já estabelecido. No caso específico deste experimento de inoculação, é possível que as condições de cultivo gerais para as mudas no tocante à disponibilidade de nutrientes e água no período analisado tenha sido suficiente para que, sem uma

situação de estresse clara, os efeitos benéficos da interação com os endofíticos não tenham sido observados. Cabe salientar que os resultados preliminares a este estudo que revelaram efeitos nítidos desses isolados na promoção de crescimento de mudas de cacaueteiro foram realizados em condições de relativo estresse nutricional e hídrico para as plantas, de modo que os efeitos benéficos da interação hospedeiro-endofítico puderam ser mais nitidamente sentidos na promoção do crescimento das mudas (J.T. de Souza, comunicação pessoal). Com base nessas informações, uma interpretação alternativa plausível para os efeitos benéficos desses endofíticos no crescimento das mudas de cacaueteiro seria a de que as interações com a planta hospedeira levaram a uma maior tolerância fisiológica da mesma aos efeitos deletérios dos estresses a que estava submetida.

4.7.2 Experimento de Inoculação III

4.7.2.1. Altura da haste das mudas

Considerando os dois tipos de inoculação (I e S) com duas concentrações diferentes (10^{10} e 10^7 UFC/ml) neste experimento, os resultados das medidas das hastes (cm) das mudas controle e das inoculadas com as suspensões bacterianas revelaram, pela análise de variância (ANOVA), diferença significativa entre os tratamentos para mudas inoculadas pelo método de rega no solo (S). Médias de crescimento significativamente maiores do que as mudas controle e o tratamento 344-1.1 foram obtidas no tratamento de associação 344-1.1+629, na diluição mais concentrada de 10^{10} UFC/ml (Figura 11).

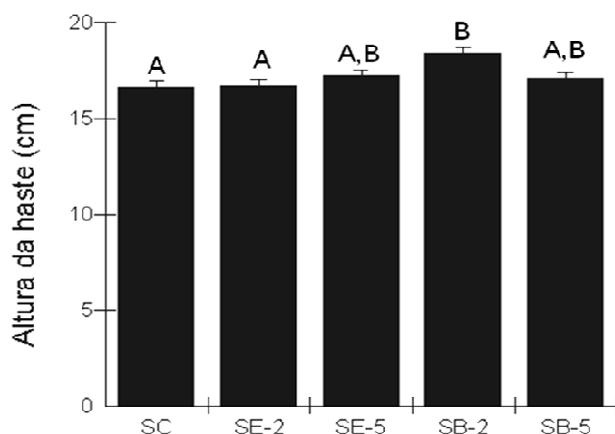


Figura 11: Altura das hastes aos 86 dias após inoculação pelo método de rega no solo (S) no experimento de inoculação III. Mudras controle (SC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (SE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (SE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (SB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (SB-5). As médias e erros padrões correspondem a 10 repetições por tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5%).

Estes resultados não somente sugerem que aplicação dos endofíticos diretamente no solo redunde em inoculação e colonização suficientes das mudas, mas também que maiores concentrações no momento da inoculação se fizeram necessárias para ser observado os efeitos de promoção de crescimento, uma inferência que pode estar relacionada às características específicas de colonização dos isolados sob estudo, bem como de suas interações com a planta. Verificou-se também que aparentemente não houve interferência negativa dos isolados 344 e 629 entre si nos efeitos de promoção do crescimento das hastes, podendo as maiores alturas, inclusive, terem resultado da ação sinérgica dos dois endofíticos. Resultados de promoção de crescimento para co-inoculação de isolados de endofíticos também ocorreram em experimentos de mudas de pepino (Silveira et al, 2004). Neste trabalho, associação de isolados promoveram aumentos de 70% para medidas de matéria seca da raiz e 40% para matéria seca total em relação ao efeito dos isolados sozinhos. Considerando efeitos de controle biológico, a inoculação associada de isolados bacterianos foi mais eficiente que

os isolados individualmente para o controle de *Colletotrichum orbiculare*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e *Erwinia tracheiphila* em pepino (DE MELLO et al, 2002).

4.7.2.2. Número de folhas

Os efeitos significativos de crescimento encontrados acima para o tratamento 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml pelo método de rega no solo (SB-2) também se fizeram sentir no número total de folhas das mudas aos 36, 50 e 86 dias após a inoculação. Conforme mostrado na Figura 12, as mudas deste tratamento apresentaram número de folhas significativamente maior que as mudas controle nestas datas de avaliação ($P < 0,05$). Novamente, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos pelo método de inoculação por imersão.

Aumento significativo do número de folhas e da área foliar foi observado com bactérias promotoras de crescimento em *Heliconia psittacorum* L.f. (SANTOS et al, 2005). Esses parâmetros, segundo os autores, podem ser considerados expressivos como medidas de crescimento, uma vez que as folhas são responsáveis diretas pela captação de energia solar e produção de matéria orgânica através da fotossíntese.

