



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELIANE SANTOS JESUS

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA
PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL**

CRUZ DAS ALMAS - BA
DEZEMBRO - 2010

ELIANE SANTOS JESUS

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA
PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL**

Monografia apresentada ao curso de
graduação em Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Recôncavo da
Bahia, como requisito parcial a obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof^o. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Co-orientador: MSc. Augusto César M. da Silva

**CRUZ DAS ALMAS - BA
DEZEMBRO – 2010**

Ficha Catalográfica

J58 Jesus, Eliane Santos.

Potencial de bactérias endofíticas no controle biológico da podridão vermelha do sisal. / Eliane Santos Jesus. – Cruz das Almas - Ba, 2010.

34f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Sisal. 2.Sisal – Controle biológico. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD 633.577

Eliane Santos Jesus

POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA
PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profº Dr. Jorge Teodoro de Sousa

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - CCAAB

Membro Titular: Dr. Juan Manuel Anda Rocabado

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCAAB

Membro Titular: MSc. Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCAAB

À minha família,

que me ensinou o verdadeiro
valor da vida e respeito ao
próximo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao grandioso Deus, por ter me dado o dom da vida.

Aos meus pais, Everaldo e Rosália, por terem sempre presentes nos momentos difíceis, me aconselhando e dando força.

Às minhas irmãs e amigas, Dalila e Camila, pelo apoio e preocupação durante estes quatro anos da minha vida.

Aos meus amigos da república, pelos momentos de alegria compartilhados.

Ao Tiago, pelo amor, compreensão e apoio nestes quatro anos.

Aos meus amigos da graduação, pelo companheirismo nos bons e maus momentos do curso.

Às técnicas do laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UFRB, pelo auxílio e amizade.

Aos colegas do laboratório, pela amizade e ótima convivência.

Ao Augusto César Moura da Silva, pelo ensinamento e disponibilidade durante a realização das atividades.

Ao profº Jorge Teodoro de Souza, pela oportunidade de aprendizagem e crescimento profissional.

POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL

Autora: Eliane Santos Jesus

Orientador: Prof^o. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Co-orientador: MSc. Augusto César M. da Silva

RESUMO

Bactérias endofíticas vivem no interior de plantas sem causar alterações visíveis. Estes organismos têm reconhecido potencial na agricultura devido a promoção de crescimento de plantas, indução de resistência a doenças e controle biológico de patógenos. Assim, foram realizados estudos para seleção de isolados com potencial para controle biológico da podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *Aspergillus niger* e avaliações da densidade populacional de bactérias endofíticas no sisal. Paralelamente procedeu-se a identificação de isolados por meio de PCR. Houve maior densidade bacteriana em mudas com sintomas de podridão vermelha, em comparação com mudas assintomáticas e um maior número de bactérias associadas ao caule, seguido de raízes e folhas de mudas. Foram obtidos dez isolados com potencial de antagonismo. Testes *in vitro* resultaram em 96 % de controle; sendo que, em casa-de-vegetação o controle da doença foi de 60 %. Por meio de PCR, os agentes de biocontrole foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* (três isolados) e *Pseudomonas* (cinco isolados). Este estudo apresenta o potencial de isolados endofíticos no controle da podridão vermelha do sisal.

Palavras-chave: Antagonismo; *Aspergillus niger*; PCR.

**POTENTIAL OF ENDOPHYTIC BACTERIA FOR BIOLOGICAL CONTROL OF
Agave sisalana BOLE ROT**

Author: Eliane Santos Jesus
Advisor: Prof°. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Co-advisor: MSc. Augusto César M. da Silva

ABSTRACT

Endophytic bacteria live inside plants without causing visible symptoms. These microbes are recognized for their potential as plant growth promoters, induction of disease resistance, and biological control activity against plant pathogens. Thus, the objective of this work was to isolate endophytic bacteria with potential for biological control of the bole rot disease of sisal, caused by the fungus *Aspergillus niger* and to evaluate the population densities of endophytic bacteria in sisal. Simultaneously the identification of isolates was performed by PCR. There was a higher bacterial density in symptomatic seedlings when compared to asymptomatic ones. Higher densities of bacteria were associated to stems, followed by roots and leaves. Ten isolates with antagonistic potential were obtained. *In vitro* assays resulted in 96 % inhibition of *A. niger* and greenhouse experiments in 60 % of disease inhibition. The genus *Bacillus* (three isolates) and *Pseudomonas* (five isolates) were identified by using PCR among the potential biocontrol agents. This work evidences the potential of endophytic bacterial isolates in the control sisal bole rot disease.

Palavras-chave: Antagonism; *Aspergillus niger*, PCR

LISTA DE FIGURAS

FIG 1. Produção de sisal no semi-árido nordestino	03
FIG 2. Aspecto terminal da doença podridão vermelha do caule do sisal e representação morfológica de <i>Aspergillus niger</i> por microscopia.....	05
FIG 3. Escala de notas utilizada nos experimentos <i>in vitro</i>	11
FIG 4. Escala de notas utilizada no experimento em casa-de-vegetação ...	13
FIG 5. População de bactérias endofíticas em plantas de sisal	15
FIG 6. Exemplo dos tratamentos no experimento com discos de sisal	16
FIG 7. Controle <i>in vitro</i> do fungo <i>A. niger</i> por bactérias endofíticas	17
FIG 8. Efeito antagônico de substâncias bacterianas voláteis ao <i>A. niger</i> ..	18
FIG 9. Controle da podridão vermelha do sisal por bactérias endofíticas ...	19
FIG 10. Perfil eletroforético dos produtos de PCR	20

SUMÁRIO

Resumo	V
Abstract	Vi
Lista de figuras	Vii
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Justificativa	02
1.2 Objetivos	02
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 A cultura do sisal (<i>Agave sisalana</i>)	02
2.2 Controle biológico	05
2.3 Bactérias endofíticas	06
3. METODOLOGIA	
3.1 Isolamento e quantificação de bactérias endofíticas	09
3.2 Seleção <i>in vitro</i> de bactérias antagonicas a <i>Aspergillus niger</i>	10
3.3 Bioteste <i>in vitro</i> com substâncias voláteis na inibição de <i>A. niger</i>	11
3.4 Seleção de bactérias antagonicas a <i>A. niger</i> em casa-de-vegetação	12
3.5 Identificação molecular por meio de PCR	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Isolamento e quantificação bacteriana	14
4.2 Controle biológico <i>in vitro</i>	16
4.3 Controle biológico <i>in vivo</i>	18
4.4 Identificação molecular dos isolados	19
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
6. REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

O sisal (*Agave sisalana* Perr.) é plantado nos continentes americano, africano e asiático. O Brasil é o maior produtor de fibra de sisal do mundo. A produção de sisal no Brasil, concentra-se na região nordeste, na qual o estado da Bahia é o maior produtor. A cultura do sisal é de fundamental importância para a economia de vários municípios no semi-árido nordestino, pois estas regiões de solos secos não apresentam alternativas para exploração de outras culturas e quando apresentam, as mesmas são limitadas (Alves et al., 2004).

