

Capítulo 18

Microrganismos Endofíticos como Agentes de Biocontrole da Ferrugem do Cafeeiro e de Promoção de Crescimento

Harllen S. A. Silva¹ & Wagner Bettiol^{2*}

¹Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, CP 007, 44380.000, Cruz das Almas, BA, Brasil, e-mail: harllen@cnpmf.embrapa.br. ²Embrapa Meio Ambiente, CP 69. 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail: bettiol@cnpma.embrapa.br. *Bolsista do CNPq.

Introdução

Os primeiros relatos da presença de fungos e bactérias no interior de tecidos de plantas datam do final do século XIX. Mundt & Hinkle (1976) citam que um pesquisador chamado Fernbach, em 1888, detectou a presença de células bacterianas no interior de tecidos de tomate, cenoura e beterraba açucareira. Segundo Vogl, citado por White Jr. *et al.* (1996), em 1898 foi detectado um fungo endofítico em sementes de *Lolium temulentum*.

Nas últimas duas décadas a pesquisa tem focado os benefícios que a aplicação dos endófitas nas plantas pode gerar, como o aumento na produção e redução da severidade de várias doenças. Considerada a potencialidade de organismos endofíticos como agentes de biocontrole e de promoção de crescimento de plantas, o interesse neste tipo de estudo aumentou consideravelmente. Também há estudos sobre a biodiversidade e plantas servindo como reservatório de material genético, abrigando microrganismos endofíticos (Bacon & White, 2000; Chen *et al.*, 1995; Clay, 1990; Kowalski & Sadlovski, 1993; McInroy & Kloepper, 1995a).

Conceitualmente, são considerados microrganismos endofíticos, incluindo bactérias e fungos, aqueles que colonizam os tecidos internos das plantas por todo seu ciclo de vida ou parte dele, e sem causar danos aparentes (Wilson, 1995). Os microrganismos endofíticos são originados de comunidades epifíticas da filosfera e da rizosfera, podendo ser encontrados não apenas nas partes aéreas dos vegetais, mas também em raízes que são sua principal porta de entrada (Beattie & Lindow, 1995; Adams & Kloepper, 1996; Dong *et al.*, 1994). Uma vez estabelecidos dentro dos tecidos, microrganismos endofíticos podem ser transmitidos pela propagação vegetativa da planta por sucessivas gerações (Dong *et al.*, 1994).

A capacidade desses microrganismos colonizarem os tecidos internos das plantas lhes confere uma vantagem ecológica sobre espécies que colonizam as plantas epifiticamente. Os tecidos internos das plantas proporcionam um ambiente com maior proteção para os endófitas, diferentemente da superfície, onde são expostos a variações ambientais extremas como temperatura, radiação ultravioleta e competição com outros microrganismos (Hallmann *et al.*, 1997).

É provável que toda planta, potencialmente, abrigue microrganismos endofíticos em seus tecidos. Desta íntima associação, muitas vezes mutualística, é que fez surgir a hipótese de que os endófitas podem exercer efeitos benéficos nos seus hospedeiros, como promoção de crescimento e controle de fitopatógenos.

Entre os microrganismos encontrados em associação endofítica com plantas, incluem-se fungos (Scharidl & Phillips, 1997), nematóides e micoplasmas (Hallmann *et al.*, 1997; Musson, 1994) entre outros. A maioria dos fungos endofíticos é biotrófico mutualista (Bacon *et al.*, 1997), e os mais comuns pertencem aos gêneros *Neotyphodium*, *Balansia*, *Epichloe* e *Myriogenospora*. Entretanto, as bactérias são as mais frequentes. De maneira geral, o grupo mais comum de bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais é composto pelos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Agrobacterium* (Hallmann *et al.*, 1997; Hallmann, 2001).

Os microrganismos endofíticos podem beneficiar as plantas diretamente, promovendo o crescimento e indiretamente, reduzindo a severidade do ataque de patógenos. Há vários mecanismos descritos sobre como endófitas promovem o crescimento dos vegetais que os abrigam. A fixação de N₂ atmosférico, a produção de fitormônios ou análogos e a disponibilização de nutrientes, como a solubilização de fósforo e a mineralização da matéria orgânica são exemplos clássicos na literatura. A atuação como agentes de biocontrole de fitopatógenos pode ser resultante de competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira (Scharidl & Phillips, 1997), produção de compostos antimicrobianos (Strobel, 2002) e indução de resistência sistêmica (van Loon *et al.*, 1998).