Cabe aqui sugerir uma possível explicação para este efeito observado. A produção de hormônios reguladores de crescimento vegetal pode ser estimulada pela ação de microrganismos endofíticos, sendo diversos os hormônios vegetais relacionados a esse efeito. A depender do estímulo e do hormônio produzido, o resultado será diversificado. Dentre os diversos hormônios de crescimento, as auxinas e o etileno estão envolvidos no desenvolvimento das folhas (RAVEN et al, 2001). Sendo assim, levanta-se a hipótese a ser posteriormente testada de que os isolados 344 e 629 possam ter, de alguma forma, estimulado a produção de um ou mais destes hormônios.

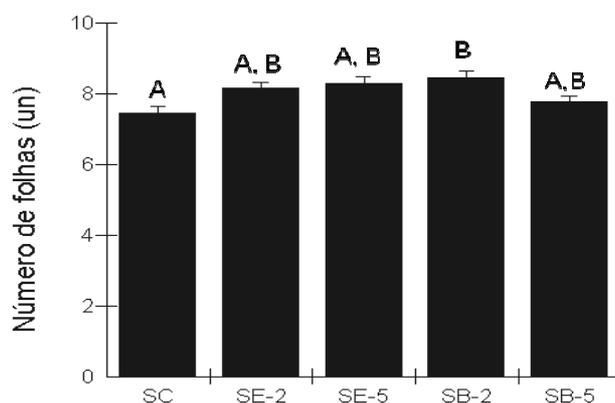


Figura 12: Número de folhas aos 86 dias após inoculação pelo método de rega no solo (S) no experimento de inoculação III. Mudras controle (SC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (SE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (SE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (SB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (SB-5). As médias e erros padrões correspondem a **10** repetições por tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5%).

4.7.2.3. Matéria seca

O aumento de biomassa inferido através da medida de matéria seca é um parâmetro bastante utilizado para a avaliação de promoção de crescimento em trabalhos de inoculação de microrganismos endofíticos. Apesar de alguns estudos apresentarem a medida de matéria seca da parte aérea separadamente da raiz, entendeu-se que uma avaliação de matéria seca total permitiria um parâmetro de avaliação satisfatório aos propósitos deste trabalho.

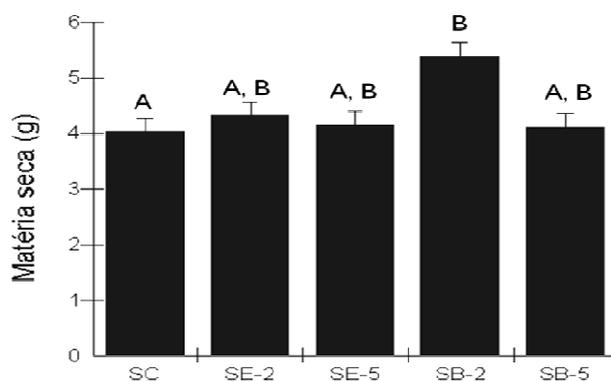


Figura 13: Avaliação de matéria seca (g), 90 dias após inoculação pelo método de rega no solo (S) no experimento de inoculação III. Mudras controle (SC), tratamento 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (SE-2), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (SE-5), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (SB-2), 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (SB-5). As médias e erros padrões correspondem a **10** repetições por tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5%).

Tomados em conjunto, os resultados de avaliação de biomassa para este experimento III confirmaram os efeitos anteriormente demonstrados por de Souza & Pomella (não publicado) para estes isolados endofíticos. É interessante notar que todos os métodos de inoculação e concentrações de suspensões bacterianas estudadas nos três experimentos descritos neste trabalho possibilitaram colonização sistêmica das mudas, detectável por plaqueamento (Tabela 8, Figura 7); porém, somente um dos tratamentos causou efeito significativo de promoção de crescimentos, diferindo das plântulas controle e do tratamento SE-2 (344-1.1 inoculado a 10^{10} UFC/ml), na altura da haste (Figura 11) e apenas das plântulas controle no número de folhas e matéria seca (Figuras 12 e 13). Uma possível explicação para este fato seria a necessidade de um limite mínimo quantitativo de UFC dos endofíticos dentro da planta, acima do qual são sentidos os efeitos de promoção de crescimento. Buscou-se estudar este aspecto neste trabalho, tanto por quantificação de UFC recuperadas em meio de cultura (Tabela 7), quanto por análises moleculares (seção 4.5.2); ajustes posteriores de metodologia para atingir esse objetivo poderão esclarecer essa hipótese. Outra possibilidade seria a de que a aplicação do endofítico no solo, de alguma forma, poderia estimular uma maior atividade de infecção e colonização do mesmo, a qual foi refletida numa colonização *in planta* com maior efeito na promoção de crescimento, mesmo que as mudas não estivessem em condições de estresse, como já comentado para o experimento I (seção 4.7.1).

Shishido et al (1995) demonstraram resultados significativos de promoção de crescimento através da avaliação de matéria seca de mudas de abeto inoculadas com três linhagens de *Bacillus*. Neste experimento foram avaliadas as medidas de matéria seca total das mudas, matéria seca das raízes e dos brotos, havendo sido encontradas médias significativas correspondentes para as plantas inoculadas nas três avaliações. Estes foram os mesmos parâmetros utilizados por de Mello et al (2002), também com pouquíssimas divergências. Silveira et al (2004), trabalhando com mudas de pepino, relatam índices de 55,5% e 39,5% para matéria seca da parte aérea, 42,9% e 37,2% para matéria seca da raiz, 41,6% e 34,9% para matéria seca total, respectivamente para isolados das espécies *Bacillus amyloliquefasciens* e *Enterobacter cloacae*.