Apesar da relevância da cultura do sisal, observa-se nos últimos anos um declínio contínuo desta cultura. Vários fatores têm contribuído para esta decadência, dentre eles destaca-se a doença podridão vermelha do caule do sisal (Alves et al., 2004). Esta doença, causada pelo fungo *Aspergillus niger*, tem preocupado os produtores devido a sua capacidade de destruição, que faz com que plantas afetadas morram com o progresso da doença. Neste contexto, microrganismos endofíticos e seu potencial uso no controle de *A. niger* podem ser uma alternativa viável no controle da doença.

Microrganismos endofíticos vivem no interior de plantas sem causarem sintomas aparentes de doença ou alterações fisiológico-morfológicas (Petrini, 1991 citado por Pileggi, 2006). Entre os microrganismos estudados, as bactérias têm um grande potencial na agricultura devido aos efeitos de promoção de crescimento de plantas, indução de resistência a doenças e controle biológico de fitopatógenos (Neto et al., 2002).

Este estudo visa o estudo sobre as bactérias endofíticas do sisal e seu potencial uso no controle da podridão vermelha do caule.

1.1. Justificativa

O sisal é cultivado em maior escala no semi-árido nordestino, região com predominância de solos secos, onde a cultura do sisal é uma das poucas capazes de sobreviver às condições edafoclimáticas da região. Desta forma, a cultura do sisal torna-se uma das únicas alternativas de captação de renda pelo homem do campo. Segundo a Conab (2008), 20 mil famílias do semi-árido baiano obtêm sua renda a partir da atividade agrícola com o sisal. Além disso, esta cultura gera mais

de meio milhão de empregos diretos e indiretos por meio de sua cadeia produtiva. Entretanto, a produção de sisal vem diminuindo drasticamente devido à podridão vermelha do caule, doença causada pelo fungo *Aspergillus niger* (Alves et al., 2004). Vários grupos de pesquisa já demonstraram a eficiência de bactérias endofíticas no controle de fitopatógenos, estudos referentes a esses microrganismos são importantes para determinar sua eficiência e atuação no controle desta doença. O estudo desses microrganismos em sisal poderá resultar no seu emprego no sistema produtivo da cultura, podendo ser uma alternativa econômica e ambientalmente viável.

1.2. Objetivos

➤ Objetivo geral:

Selecionar e estudar bactérias endofíticas do sisal com ação antagônica a *Aspergillus niger*.

➤ Objetivos específicos:

- Quantificar as bactérias endofíticas associadas ao sisal;
- Realizar bioensaios para testar a atividade dos isolados endofíticos no controle do patógeno *A. niger*;
- Identificar os isolados endofíticos antagônicos a *A. niger* por PCR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do sisal (*Agave sisalana*)

O sisal (*Agave sisalana* Perr.) é uma monocotiledônea pertencente à família *Agavaceae*, subfamília *Agavoidea* e seu principal produto é a fibra do tipo dura, com elevados teores de celulose e lignina, que oferecem inúmeras aplicações. Apresenta metabolismo fotossintético do tipo CAM, abrindo os estômatos à noite, para não perder água via transpiração durante o dia e se beneficiar do orvalho. Esta planta

prefere locais de altitude de até 600 m e possui adaptação às regiões tropicais e subtropicais, suportando secas prolongadas e temperaturas elevadas (Amorim Neto & Beltrão, 1999; Silva et al., 2008).

O sisal ocorre nos continentes americano, africano e asiático. Entretanto, a sua maior concentração está na América Latina, e o Brasil é o maior produtor da fibra de sisal do mundo, com mais de 60% da produção mundial. Esta cultura possui a principal fibra dura produzida no mundo, correspondendo a aproximadamente 70% da produção comercial (Alves et al., 2004).

No Brasil a produção de sisal concentra-se na região nordeste, na qual a Bahia é o maior produtor seguido por Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará. A cultura do sisal (Figura 1) é de fundamental importância para a economia de vários municípios no semi-árido nordestino, visto que estas regiões de solos secos não apresentam alternativa para exploração de outras culturas e quando apresentam, as mesmas são limitadas. Segundo informações da Conab, a Bahia, que é responsável por 95% da produção nacional de sisal, tem mais de 20 mil famílias de agricultores que têm no cultivo do sisal, a sua principal fonte de renda (Suinaga et al., 2006).



Figura 1. Produção de sisal no semi-árido nordestino.

Apesar da relevância da cultura do sisal, tem se constatado nos últimos anos um declínio contínuo desta cultura, expresso em reduções da área cultivada e na produtividade. Inúmeros fatores têm contribuído para esta decadência, dentre os quais, o baixo índice de aproveitamento das fibras de sisal, a concorrência com as

fibras sintéticas, e nos últimos anos a podridão vermelha do caule, doença que tem ameaçado ainda mais a sustentabilidade desta cultura (Alves et al., 2004).

A podridão vermelha do caule é uma doença causada por *Aspergillus niger* (Figura 2), um fungo do filo Ascomycota, que pode ser veiculado pelo solo, água, vento, ferramentas infectadas, etc. Esse fungo é tido como parasita fraco em função da dependência de lesões de origem mecânica ou fisiológica e de condições ambientais adversas ao hospedeiro para iniciar o processo de infecção (Coutinho et al., 2006). Portanto, ferimentos causados na base das folhas por ocasião do corte dessas folhas para o desfibramento e àqueles causados abaixo da superfície do solo por instrumentos utilizados para realização de tratos culturais, como capinas, podem constituir-se em importantes vias de penetração para esse patógeno (Silva et al., 2008).

A podridão vermelha do caule é o principal problema fitossanitário da cultura no Brasil. Esta doença tem preocupado os produtores de sisal devido a sua alta capacidade de destruição. As folhas das plantas afetadas tornam-se impróprias ao desfibramento e as plantas sintomáticas morrem com o progresso da doença, cuja característica é o escurecimento gradativo dos tecidos internos do caule. As áreas afetadas variam da coloração parda ao vermelho e se estendem da base do caule à base da folha da planta (Coutinho et al., 2006; Suinaga et al., 2006). Em plantas com estádios avançados da doença, as folhas se tornam amareladas e o caule completamente apodrecido. Embora seja fatal para a cultura, plantas de sisal infectadas pelo patógeno podem sobreviver por algum tempo. Isso se deve a colonização lenta peculiar do agente etiológico. A podridão vermelha do caule afeta plantas de sisal em todos os estágios fenológicos, desde brotos a plantas no final do ciclo (Bock, 1965; Silva et al., 2008).