Considerando as características benéficas inerentes aos microrganismos endofíticos foram realizados trabalhos visando selecionar bactérias e/ou fungos endofíticos do cafeeiro com potencial de controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e de promoção de crescimento de mudas. Também foram realizados estudos para elucidar possíveis mecanismos de ação envolvidos, tanto no controle da ferrugem quanto na promoção de crescimento. Os endófitas que se destacaram nos ensaios foram identificados pela análise do perfil de ácidos graxos (MIDI Sherlock Versão 6.1, Método TSBA 50, Newark, D^C, USA) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de isolados endofíticos empregados nos ensaios.

Endófitas	Espécie
3F	<i>Brevibacillus choschinensis</i>
109G	<i>Bacillus megaterium</i>
115G	<i>Microbaterium testaceum</i>
116G	<i>Bacillus megaterium</i>
119G	<i>Cedecea davisae</i>
150G	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Prospecção de Microrganismos Endofíticos com Potencial para o Controle da Ferrugem do Cafeeiro

Um dos desafios para o uso de microrganismos endofíticos na agricultura como agentes de controle de doenças e promotores de crescimento e aumento da produção, talvez seja o de encontrar um endófito capaz de atuar consistentemente em condições de produção comercial. Segundo Chen *et al.* (1996), o número de microrganismos benéficos no planeta está em torno de 1 a 2 % do total da população. Em vista disso, a procura por tais microrganismos é árdua e requer que se trabalhe com grande número de indivíduos nos testes de seleção para aumentar as chances de sucesso. Faz-se necessário a realização de ensaios em condições controladas, que tornem possível a manipulação de grande número de isolados com dispêndio de pouco espaço físico (Guetskyl *et al.*, 2002). Nos estudos foram utilizadas bactérias e fungos endofíticos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental, da Embrapa Meio Ambiente, obtidos de folhas, raízes e galhos de *Coffea arabica* e *Coffea robusta*.

Em discos de folhas de café 'Mundo Novo' foram testados 234 isolados endofíticos (17 fungos e 217 bactérias) quanto à interferência na ferrugem do cafeeiro. O desempenho dos endófitas quanto ao controle da ferrugem em discos seguiu a distribuição normal, com a maioria dos isolados dentro da faixa que compreendeu 60% de controle até 120% de incremento da doença em relação à testemunha, ou seja, um número de isolados aumentou a predisposição dos discos ao ataque do patógeno. Alguns endófitas aumentaram a severidade da ferrugem em até 378% em relação à testemunha. Tal fato também foi constatado por Shiomi *et al.* (2006), que ao selecionar bactérias endofíticas para controle da ferrugem, encontrou isolados que predispunham os discos à ferrugem. Esses testes apontaram o isolado da bactéria endofítica 64R como o de melhor desempenho, proporcionando 100% de controle do patógeno, e o isolado 137G, com nível de controle de 97%, quando aplicados 24 e 72 h antes da inoculação do patógeno, respectivamente. Os isolados 3F, 14F, 36F, 109G, 115G, 116G e 119G proporcionaram satisfatórios índices de controle quando aplicados 72 e 24 h antes da inoculação do patógeno.

A aplicação antes do patógeno (24 e 72 h) garantiu aos antagonistas uma vantagem adaptativa de colonização tanto de forma endofítica quanto epifítica, uma vez que microrganismos endofíticos podem ter origem em comunidades epifíticas da filosfera (Beattie & Lindow, 1995; Dong *et al.*, 1994). Além disso, aumenta a possibilidade de ocorrer indução de resistência sistêmica por sensitivação dos tecidos, a competição por espaço e nutrientes na superfície do disco, a inibição da germinação dos uredíniosporos ou ainda lise de estruturas do patógeno. Isto indica porque poucos endófitas apresentaram bom desempenho nos intervalos onde foram aplicados concomitantemente ou após o patógeno, inclusive com nenhum diferindo da testemunha (Glick & Bashan, 1997).

Os isolados 116G, 123G, 36F, 137G, 14F, 109G, 115G, 3F e 119G de bactérias endofíticas selecionadas nos discos de folhas de cafeeiro foram testados em mudas de cafeeiro, em três intervalos de aplicação, 72 e 24 h antes do patógeno, e simultaneamente.