Os mecanismos utilizados pelos endofíticos na promoção de crescimento são diversos, desde os de ação direta (fitoestimulação, fixação de N₂, produção de AIA) àqueles de ação indireta (competição com fitopatógenos, disponibilização de nutrientes, IRS) (BASHAN & DE-BASHAN, 2005; LODEWYCKX et al, 2002). Desse modo, ensaios direcionados à investigação dos mecanismos utilizados pelos isolados 344 e 629 na promoção de crescimento ainda se fazem necessários. Além disso, a utilização de um mutante resistente à Rifampicina para o isolado 344, e não o próprio isolado selvagem, precisará ser reavaliada, visto que tais mutações podem ter alterado o espectro de interações esperado para este endofítico.

4.8. Efeitos da colonização endofítica na tolerância à seca

Além da promoção de crescimento verificada anteriormente, o aumento de tolerância a estresses bióticos e abióticos é uma das características atribuídas aos endofíticos (PEIXOTO NETO et al, 2002; AZEVEDO et al, 2000), como, por exemplo, a tolerância à privação de água (seca) durante o crescimento vegetativo (SILVA et al, 2006). Dessa forma, um pequeno sub-ensaio foi montado a partir de sub-grupo de mudas do experimento de inoculação III, com o objetivo de averiguar a ação dos isolados 344 e 629 nas mudas inoculadas em situação de interrupção da rega (Figura 14, Tabela 9).

A inspeção visual das mudas 27 dias após a última rega sugere que as mudas do tratamento 344-1.1 pelo método de inoculação por imersão de sementes (I) apresentaram-se mais tolerantes à ausência de rega do que os demais tratamentos deste método. De forma semelhante, as mudas do tratamento 344-1.1+629 inoculadas pelo método de rega no solo (S) foram as menos sensíveis, mantendo ainda alguma vitalidade em relação aos demais tratamentos deste método (Figura 14).

Para o tratamento 344-1.1 nas mudas inoculadas pelo método I, após o período de escassez de água, todas ainda estavam vivas para a maior concentração de endofíticos (10^{10} UFC/ml), enquanto 80% permaneceram vivas para a concentração menor (10^7 UFC/ml). Para a associação entre 344-1.1+629,

40 e 60% das mudas estavam vivas, respectivamente para a maior e menor concentração inicial de endofíticos, num nível de sobrevivência semelhante ao das mudas controle (40%). Das duas mudas controle ainda vivas, uma ainda apresentava folhas inteiramente verdes no mesmo período enquanto a outra já iniciava o ressecamento. Já para o método de inoculação S, apenas os tratamentos da associação 344-1.1+629 apresentaram mudas ainda verdes transcorridos os 27 dias após interrupção da irrigação, sendo 20% para a maior concentração e 60% para a menor concentração (Figura 14, Tabela 9). Embora sem confirmação estatística, os resultados sugerem que estas plantas apresentaram maior resistência à privação de água, devido à presença das bactérias endofíticas.



Figura 14: Mudas do experimento de inoculação III, após 27 dias submetidas à privação de água. As mudas controle (A), 344-1.1 a 10^{10} UFC/ml (B), 344-1.1 a 10^7 UFC/ml (C), 344-1.1+629 a 10^{10} UFC/ml (D), e 344-1.1+629 a 10^7 UFC/ml (E) foram inoculadas pelo método de imersão; estes mesmos tratamentos nessa mesma ordem, representados pelas letras 'F' a 'J', foram inoculados pelo método de rega no solo.

Tabela 9: Vitalidade¹ de mudas do experimento de inoculação III, 27 dias após interrupção de rega.

Rep	Tratamentos de inoculação dos endofíticos ²									
	IC	IE-2	IE-5	IB-2	IB-5	SC	SE-2	SE-5	SB-2	SB-5
1	---	V	V	---	---	---	---	---	---	---
2	V	V	V	---	V	---	---	---	---	V
3	---	V	V	V	V	---	---	---	---	V
4	---	V	---	---	---	---	---	---	---	V
5	V	V	V	V	V	---	---	---	V	---

¹ 'V' indica mudas ainda vivas após o período observado.

² Ver Tabela 2.

Após estes 27 dias, foi percebido o brotamento de folhas novas em três dos tratamentos: no método de inoculação I, uma plântula do tratamento 344-1.1 na menor concentração (10^7 UFC/ml), e no método de inoculação S, uma plântula em cada concentração para a associação entre 344-1.1 e 629 (Figura 15). Esse parâmetro torna-se relevante, à medida que nenhuma das mudas controle apresentou tal fenômeno.