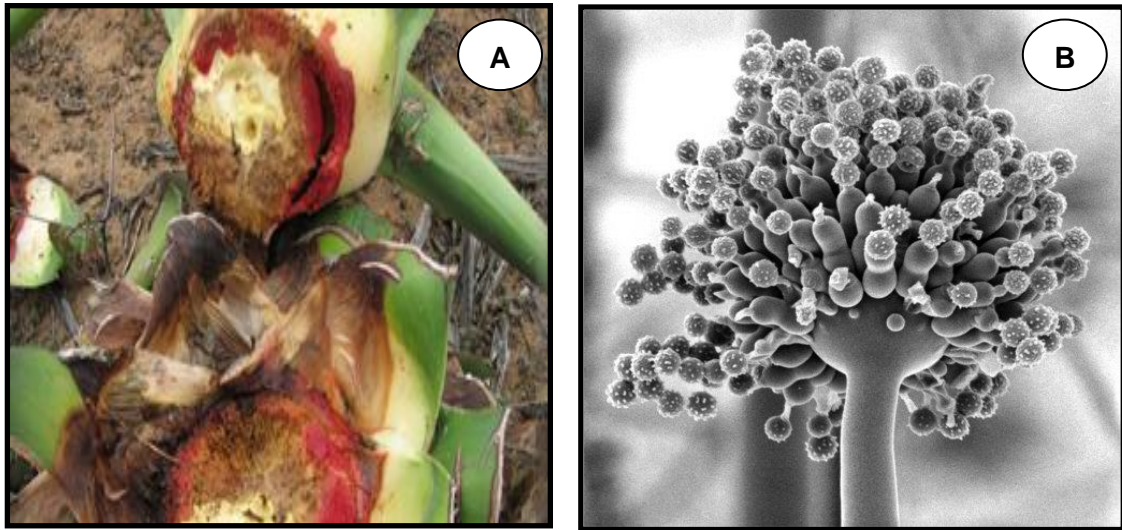


Figura 2. A – Aspecto terminal da doença podridão vermelha do caule do sisal; B – Micrografia eletrônica de varredura de um conidióforo de *Aspergillus niger*.

Ainda não existe um mecanismo de controle eficaz para essa doença. No entanto, alguns grupos de pesquisa no Brasil estão estudando maciçamente o patossistema, assim como os métodos e medidas mais adequadas para garantir a sustentabilidade da cultura.

2.2. Controle biológico

A utilização de agroquímicos para o controle de doenças de plantas, atrai muitos produtores agrícolas por apresentar simplicidade, facilidade de aplicação e capacidade de permanecer ativo por um certo período (Bettiol, 2008; Bettiol & Morandi, 2009). No entanto, sabe-se das consequências e dos efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente causados pelo seu uso freqüente, e muitas vezes excessivo. Esse fato, aliado ao desafio de aumentar a produção agrícola com sustentabilidade, impõe a necessidade de estudos com o intuito de obter um eficiente controle de fitopatógenos pela utilização de alternativas ambientalmente corretas. Nesse contexto, o emprego de microrganismos no controle de patógenos de plantas, configura uma opção de manejo agrícola perfeitamente viável (Oliveira & Manfio, 2006).

O termo controle biológico foi mencionado pela primeira vez em 1931 por B. B Sanford e W. C. Broadfoot ao estudarem o mal-do-pé do trigo, causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Baker & Cook, 1974). No Brasil, o primeiro

artigo publicado sobre o assunto foi por Reinaldo Foster (1950), em que abordava a inativação do vírus do mosaico comum do fumo (TMV) por filtrados de culturas de *Trichoderma sp.* Entretanto, somente em 1987, um produto a base de *Trichoderma viride* foi utilizado comercialmente no Brasil para o controle da podridão de raízes e colo em macieira, causado por *Phytophthora cactorum* (Valdebenito-Sanhueza, 1991; Bettiol & Morandi, 2009).

O controle biológico consiste na redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada através de um ou mais organismos que não seja o homem (Cook & Baker, 1983). Este tipo de controle é realizado por meio de organismos antagonísticos que desenvolvem mecanismos de ação como antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesas do hospedeiro (Bettiol, 1991; Mello, 1998). O termo antagonista refere-se aos agentes biológicos que têm a capacidade de interferir nos processos vitais dos fitopatógenos, seja no solo ou na planta. Deste modo, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico.

Alguns microrganismos apresentam um grande potencial para utilização na agricultura como biocontroladores de doenças de plantas. Dentre eles, encontram-se algumas bactérias benéficas, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azospirillum* e *Serratia* (Oliveira et al., 2003).

2.3. Bactérias endofíticas

Como característica geral, as bactérias constituem um dos grupos mais diversos do planeta Terra e podem compreender mais de um milhão de espécies (Kennedy, 1999). Elas estão presentes em todos os ambientes terrestres e, por meio de sua atividade metabólica, afetam as propriedades químicas e físicas dos ambientes onde atuam.

As bactérias que vivem no interior das plantas podem ser divididas em dois grandes grupos com base na sua relação com o hospedeiro. As que vivem no interior das plantas podendo causar doenças, são chamadas de bactérias patogênicas. E as que vivem no interior das plantas sem causar danos visíveis, são chamadas de bactérias endofíticas. Tais microrganismos ocupam diferentes nichos

como as superfícies das raízes, folhas e caules, ou ainda colonizam o interior de diversos tecidos das plantas (Bacon & White Jr., 2000; Neto et al., 2002).

O termo endófito foi mencionado pela primeira vez no início do século XIX, para definir todos aqueles organismos que colonizam tecidos internos de plantas. Mas foi De Bary, em 1866, quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas (Azevedo, 1998).

Os endofíticos foram considerados assintomáticos, ou seja, sem produzir efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, até o final da década de 70. Porém, estudos posteriores revelaram propriedades de interesse, como proteção contra predadores e patógenos. Atualmente, atribuem-se outras características importantes a estes organismos, como o aumento da resistência a condições de estresse, alteração em propriedades fisiológicas, produção de fitormônios, toxinas, fármacos (como antibióticos), imunossupressores, antitumorais, e compostos de interesse biotecnológico, como enzimas (Azevedo, 1998; Strobel, 2003).

Os endofíticos bacterianos estão presentes em todas as espécies vegetais, permanecendo em estado de latência ou colonizando os tecidos de forma local ou sistêmica (Bacon & White Jr., 2000; Azevedo et al., 2000). Esses organismos penetram nos tecidos de plantas por meio de aberturas naturais ou provocadas por injúrias (Quadt-Hallmann et al., 1997). Como ocupam um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por fitopatógenos, as bactérias endofíticas apresentam um amplo potencial para o controle biológico (Azevedo et al., 2000; Coombs et al., 2004). Alguns isolados bacterianos são capazes de sintetizar metabólitos que inibem o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos. Esses metabólitos podem ser de natureza volátil ou não volátil, sendo que os primeiros têm a vantagem de serem ativos a baixas concentrações e têm maior facilidade de difusão no solo por meio de poros ou filmes d'água (Lobo Jr. & Abreu, 2000).

Juntamente com a indução de resistência à doença, a antibiose constitui um dos principais mecanismos de biocontrole. Mecanismo pelo qual metabólitos produzidos têm um efeito danoso ao patógeno, inibindo o crescimento ou inativando a célula por toxicidade química (Silveira, 2001). Entre os antibióticos com propriedades de biocontrole já bem caracterizados, podemos citar as fenazinas, pioluteorinas, pirrolnitrina, piocianina, 2,4-diacetilfloroglucinol e cianeto de hidrogênio (Ramamoorthy et al., 2001).