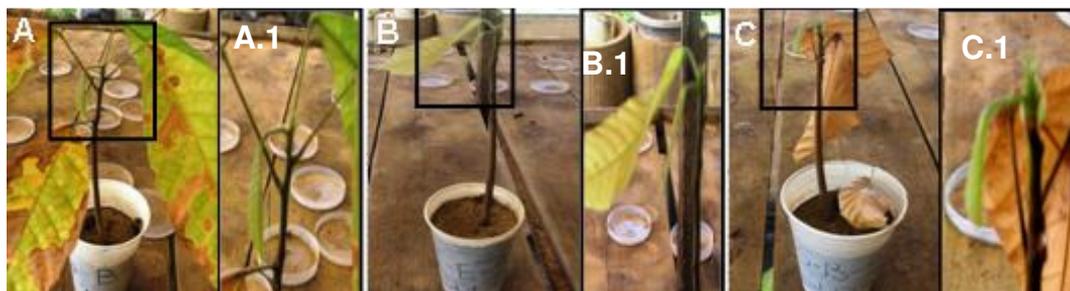


Figura 15: Brotamento de folhas novas nas mudas, 27 dias após a última irrigação. Tratamentos 344-1.1+629, nas concentrações 10^{10} (A) e 10^7 UFC/ml (B), no método de inoculação no solo; e 344-1.1, concentração 10^7 no método de inoculação por imersão (C). A.1, B.1 e C.1 designam ampliações da região de brotamento.

É interessante salientar que, de uma forma geral, observou-se claras diferenças entre os tratamentos de imersão e rega no solo, com estes últimos apresentando menor vitalidade, isto é, maior sensibilidade ao estresse hídrico. Considerando que os controles (A e F, Figura 14, Tabela 9) também

apresentaram essa diferença, não é possível atribuir aos tratamentos endofíticos esse efeito geral entre os métodos. Repetições desse experimento utilizando-se alguma forma de escore ou quantificação da vitalidade remanescente e um número maior de repetições por tratamento é necessário para que análises estatísticas possam ser realizadas. Conforme discutido acima, neste momento, os resultados apresentados deixam apenas indícios de um efeito dos endofíticos no aumento de tolerância à seca (Figura 14, Tabela 9), o que corroboraria a hipótese de que os efeitos benéficos destes endofíticos se fazem sentir de forma mais nítida quando a planta hospedeira encontra-se em condições de estresse.

4.9. Taxonomia dos isolados 344 e 629 por seqüenciamento dos genes 16S rDNA, hsp-60 e rpo-B.

Os genes escolhidos para o seqüenciamento – 16S rDNA (subunidade 16S do DNA ribossomal), hsp-60 (*heat-shock protein* 60 kDa) e rpo-B (subunidade β da RNA polimerase DNA-dependente) – são descritos na literatura como portadores de seqüências altamente conservadas e têm sido utilizados em estudos filogenéticos (LACAVA et al, 2006; DAHLLÖF et al, 2000; KWOK et al, 1999).

Foram obtidas seqüências de boa qualidade para os 3 genes analisados para o isolado 344 (Tabela 10). Os níveis de identidade nucleotídica para os fragmentos seqüenciados foram de 99 a 100% para os 3 genes. Considera-se que este nível de identidade de nucleotídeos para três ou mais genes permite a classificação taxonômica inequívoca do isolado. Assim, os resultados permitiram identificar o isolado 344 como pertencente à espécie *Enterobacter cloacae*. Os resultados de seqüenciamento corroboram classificação anterior realizada por métodos clássicos (J.T. de Souza, comunicação pessoal).

Para o isolado 629, apenas dois genes foram possíveis de serem seqüenciados, sendo que seqüências de boa qualidade foram obtidas somente para o 16S rDNA (Tabela 10). O nível de identidade obtido a partir de alinhamento automático com seqüências do *GenBank* pelo programa *nblast* foi de 99% para o respectivo gene de duas espécies do gênero *Bacillus*: *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. Resultados preliminares por taxonomia clássica já haviam

definido esse isolado como pertencente a este gênero. Dessa forma, torna-se necessário obter seqüências confiáveis de ao menos outros dois genes indicados pela literatura como genes de aplicação na filogenia molecular para definir a qual das duas espécies pertence este isolado. O seqüenciamento desses genes a fim de elucidar a espécie do isolado 629 integra o planejamento de nossa equipe de pesquisa.

Cabe salientar que *Enterobacter* e *Bacillus* estão entre os gêneros bacterianos mais freqüentemente isolados da microbiota endofítica nativa de diversas espécies vegetais (SILVA et al, 2006; LACAVA et al, 2006). Dentre as espécies mais citadas estão *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *E. agglomerans* (SILVEIRA et al; 2004; ARAÚJO et al, 2002; TORRES, 2005), e *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. pumilus* (GOH et al, 1996; KIM et al, 1997; DELGADILLO et al, 2001; REVA et al, 2004; LUCY et al, 2004, SILVEIRA et al, 2004; GOMES et al, 2003), tendo sido citados especialmente em trabalhos relacionados ao estudo dos efeitos associados principalmente à promoção de crescimento e ao controle biológico.

Tabela 10: Identificação taxonômica dos isolados endofíticos por seqüenciamento e análise comparativa (*nblast*) com seqüências do *GenBank* para os genes *16S rDNA*, *hsp60* e *rpo-B*¹.

Isolados / genes	nº de acesso	Espécie	pb ²	Ident. nucleot. (%)
344				
16s rDNA	AB244457.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	1434	99%
<i>hsp60</i>	AJ567879.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	330	100%
<i>rpo-B</i>	AJ543706.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	1038	99%
629				
16s rDNA	EU257446.1	<i>Bacillus subtilis</i>	1446	99%
	AY620954.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		99%

¹ '*hsp60*' = gene codificador da *heat shock protein* de 60 KDa; '*rpo-B*' = gene codificador da subunidade β da RNA polymerase. A seqüência da subunidade 16s do RNA ribossomal corresponde.

² número de pares de bases dos respectivos fragmentos amplificado e seqüenciados e que foram comparados a seqüências do *GenBank*.

O efeito direto de promoção de crescimento é uma característica dos gêneros e das espécies apontadas para estes endofíticos. Entretanto, dadas as

variáveis relacionadas às interações entre endofíticos e seus hospedeiros, os resultados podem ser diferenciados entre estudos. A inconstância dos resultados no trabalho com microrganismos endofíticos é, inclusive, um assunto amplamente discutido (CHANWAY et al, 2000; FREITAS et al, 2003), sendo abordada especialmente a dificuldade relacionadas à reprodutibilidade dos resultados, mesmo em condições semelhantes de inoculação e cultivo. Essas variações devem-se, obviamente, ao fato de não se poder prever experimentalmente toda a gama de interações que os organismos vivos podem expressar em sua convivência com a planta hospedeira, com o meio ambiente em que a mesma se encontra e com o restante da microbiota endofítica. Os resultados deste trabalho sugerem que, de fato, os endofíticos utilizados possuem capacidade de induzir alguns efeitos relevantes como promoção de crescimento, mas que não é possível basear-se em apenas um ou poucos experimentos de inoculação, feito nas mesmas condições, para verificar a presença ou ausência de ação endofítica benéfica. Um maior número de experimentos, repetidos com algumas variações dirigidas nas condições gerais, é necessário para confirmar ou refutar tendências encontradas e hipóteses levantadas.

5. CONCLUSÕES

1. Foi possível obter mutantes espontâneos do isolado 344 aos antibióticos Rifampicina e Ácido Nalidíxico.
2. Os isolados endofíticos 344 (variante resistente à Rifampicina) e 629 (tipo selvagem) colonizaram mudas de cacau de forma sistêmica, sendo recuperados a partir de órgãos distantes do ponto de inoculação.
3. O método de inoculação dos isolados pareceu ter pouco efeito na capacidade de colonização *in planta* dos mesmos.
4. A maior concentração de isolados endofíticos *in planta* tendeu a ocorrer nas raízes.
5. Estes isolados demonstraram capacidade de colonizar toda a plântula após 20 dias de aplicação na mesma, sendo recuperados a partir do plaqueamento separado de órgãos da plântula – raízes, caules e folhas.
6. Os isolados testados colonizaram as mudas de forma simultânea, mostrando compatibilidade entre si.
7. Supõe-se que o isolado 629 seja melhor colonizador que o 344, devido a predominar nas colônias recuperadas dos tratamentos de inoculação conjunta.

8. Efeitos dos isolados na promoção de crescimento de mudas de cacau ocorrem de forma individualizada, bem como de forma associada, sendo evidenciados pelo aumento de biomassa das mudas, medida pelos parâmetros altura da haste, número de folhas, biomatéria fresca e matéria seca.
9. O método de inoculação por rega no solo com altas concentrações iniciais dos endofíticos apresentou promoção de crescimento significativamente diferente das plântulas controle.
10. Os isolados estudados demonstraram indícios de que possuem efeito de conferir tolerância à seca nas mudas inoculadas.
11. Houve alterações fisiológicas nas mudas submetidas à inoculação dos isolados endofíticos sob estudo, manifestados pelos parâmetros taxas fotossintéticas e condutância estomática.
12. O isolado 344 pertence à espécie *Enterobacter cloacae* e o isolado 629 pode ser classificado como pertencente ao gênero *Bacillus*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As pesquisas envolvendo microrganismos endofíticos têm galgado vários degraus nas últimas décadas, mas ainda existe muito a ser desvendado, principalmente em relação aos endofíticos e suas interações com plantas hospedeiras nativas de países de clima tropical, como o Brasil. Os endofíticos podem vir a responder muitos anseios dos agricultores e da sociedade em relação ao manejo de culturas de forma eficiente e menos agressiva aos ecossistemas.

O presente trabalho reforça a possível aplicabilidade dos endofíticos como promotores de crescimento no cultivo do cacau e abre caminho para outras investigações relacionadas à habilidade dos endofíticos em promover aumento da tolerância ao estresse hídrico. Integram o planejamento da nossa equipe de pesquisa testes relacionados à ação desses isolados no controle biológico, especialmente de *Phytophthora* spp. e *Moniliophthora perniciosa*, e no aumento de resistência sistêmica, também utilizando o cacauzeiro como planta-modelo.