Muitas bactérias com potencial antagônico a fitopatógenos vêm sendo estudadas. Dentre elas, uma das espécies mais usadas é *Bacillus subtilis* (Bacon & White Jr., 2000). Além dessa, bactérias da família *Pseudomonaceae* também vêm sendo empregadas no controle biológico (Rajkumar et al., 2005).

A seleção de microrganismos antagônicos pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. A grande maioria dos trabalhos publicados abrange uma seleção inicial ensaiada em laboratório, para posteriormente testar *in vivo*, no campo ou em casa-de-vegetação, sob condições controladas (Mariano, 1993). Os benefícios advindos da utilização de bactérias endofíticas são conhecidos na literatura em diversas culturas, como o milho (Araújo et al., 2000), citros (Marcon, 2002), batata (Reiter et al., 2002), entre outras.

O conhecimento acerca da taxonomia do endofítico é um passo importante no processo de seleção para o biocontrole de fitopatógenos. Nesse sentido, e em virtude da dificuldade encontrada para identificar isolados bacterianos apenas por suas características fenotípicas, o emprego de técnicas moleculares baseadas em PCR permite de forma rápida e precisa, a classificação desses microrganismos.

O método de amplificação de ácidos nucléicos conhecido como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi concebido em 1983 por Kary Mullis (Saiki et al., 1985) e tornou-se uma das mais importantes inovações científicas das últimas décadas. O PCR utiliza uma DNA polimerase termoestável para produzir múltiplas cópias de regiões específicas do DNA, incluindo regiões não-codificadoras ou genes específicos. Os produtos obtidos após amplificação podem ser analisados através de eletroforese em gel de agarose, quanto ao tamanho do fragmento amplificado (Rosado & Duarte, 2002; Reis Júnior et al., 2002). Atualmente, o PCR tornou-se uma das técnicas mais simples e rápidas para a identificação e comparação de microrganismos. Estratégias variadas usando a técnica de PCR têm sido descritas e utilizadas para identificar genes que são característicos de uma espécie em particular, auxiliando na identificação dos microrganismos.

Diante dos possíveis benefícios alcançados pelo uso dos endófitos e a problemática sanitária da cultura do sisal, serão apresentados a seguir, estudos preliminares sobre as bactérias endofíticas e seus efeitos no sistema *A. sisalana* x *A. niger*.

3. METODOLOGIA

3.1. Isolamento e quantificação de bactérias endofíticas

Para a quantificação de bactérias endofíticas presentes em plantas de sisal, foi utilizado o método de diluição seriada seguido de plaqueamento em meio de cultura. Três mudas sadias e três doentes (com a podridão vermelha do caule), com idade aproximada de sete meses, foram coletadas no município de Barrocas - BA e levadas ao Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB.

As mudas foram seccionadas em raiz, caule e folha, onde 2 g de cada órgão foram processadas separadamente nas etapas seguintes. Após a desinfestação superficial dos órgãos em álcool 70 % por 3 min, NaOCl 1 % por 5 min e três lavagens em água destilada esterilizada, estes foram macerados com o auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, a partir das suspensões obtidas pelas macerações, foi realizada a diluição seriada (10^{-2} a 10^{-5}) em tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina (NaCl a 0,85 %) esterilizada. A seguir, foi realizado o semeio de 50 μ l em placas de Petri contendo meio TSA (Tryptona-soja-ágar), sendo o inóculo espalhado com o auxílio de alça de Drigalsky esterilizada. Foram plaqueadas três repetições para cada diluição de cada órgão doente e sadio.

As placas foram incubadas em B.O.D. a 25 ± 2 °C, e as populações bacterianas avaliadas após 72 horas. O cálculo das populações foi determinado pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) resultante da seguinte fórmula: UFC.g^{-1} de órgão vegetal = $(N \times F \times Y)/W$, onde: N = número de colônias, F = 20 (fator de correção do plaqueamento de 50 μ l para 1 ml), Y = fator de diluição da amostra e W = peso da massa seca do órgão. O esquema estatístico adotado foi o inteiramente casualizado em fatorial 2 x 3 (dois estados sintomatológicos – planta doente e planta sadia x três órgãos da planta – raiz, caule e folha). Para a análise estatística, os dados foram transformados em $\log(x + 1)$, em que x corresponde ao número de UFC. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000) para a realização da análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.2. Seleção *in vitro* de bactérias antagônicas a *Aspergillus niger*

Para a realização dos biotestes foram obtidos discos de caule de sisal com 1 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura, os quais foram desinfestados com álcool 70 % e NaOCl 1% e mantidos em um recipiente plástico contendo papel estéril umedecido. Cada disco foi inoculado com uma alíquota de 0,1 ml da suspensão de cada isolado bacteriano e após três horas, com uma alíquota contendo 10^7 conídios/ml de *A. niger*.

Para obtenção da suspensão bacteriana, os isolados crescidos em meio líquido TS (Tryptona-soja) por aproximadamente 12 h, foram centrifugados a 10.000 rpm por 3:30 min e ressuspensos por duas vezes em água destilada esterilizada. Cada suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{550}=0,05$. A suspensão fúngica foi obtida pela raspagem em placa de Petri dos esporos do fungo e posterior contagem em câmara de Neubauer.

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, cujos tratamentos foram: 497 isolados de bactérias endofíticas; um controle apenas com água esterilizada; e outro controle apenas com *A. niger*. Cada um dos tratamentos foi realizado com cinco repetições. Os experimentos foram divididos, sendo instalados com aproximadamente 40 isolados de bactérias por vez, devido a limitações de espaço. Após cinco dias de incubação em B.O.D. a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, o experimento foi avaliado utilizando-se uma escala de notas variando de 1 a 4 (Figura 3).

O isolado de *Aspergillus niger* utilizado nos experimentos foi obtido da região de Barrocas, BA.



Figura 3. Escala de notas utilizada nos experimentos *in vitro*. 1: Sem crescimento micelial e sem esporulação. 2: Apenas crescimento micelial. 3: Esporulação - metade do disco. 4: Esporulação – disco todo.

3.3. Bioteste *in vitro* com substâncias voláteis

O potencial de inibição do fungo *A. niger* por metabólitos voláteis produzidos pelos isolados bacterianos, foi avaliado por meio da contagem de esporos produzidos pelo patógeno em placa de Petri. Para tanto, um disco de 10 mm da cultura pura de *A. niger* crescida por 10 dias a 25 °C foi repicado para o centro de uma placa de Petri (diâmetro de 90 mm) contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar). Um antagonista bacteriano foi estriado no centro de outra placa de Petri de igual diâmetro contendo meio TSA (Tryptona-soja-ágar). As duas metades de placas de Petri foram unidas face a face, sem qualquer contato físico entre os microrganismos e então seladas com filme plástico, para evitar escape das substâncias voláteis. As placas foram incubadas em B.O.D. por 10 dias a 25 °C. Após o período de incubação, o experimento foi avaliado pela contagem de esporos extraídos das placas com o auxílio de alça de Drigalsky, 10 ml de água destilada esterilizada e duas gotas de Tween 20. Para a contagem de esporos foi utilizada uma câmara de Neubauer. Foram utilizados 9 isolados bacterianos na inibição de um isolado de *A. niger*. Tanto os isolados bacterianos, quanto o de *A. niger* utilizados são provenientes de plantas de sisal coletadas na região produtora de Barrocas, BA. Um tratamento controle foi adicionado ao experimento, onde uma placa de Petri contendo somente meio TSA foi sobreposta à placa contendo meio BDA e o disco fúngico. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos (nove isolados bacterianos e um tratamento controle). Os dados foram transformados em $\log(x + 1)$ e submetidos à análise de variância e teste de

média de Scott & Knott a 5 % de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR 4.0 (Ferreira, 2000).

3.4. Seleção de bactérias antagônicas a *A. niger* em casa-de-vegetação

Para o bioteste instalado em casa-de-vegetação, mudas de sisal foram inoculadas com isolados bacterianos e com o fungo *A. niger*.

No experimento, foram utilizados oito isolados bacterianos (BES05, BES100, BES105, BES126, BES127, BES130, BES142 e BES149) previamente selecionados em testes *in vitro* contra o fitopatógeno. Para obtenção da suspensão bacteriana, os isolados foram cultivados em erlenmeyers contendo 15 ml de meio líquido TS (Tryptona-soja) por 12 h à 25 °C sob agitação constante a 150 rpm. Dois mililitros de cada isolado foram coletados e centrifugados em tubos esterilizados a 10.000 rpm por 20 min. As células foram lavadas duas vezes com água destilada esterilizada por centrifugação (10.000 rpm durante 10 min.). A suspensão final foi padronizada em espectrofotômetro para $A_{550}=0,05$. A suspensão fúngica foi obtida de placas de Petri contendo esporos de *A. niger* crescido em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) por 10 dias a 25 °C. Os esporos foram coletados com a adição de 10 ml de água destilada esterilizada na placa e raspagem com auxílio de alça de Drigalsky. A concentração da suspensão foi ajustada para 10^7 conídios/ml em câmara de Neubauer.

Em casa-de-vegetação, ferimentos foram realizados no caule das mudas por meio de agulhas de seringa esterilizadas antes da inoculação dos microrganismos. Três horas após a inoculação com 200 µl da suspensão bacteriana de cada isolado, foram inoculados 200 µl da suspensão do fungo. Ambas as inoculações foram feitas sobre os ferimentos. Posteriormente, as mudas foram plantadas em sacos plásticos de poliestireno contendo solo não-esterilizado. O experimento foi realizado com 10 repetições para cada tratamento. Foram incluídos os tratamentos controle: inoculação apenas com água esterilizada (200 µl); e inoculação apenas com a suspensão do fungo (200 µl). Após 25 dias o experimento foi avaliado seguindo uma escala de notas de 0 a 4 (Figura 4).

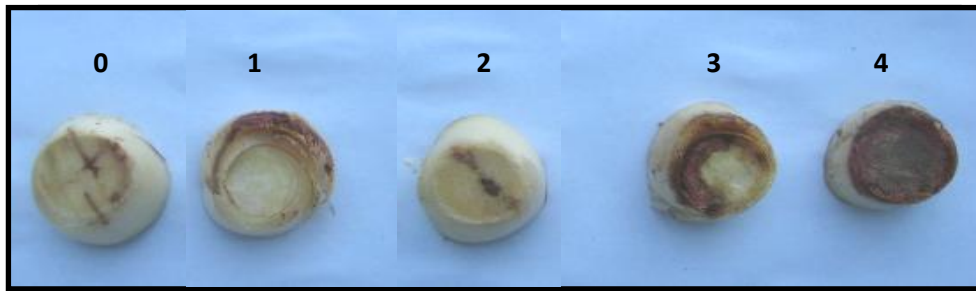


Figura 4. Escala de notas utilizada no experimento em casa-de-vegetação. 0: muda sem sintoma da doença. 1: muda com sintoma inicial apenas na bainha da folha externa. 2: muda com sintoma inicial no caule (coloração parda). 3: muda com sintoma avançado no caule (coloração vermelha). 4: muda morta.

Com os dados obtidos com a escala de notas, foi estabelecida a severidade e avaliou-se também a incidência de plantas doentes em cada tratamento.

3.5. Identificação molecular por meio de PCR

Este estudo foi realizado, com os 22 isolados selecionados como antagonistas a *A. niger* nos experimentos *in vitro*, sendo feito a identificação por PCR de dois gêneros: *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp.

Primeiramente, o DNA dos isolados de bactérias foi extraído de colônias cultivadas em meio TSA por 24 h. Colônias puras foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 1,5 ml contendo 100 µl de solução tampão de lise celular (0,05 M NaOH + 0,25 % SDS) e incubados em banho-maria por 15 minutos a 100 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi diluído 20 vezes em água MilliQ e utilizado nas reações de PCR.

Amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas pela técnica PCR. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM, (pH 8,3), MgCl₂ 2 mM, 200 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) [Promega], 20 pmol de *primer* (Sinapse), 1 U da Taq polimerase e 30 ng de DNA.

Para o gênero *Bacillus*, foi utilizado um par de *primers* específicos (WU et al., 2006): B-K1/F, 5'-TCACCAAGGCRACGATGCG-3' e B-K1/R1, 5'-CGTATTCACCGCGGCATG-3'. As amplificações foram efetuadas em termociclador PTC-100 (MJ Research), programado para o gênero *Bacillus* com a seguinte

seqüência de passos: 94 °C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, anelamento de *primers* a 63 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos. Após os 25 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72 °C e, finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C.

Para o gênero *Pseudomonas*, os primers utilizados foram (Johnsen et al., 1999): PSMg, 5'- CCTTCCTCCCAACTT-3' e 9-27, 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'. Para amplificações utilizando os *primers* específicos para o gênero *Pseudomonas* o termociclador foi programado da seguinte forma: 94 °C por 6 minutos, seguidos de 35 ciclos de 92 °C por 30 segundos, anelamento de *primers* a 52,5 °C por 30 segundos e extensão a 68 °C por 1 minuto. Depois dos 35 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 6 minutos a 68 °C e, finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C.

Os produtos das amplificações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 %. Após eletroforese, os geis foram fotografados em transiluminador de UV e fotodocumentados. A análise foi realizada pela presença de banda específica para cada gênero bacteriano: *Bacillus* sp. (1114 pb) e *Pseudomonas* sp. (445 pb).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e densidades populacionais

De um modo geral, a densidade de bactérias endofíticas em plantas de sisal variou de 10^4 a 10^6 UFC. A quantidade de bactérias no interior de plantas com a podridão vermelha do caule foi significativamente superior às presentes em plantas saudas ($P < 0,05$). O órgão que apresentou maior densidade bacteriana foi o caule, seguido pela raiz e folha, apresentando 10^6 , 10^5 e 10^4 UFC, respectivamente. Quando analisadas separadamente (Figura 5), não houve diferença significativa entre a população bacteriana encontrada no caule e na raiz de plantas saudas. Já em plantas doentes, a densidade de endofíticas no caule foi superior às presentes na raiz ($P < 0,05$). Em plantas saudas e doentes, a folha apresentou uma população inferior à população encontrada nos demais órgãos.