Os ensaios utilizando técnicas moleculares como ferramentas de apoio para a validação da recuperação dos isolados inoculados é outro passo a ser aprimorado. Alguns avanços já foram feitos e espera-se que novos testes possibilitem essas respostas.

Almeja-se fortalecer os estudos com endofíticos em nossa região, estabelecendo um núcleo de estudos que possa contribuir significativamente com as pesquisas sobre suas interações com o cacauzeiro, bem como com plantas hospedeiras de outras espécies de interesse agrônômico, permitindo assim o desenvolvimento de estratégias de produção agrícola ambientalmente sustentáveis, que possam auxiliar na conservação da biodiversidade do bioma Mata Atlântica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, p.1012-22, 2005.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389–3402, 1997.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.& AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial population and their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.10, p.4906-4914, 2002.

ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen in a tropical tree. **Proc Nat Acad Sci**, v.100, n.26, p. 15649-15654, 2003.

AYRES, M.; AYRES JR., M. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. 2007. (<http://www.mamiraua.org.br/download>). Acesso: 05/05/08.

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

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S. e AZEVEDO, J.L. (Eds). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.445-461, 1998.

BAI, U.; LEWANDOSKI, M.; DUBNAU; SMITH, I. Temporal Regulation of the *Bacillus subtilis* early sporulation gene spooF. **Journal of Bacteriology**, v.172, n. 9, p.5432-5439, 1990.

BALDANI, J. I.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R. S.; BALDANI, V.L.D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: **Biotechnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria** (Atti-Serafini, L.; Barros,N.M. & Azevedo, J.L. orgs.). EDUCS, p.197-232, 2002.

BARAC, T.; TAGHAVI, S.; BORREMANS, B.; PROVOOST, A.; OEYEN, L.; COLPAERT, J.V.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. **Nat. Biotechnol.**, v.22, p. 583-588, 2004.

BASHAN, Y; DE-BASHAN, L. Bacteria: Plant growth-promoting. **Encyclopedia of soils in the environment**, v.1, p. 103-115, 2005.

BENCHIMOL, R.L.; CHU, E.Y.; YUITIMUTO, R.; DIAS-FILHO, M.B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.7, p.1343-1348, 2000.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; QUADT HALLMAN, A.; TUZUN, S. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, v.112, n.3, p.919-929, 1996.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B. J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p.343–350, 2001.

BRINGEL, J. M.M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C.H. Colonização radicular de plantas cultivadas por *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3. **Scientia Agricola**, v.58, n.3, p.497-500, 2001.

BROOKS, D.S.; GONZALEZ, C.F.; APPEL, D.N.; FILER, T.H.. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. **Biological Control**, v.4, p.373–381, 1994.

CANKAR, K; KRAIGHER, H.; RAVNIKAR, M.; RUPNIK, M. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). **FEMS Microbiology Letters**. v.244, p.341–345, 2005.

CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F. G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v.133, p.81-88, 2000.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v.5, n.1, p.83-91, 1995.

CHEPOTE, R.E.; SANDOVAL, O.S.; ARAÚJO, Q.R.; SODRÉ, G.A.; REIS, E.L.; PACHECO, R.G.; MARROCOS, P.C.L.; SERÓDIO, M.H.C.F.; MENEZES, A.A.; VALLE, R.R. Aptidão agrícola e fertilidade de solos para a cultura do cacauzeiro. In: Valle, R. R. (org) **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacauzeiro**. Ilhéus-BA: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, p.42-81, 2007.

CLAYDON, N.; GROVE, J.F.; POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Homopsis oblonga*. **Phytochemistry**, v.24, p.937-943, 1985.

COLOMBO, P.M. Occurrence of endophytic bacteria in *Siphonous algae*. **Phycologia**, v.17, p.148-151, 1978.

DAHLLOF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. RpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3376-3380, 2000.

DE ARAÚJO, J. M.; da SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 447-51, 2000.

DE BOER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P.A.H.M.. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.201-210, 1999.

DE MELLO, M. R. F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R.; ASSIS, A.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para propagação de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v.28, n.3, p. 222-228, 2002.

DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. **Azospirillum VI and related microorganisms**, p.169-187, 1995.

DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNARD, K.; MCCULLY, M.E. Further evidence that the N₂ fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p.1843-1846, 1995.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; MACCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v.105, p.1139-1147, 1994.

FINDLAY, J. A.; BUTHELEZI, S.; LAVOIE, R.; PENA-RODRIGUEZ, L.; MILLER, J.D. Bioactive isocoumarins and related metabolites from conifer endophytes. **Journal of Natural Products**, v.58, p.1759-1766, 1995.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H.M.. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytol**, v.122, p. 299-305, 1992.

FREITAS, S. S.; MELLO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.61-70, 2003.

FROMMEL, M. I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas* sp.: plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere. **Plant Soil**, v.150, p.51-60, 1993.

FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* growth potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, v.96, p.928-936, 1991.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, p.205-227, 1998.

GOH, S. H.; POTTER, S.; WOOD, J. O.; HEMMINGSEN, S. M.; REYNOLDS, R. T. P.; CHOW, A. W. HSP60 Gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.4, p.818–823, 1996.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P.. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.4, p.699-703, 2003.

GRAMACHO, I.C.P.; MAGNO, A.E.S.; MANDARINO, E.P.; MATOS, A. **Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia**. Ilhéus: CEPLAC, 1992.

GUO, B.; DAI, J.R.; NG, S.; HUANG, Y.; LEONG, C.; ONG, W.; CARTE, B. K. Cytonic acids A and B: novel tripeptide inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. **Journal of Natural Products**, v.63, p.602-604, 2000.

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

HERRE, E.A., MEJÍA, L.C., KYLLO, D.A., ROJAS, E., MAYNARD, Z., BUTLER, A., VAN BAEL, S.A. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. **Ecology**, v.88, n.3, p.550-558, 2007.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of concepts. **Plant disease**. v. 87, p. 4-10, 2003.

JONES, C.J.; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M.O.; SALA, F.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers

in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v.3, n.5, p.381-390, 1997.

KADO, C.I. Plant pathogenic bacteria. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Ed.). **The Prokaryotes**, p.660-662, 1992.

KEEL, C.; WELLER, D. M.; NATSCH, A.; DÉFAGO, G.; COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.552-563, 1996.

KIM, D.S.; WELLER, D.M.; COOK, R.J.. Population Dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the Rhizosphere of wheat. **Biological Control**, v.87, n.5, p.559-564, 1997.

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: FB Metting Jr, ed, **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**, p.255–274, 1992.

KNUDSEN, G.R.; SPURR JR, H.W.. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. **Plant Disease**, v.71, n.5, p.442-445, 1987.

KOBAYASHI, D.Y., PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon, C.W., White, J.F., Jr. (Eds.), **Microbial Endophytes**, p.199–236, 2000.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.

KWOK, A. Y. C.; SU, S. C.; REYNOLDS, R. P.; BAY, S. J.; AV-GAY, Y.; DOVICH, N. J.; CHOW, A. W. Species identification and phylogenetic relationships based on partial hsp60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1181-1192, 1999.

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

LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1112-1120, 1996.

LASOTA, J.A.; WALDVOGEL, M.G.; SHETLAR, D.J. Fungus found in galls of *Adelges abietis* (L.) (*Homoptera: Adelgidae*): identification within tree distribution

and possible impact on insect survival. **Environmental Entomology**, v.12, p.245-246, 1983.

LEE, J.C.; LOBKOVSKY, E.; PLIAM, N.B.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Subglutinol-A and subglutinol-B immuno suppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. **Journal of Organic Chemistry**, v.60, p.7076-7077, 1995.

LI, J.Y.; STROBEL, G.; HARPER, J.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Cryptocin, a potent tetramic antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organic Letters**, v.23, p.767-770, 2000.

LIU, L., KLOEPPER, J.W., TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.695-698, 1995.

LODEWYCKX, C.; VANGRONVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, n. 6, p. 583–606, 2002.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brook**. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos do cacau**. ESALQ, Piracicaba-SP, 2006. (Tese de Doutorado)

MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A. Mecanismos de ação de bactérias promotoras de crescimento. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária – UFRPE, p.139-151, 2000.

MARTIN, J. K. Comparison of agar media for counts of viable soil bacteria. **Soil Biol. Biochem**, v.7, p.401-402, 1975.

MEYNELL, G.G.; MEYNELL, E. **Theory and practice in experimental bacteriology**. Cambridge University Press, Cambridge, 1970.

MCINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. A survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and soil**, v.173, p.1-6, 1995.

MONTEIRO, W.R.; AHNERT, D. Melhoramento Genético do Cacaueiro. In: Valle, R. R. (org) **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**. Ilhéus-BA: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, p.01-16, 2007.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Mini-review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.127-141, 1998.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **TRENDS in Biotechnology**, v.23, n.1, p.6-8, 2005.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p.10-13, 2004.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161), 2003.

OLIVEIRA, I. A.; VASCONCELLOS, M. J.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; VARGAS, M.A.; SÁ, N. M. H. Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp. associated with beans cultivated in Brazilian cerrado soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.39-44, 2000.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I.. **Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2004.

PEIXOTO-NETO, P.A.S; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **BLACPMA**, v. 3, n.4, 2004.

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

PÉREZ, T.; ALBORNOZ, J.; DOMÍNGUEZ, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, v.7, n.10, p.1347-1357, 1998.

POMELLA, A.W.V.; DE SOUZA, J.T.; MACAGNAN, D.; NIELLA, G.R.. In: VALLE, R. R. (org). **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**. Ilhéus-BA: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, p.189-198, 2007.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systems resistance by plant growth promotion rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. (Eds.). **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.28, p.646-675, 2001.

REDMAN, R.S.; FREEMAN, S.; CLIFTON, D.R.; MORREL, J.; BROWN, G.; RODRIGUEZ, R.J. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. **Plant Physiology**, v.119, p. 795-804, 1999.

REIS JÚNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 33p., 2002. (Documentos, 51),

REVA, O.N.; DIXELIUS, C.; MEIJER, J.; PRIEST, F.G. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Ecology**, v.48, p.249–259, 2004.