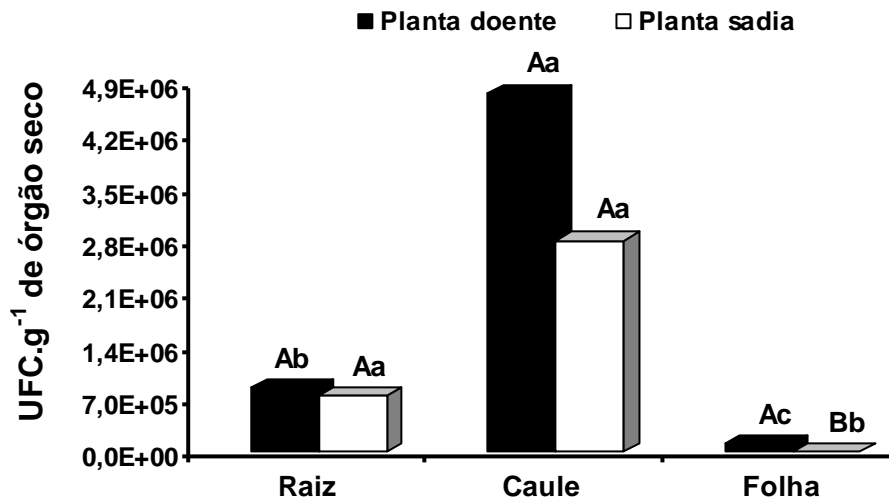


Figura 5. Densidade populacional de bactérias endofíticas em plantas de sisal. Barras seguidas de mesma letra maiúscula - dentro de cada órgão; e minúscula - dentro de cada estado sintomatológico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados deste estudo estão de acordo com os encontrados na literatura. Por exemplo, estudos realizados por Reiter et al. (2002), demonstraram que as populações de endofíticas isolados de caule de batata são diferentes quando se considera plantas saudias ou infectadas por patógenos. Em plantas de citros, Araújo et al. (2002), isolaram espécies de *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Enterobacter* spp., *Methylobacterium* spp. e *Xanthomonas* sp. Em plantas com sintomas da clorose variegada, a maior freqüência de espécies isoladas pertencia ao gênero *Methylobacterium*, enquanto que *Curtobacterium* sp. foi mais freqüentemente isolada de plantas assintomáticas. Tal fato sugere que este organismo exerce alguma função na resistência do citros àquela doença.

Segundo Krechel et al. (2002), as espécies bacterianas isoladas com maior freqüência, foram *Pantoea agglomerans* e *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pantoea agglomerans* é também citada como bactéria endofítica de milho e outras espécies de plantas (Quadt-Hallmann et al., 1997), enquanto *S. maltophilia* é um colonizador endofítico comum de batata (Garbeva et al., 2001).

4.2. Controle biológico *in vitro*

No processo de seleção dos isolados, foi observada inibição do fungo, variando de 0% a 100% (Figura 6). Dentre os 497 isolados testados, dez apresentaram 100% de inibição de *A. niger*, sendo considerados possíveis antagonistas. 14 isolados apresentaram 67,14% de inibição, 177 apresentaram 18,37% e 240 não inibiram *A. niger* (Figura 7).



Figura 6. Exemplo representativo de tratamentos do experimento com discos de sisal. A- suspensão do fungo e de isolado não antagônico; B-suspensão do fungo e de bactéria antagônica; e C-água esterilizada.

Esses resultados mostram o efeito antagônico de bactérias endofíticas e o potencial uso desses microrganismos como alternativa de controle. O controle biológico por bactérias endofíticas é evidenciado em diversos estudos na literatura. Em batata e trevo vermelho, Sturz et al. (1998) isolaram 25 espécies de bactérias endofíticas, de 18 gêneros, das quais 74% apresentaram antibiose *in vitro* ao fungo patogênico *Rhizoctonia solani*. Mukhopadhyay et al. (1996) isolaram bactérias endofíticas do arroz, que apresentaram forte atividade antifúngica contra *R. solani*, *Pythium myriotylum*, *Guamannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum*.

Krechel et al. (2002) analisaram *in vitro* o potencial antagônico de 440 isolados de bactérias endofíticas frente aos patógenos *Verticillium dahliae* e *Rhizoctonia solani*. Destes, nove isolados pertencentes a espécies de *Pseudomonas sp.* e *Streptomyces sp.* mostraram-se controladores tanto de *V. dahliae* como *R. solani*, sendo portanto considerados como agentes promissores de controle biológico.

Apesar dos estudos referentes ao controle de fitopatógenos com endofíticas, ainda se faz necessário um maior conhecimento a respeito de aspectos ecológicos,

genéticos e fisiológicos dessa interação antagônica.

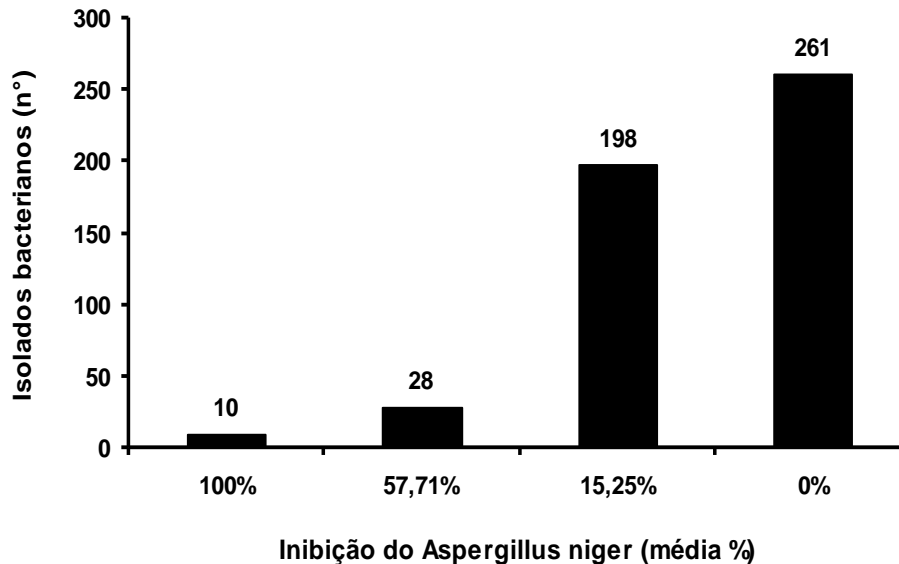


Figura 7. Controle biológico de *A. niger* por bactérias endofíticas em experimento *in vitro* com discos de sisal, tratados com suspensão bacteriana e fúngica.

No teste de controle por substâncias volatéis, todos os isolados testados foram capazes de inibir a esporulação de *A. niger* (Figura 8). A quantidade de esporos produzida pelo fungo quando em contato com os metabólitos dos isolados BES3, BES50 e BES130 foi inferior aos demais, apresentando diferença significativa ($P < 0,05$). A inibição da esporulação, em comparação com o tratamento controle (apenas *A. niger*), variou de 77,6% (BES142) a 96,8% (BES3).

Outros estudos reforçam o efeito antagônico das substâncias bacterianas voláteis no desenvolvimento de fitopatógenos. Por exemplo, Montealegre et al. (2003) estudaram o efeito inibitório de substâncias voláteis de duas espécies de *Bacillus* sp. sobre *Rhizoctonia solani*. Os autores observaram uma inibição de 20% a 45% no crescimento micelial do patógeno. Os metabólitos voláteis produzidos pelos isolados bacterianos testados parecem ser uma alternativa promissora para futuros estudos visando o controle da podridão vermelha do sisal.

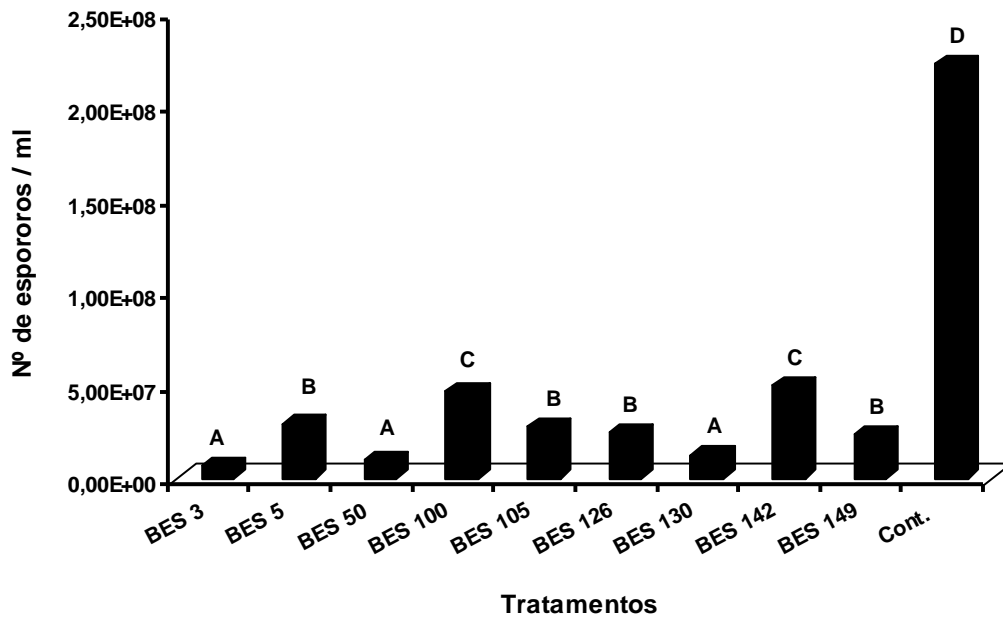


Figura 8. Efeito antagônico de substâncias voláteis produzidas por bactérias na esporulação de *A. niger*. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ($P < 0,05$).

4.3. Controle biológico *in vivo*

No experimento de casa-de-vegetação observou-se diferenças significativas entre os isolados de bactérias endofíticas. De acordo com os resultados, nenhuma das repetições do tratamento controle com água apresentou sintomas da doença. Houve 100 % de mortalidade nas mudas inoculadas somente com *A. niger*. A média de inibição da doença pelos isolados foi de 29,2 %, sendo que os isolados BES127 e BES05 apresentaram as maiores porcentagens de inibição, com 60,5 % e 57,9 %, respectivamente (figura 9).

Diversos estudos como este, mostram o potencial de bactérias endofíticas contra fitopatógenos em culturas de importância econômica. Coombs et al (2004) avaliaram a atividade antagonista *in vitro* e *in vivo* de 38 linhagens de actinobacteria endofíticas de cereais frente a fungos patogênicos ao trigo, observando que 64 % delas apresentaram atividade antifúngica *in vitro* e 17 *in vivo* contra os patógenos *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. Os autores destacam a importância destes microrganismos como agentes de controle biológico no campo, devido a sua capacidade de colonizar os tecidos internos da planta,

contrariamente aos demais agentes testados. Araújo et al. (2000) obtiveram 53 endofíticos a partir de folhas (31 isolados) e raízes (22 isolados) de milho. Os autores testaram a atividade antimicrobiana dos isolados contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*, e constataram inibição frente a todos os microrganismos avaliados.

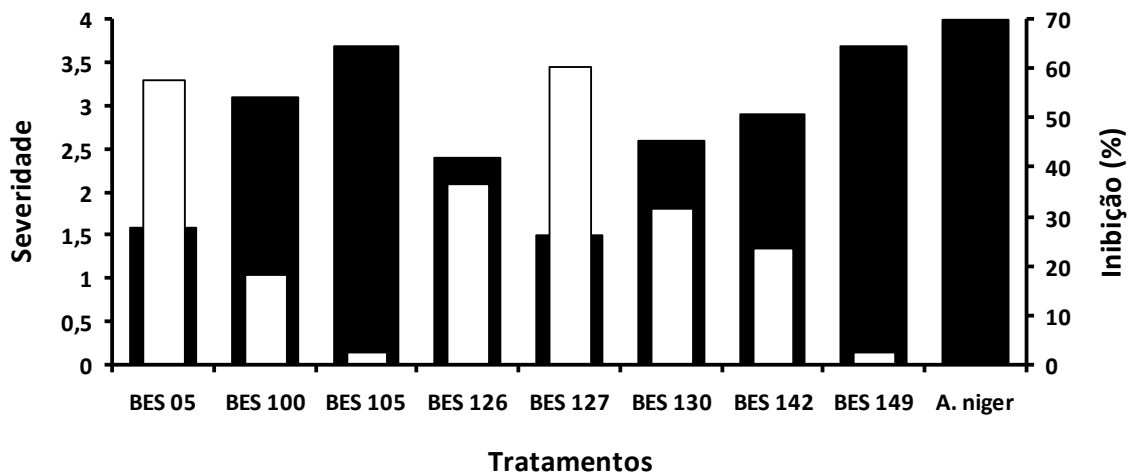


Figura 9. Controle da podridão vermelha do caule por bactérias endofíticas. A severidade da doença de acordo com a escala de notas (barra preta) e a inibição da doença pelos isolados bacterianos (barra branca) foi avaliada 25 dias após inoculação dos microrganismos.

4.4. Identificação dos isolados

Com a técnica de PCR, foi possível identificar oito isolados entre os 22 analisados, sendo três pertencentes ao gênero *Bacillus* e cinco ao gênero *Pseudomonas* (Figura 10). Este resultado confirma a presença destes dois gêneros entre as bactérias endofíticas do sisal com potencial de biocontrole de *A. niger*. Esses gêneros estão entre os mais comumente estudados como antagonista de fitopatógeno. Quanto aos demais isolados, estudos posteriores devem ser realizados para a devida identificação.