RODRIGUES, K.F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleraceae*. **Mycologia**, v.86, p.376-385, 1994.

RODRIGUES, K.F.; SAMUELS, G.J. *Idriella* species endophytic in palms. *Mycotaxon*, v.43, p.271-276, 1992.

ROWAN, D.D. Lolitrems, peramine and paxilline: mycotoxins of the ryegrass/endophyte interaction. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.44, p. 103-122, 1993.

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

RUBINI, M. R. **Microbiota endofítica de cacauero (*Theobroma cacao* L) e o controle biológico de *Crinipellis pernicioso***. Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, 2003. (Dissertação de Mestrado).

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **TRENDS in Plant Science**, v.9, n.6, 2004.

SANTOS, M.H.L.C.; MARIANO, R.L.R.; CÂMARA. T.R.; ANDRADE, A.G.; WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v.32, n. 2, p.1-8, 2005.

SCHARDL, C.L.; PHILLIPS, T.D. Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going? **Plant Disease**, v.81, n.5, p.430-438, 1997.

SHIOMI, H.F.; SILVA, H.S.A.; DE MELO, I.S.; NUNES, F.V.; BERTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, n.1, p.32-39, 2006.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by growth-promotion rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.191-196, 1999.

SHISHIDO, M.; MASSICOTE, H.B.; CHANWAY, C.P. Effect of plant growth promoting *Bacillus* strains on pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection. **Annals of Botany**, v.77, p.433-441, 1996.

SILVA, A.C.M. **Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauero**. Cruz das Almas-BA, UFRB, 2007. (Dissertação de Mestrado).

SILVA, H.S.A.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C.R.F.; TOZZI, J.P.L.; DE MELO, I.S.; NUNES, F.V.. **Microrganismos endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 25p. (Embrapa Meio Ambiente, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: 38), 2006.

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVA NETO, E. B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.2, p.217-221, 2004.

SINGH, P.P.; SHIN, Y.C.; PARK, C.S.; CHUNG, Y.R.. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, v.89, 92-99, 1999.

SIQUEIRA JR., J.F.; RÔÇAS, I.N.. A 16S rDNA-based nested PCR protocol to detect *Campylobacter gracilis* in oral infections. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n.2, p.142-146, 2003.

SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2003. (Tese de Doutorado).

SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.S.; DE MELO, A.M.T.; TRANI, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.30, p.225-234, 2006.

SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoramento Ambiental e Socio-econômico. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento Genético do Cacauero**. Viçosa: FUNAPE-UFMG, p.02-57, 2001.

SOUZA, A.O. **Bactérias endofíticas de milho (*Zea mays*, L.) e sua variabilidade genética analisada por RAPD**. Piracicaba, ESALQ/USP, 1996. (Dissertação de Mestrado)

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J.. *Azospirillum*, a free-living nitrogenfixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Rev**, v.24, p.487-506, 2000.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of *Pacific yew*. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G.A.; MILLER, R.V.; MARTINEZ-MILLER, C.; CONDRON, M.M.; TEPLow, D.B.; HESS, W.M. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology-UK**, v. 145, p. 1919-1926, 1999.

STROBEL, G.A.; HESS, W.M. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. **Chemical Biology**, v. 4, p. 529-536, 1999.

STROBEL, G.A.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, v.142, p.435-440, 1996.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v.15, n.2, p.183-190, 2000.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; ARSENAULT, W.J.; BUCHANAN, N.A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, v.48, p.360-369, 1999.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, n.1, p.13-19, 1997.

TORRES, A.R. **Diversidade genética de enterobactérias endofíticas de diferentes hospedeiros e colonização de *Catharantus roseus* por endófitos expressando o gene *gfp***. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2005. (Tese de Doutorado).

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.R.N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Athenue, 1999.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.36, p.453-483, 1998.

VARMA, A.; VERMA, S.; SUDHA; SAHAY, N.; BÜTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.6, p. 2741-2744, 1999.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.127-141, 2001.

WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3468-3473, 2000.

WEBBER, J. A natural control of *Dutch elm* disease. **Nature**, v.292, p.449-451, 1981.

WHITE JR., J.F.; MARTIN, T.I.; CABRAL, D. Endophyte-host associations in grasses. XXII Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phyllplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. **Mycologia**, v.88, n.2, p.174-178, 1996.

WILSON, D. Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**. 73, p. 274-276, 1995.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, n.2, p.22-271, 1987.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S.. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Appl Environ Microbiol**, v.61, p. 1104-1109, 1995.

YOUNG, C.A.; FELITTI, S.; SHIELDS, K.; SPANGENBERG, G.; JOHNSON, R.D.; BRYAN, G.T.; SAIKIA S.; SCOTT, B. A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. **Fungal Genetics and Biology**, v.43, p.679-693.

ZHANG, S.; XU, W.; YAN, Z.; MEI, R. Research and commercialization of yield-increasing bacteria (YIB) in China. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT DISEASES. **Proceedings**, p.47-53, 1996.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, n.5, p.723-735. 2008.

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