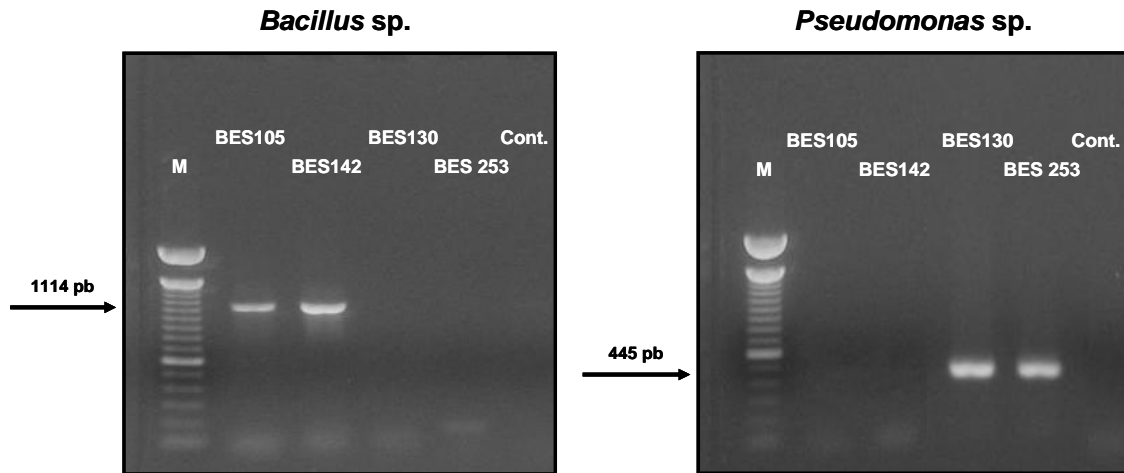


Figura 10. Identificação de bactérias por PCR. Bandas de alguns isolados bacterianos amplificados com primers específicos para os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são mostradas. As setas indicam as bandas características para cada gênero.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no presente trabalho são inéditos e importantes para o conhecimento da microbiota associada a cultura do sisal. Neste estudo, foi evidenciado os possíveis benefícios gerados com a utilização de alguns isolados endofíticos, tornando-se portanto uma alternativa promissora no que concerne a produção sustentável da cultura. Estudos posteriores devem ser realizados a fim de conhecer os mecanismos envolvidos na atividade inibitória desses isolados, além de determinar a eficiência dos isolados no campo.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. S.; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico socioeconômico da região nordestina produtora de sisal**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 75p., 2004.
- AMORIM NETO, M. DA S.; BELTRÃO, N. E. DE M. Clima e solo. In: Silva, O. R. R. F.; Beltrão, N. E. de M. (Org.). **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. 205p.
- ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycets from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brasilian Archeves of Biology and technology**, v.43, p.447-451, 2000.
- ARAÚJO, W. L. DE; MARCON, J.; MACCHERONI, W. JR; VAN ELSAS, J. D.; VANVUURDE, J. W.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.
- AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. de (Eds.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p.117- 137, 1998.
- 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. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, 2000.
- BACON, C. W.; WHITE JR. J. F. **Microbial endophyts**. New York: Marcel Dekker, 487p., 2000.
- BAKER, K. F. & COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco, W.H. Freeman, 1974. 433p.
- BETTIOL, W. **Componentes do Controle Biológico de Doenças de Plantas**. In: Bettiol, W. (Ed.) *Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Jaguariúna. Embrapa – CNPMA. p.1-5, 1991.
- BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção. In: Poltronieri, L. S. & Ishida, A. K. N. (Eds.) **Métodos alternativos de controle de insetos – pragas, Doenças e Plantas Daninhas: Panorama atual e perspectivas**. Belém. Embrapa Amazônia Oriental. p. 289 - 308, 2008.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP. Embrapa-CNPMA. 1º edição. p 341, 2009.
- BOCK, K. R. **Diseases of sisal**. *World Crops*, v.17, n.1, p.64-67, 1965.
- CONAB. **Sisal**. Disponível em <www.conab.gov.br/conabweb/.../sureg/.../Nota_tecnica_sisal2008.pdf> Acessado em 04 de Dezembro de 2009.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathology Society, 1983. 539p

COOMBS, J. T.; MICHELSEN, P. P.; FRANCO, C. M. M. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. **Biological Control**, v.29, p.359-366, 2004.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA, O. R. F.; SUINAGA, F. A. A. **Podridão do tronco do sisal**. Embrapa Algodão, Campina Grande, 4p. (Comunicado Técnico, 281), 2006.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. São Carlos, **Programas e Resumos...** São Carlos: UFSCar, v.45, p.255-258, 2000.

FOSTER, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. **Bragantia** v.10, p.139-148, 1950.

GARBEVA, P.; VAN OVERBECK, L. S.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN ELSAS, J. D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, v.43, p.369-383, 2001.

JOHNSEN, K.; ENGER, O.; JACOBSEN, C.S.; THIRUP, L.; TORSVIK, V. Quantitative Selective PCR of 16S Ribosomal DNA Correlates Well with Selective Agar Plating in Describing Population Dynamics of Indigenous *Pseudomonas* spp. in Soil Hot Spots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1786-1789, 1999.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, ecosystems and Environment**, v. 74, p.65-76, 1999.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plantparasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.772-786, 2002.

LOBO JR., M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.512-526, 2000.

MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de Citrus ssp. e interação com *Xylella fastidiosa***. 2002. 91p. Dissertação (Mestrado)- São Paulo, Universidade de São Paulo, 2002.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. I, p. 369-409, 1993.

MELLO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I. S.; Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, v.1, p.17-67, 1998.

MONTEALEGRE, J. R.; REYES, R.; PÉREZ, L. M.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOAIN, X. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.6, n.15, p.116-127, 2003.

MUKHOPADHYAY, N. K.; GARRISON, N. K.; HINTON, D. M.; BACON, C. W.; KHUSH, G. S.; PECK, H. D.; DATTA, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 134, p. 151-159, 1996.

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

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, V. M. ; MANFIO, G.P. Molecular approaches for the screening of novel enzymes. In: Jean-Louis Reymond. (Ed.). **Enzyme Assays: High-throughput screening, genetic selection and fingerprinting**. p.221-238, 2006.

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

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. Curitiba, 2006. 141 f. Dissertação (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Paraná.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 254-259, 1997.

RAJKUMAR, M.; LEE W. H.; LEE K. J. Screening of bacterial antagonists for biological control of Phytophthora blight of pepper. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 55-63, 2005.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, 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.

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

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2261-2268, 2002.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: **Genética e melhoramento de microrganismos**. MELLO, I. S. (ed). EdUSP, São Paulo, p.97-129, 2002.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, DC, v.230, p.1350-1354, 1985.

SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M.; CARTAXO, W.V.; SOFIATTI, V.; SILVA FILHO, J.L. CARVALHO, O.S.; COSTA, L.B. **Cultivo do sisal no nordeste brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 24p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 123), 2008.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimentos de plantas e biocontrole de doenças. In: Michereff, S. J.; Barros, R. (Eds.). **Proteção de plantas na Agricultura Sustentável**. Recife, UFRPE, 2001.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v. 5, p. 535-544, 2003.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G. Association of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.162-167, 1998.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M. **Cultivo de Sisal na Região Semi-Árida do Nordeste Brasileiro**. Embrapa Algodão, Campina Grande, 42p. (Sistema de Produção, 05), 2006.

VALDEBENITO–SANHUEZA, R. M. Possibilidades do controle biológico de *Phytophthora* em macieira. In: Bettiol, W. (Ed.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna. Embrapa – CNPMA, p.303-305, 1991.

WU, X.-Y.; WALKER, M. J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, p.107-119, 2006.