As mudas, após a aplicação dos endófitas e inoculação, foram mantidas em telado e procedeu-se à contagem do número de pústulas e “flecks” por folha aos 25 dias após a inoculação. Os melhores níveis de controle foram obtidos quando os antagonistas foram aplicados 72 h antes da inoculação de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*. Destacaram-se os isolados 137G, 14F, 109G, 115G, 3F e 119G, em ordem crescente de eficiência na redução dos sintomas da doença (Tabela 2). O isolado endofítico 3F confirmou sua característica de promissor agente de biocontrole da ferrugem proporcionando redução da severidade da ferrugem em torno de 85%. Adicionalmente, devem ser considerados os isolados 14F e 115G que proporcionaram bons índices de controle no teste em mudas de cafeeiro, assim como no teste em discos de folhas. Embora não tenha se destacado no teste anterior, a bactéria endofítica 119G foi a mais eficaz no teste em mudas, proporcionando o menor número de lesões por folha. Por outro lado, os isolados 116G e 36F anteriormente selecionados como bons agentes de controle da ferrugem, não repetiram os resultados.

Estes resultados podem ser explicados considerando as diferenças existentes entre os testes realizados com discos de folhas e em mudas, no que se refere às condições de ambiente em que os endófitas atuaram. Nos testes em discos de folhas as variáveis climáticas (luz, temperatura e umidade) foram controladas, o que facilitou o estabelecimento dos antagonistas. Já no ensaio com as mudas, a exposição às variações de temperatura e umidade, principalmente, foi um desafio a mais para as bactérias endofíticas colonizarem o filoplano e os tecidos internos.

Testes que buscam a seleção de agentes de biocontrole normalmente começam com centenas de isolados. O grande número de microrganismos testado torna a realização dos ensaios de seleção nas condições ecológicas de uso dos agentes de biocontrole operacionalmente inviável, em virtude dos custos de instalação, mão-de-obra, espaço e tempo (Weller *et al.*, 1985; Kloepper *et al.*, 1988). Deste modo, procura-se realizar a seleção por meio de bioensaios simplificados, em condições controladas, que minimizem as variações ambientais e que na maioria das vezes favorecem aos antagonistas (Whipps, 1997). Esta situação influencia diretamente na eficácia dos agentes de biocontrole em testes *in vivo*, o que pode explicar o fato da não reprodutibilidade de resultados dos isolados 116G e 36F, que selecionados nos testes em discos de folhas não repetiram a atuação no ensaio com mudas.

Tabela 2. Severidade da ferrugem do cafeeiro (número de lesões por folha) em mudas tratadas com bactérias endofíticas 72 e 24 h antes e simultaneamente à inoculação do patógeno.

Endófito	72 h antes	24 h antes	Simultaneamente
Controle	2,47 a*	2,21 a	2,56 ab
116G	1,41 ab	1,02 a	1,14 ab
123G	1,14 ab	3,31 a	2,03 ab
36F	1,02 ab	2,16 a	1,46 ab
137G	0,94 b	2,24 a	3,18 a
14F	0,91 b	3,24 a	2,57 ab
109G	0,84 b	0,60 a	2,08 ab
115G	0,77 b	1,73 a	2,58 ab
3F	0,39 b	2,67 a	1,25 ab
119G	0,27 b	1,48 a	2,08 ab

* Valores seguidos de mesma letra nas colunas não diferem pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$).

Apesar de reduções no número de lesões por folha ao se aplicar os endófitas 24 h antes e concomitante ao patógeno, não houve diferença entre os tratamentos e o controle (Tabela 2). Para alguns isolados de endófitas a severidade foi maior do que no tratamento controle.

Os melhores índices de controle foram obtidos quando os endófitas foram aplicados 72 h antes do patógeno. Este intervalo garantiu aos antagonistas uma vantagem de adaptação, pois houve tempo para a possível colonização epifítica, bem como dos sítios de infecção (Hallmann *et al.*, 1997). Uma vez na folha pré-colonizada com a bactéria endofítica, os uredíniosporos de *Hemileia vastatrix* tiveram primeiro que lidar com a presença de prováveis substâncias antimicrobianas secretadas com propriedades de inibir sua germinação. Ainda, se germinados, o fungo encontraria a competição por espaço e sítios de infecção, no caso os estômatos (Godoy *et al.*, 1997; Levy & Carmeli, 1995; Hallmann *et al.*, 1997).

Como verificado no teste em discos de folhas, alguns isolados bacterianos aumentaram a severidade da doença também em mudas, como é o caso dos isolados 123G, 14F, 3F e 137G, quando aplicados 24 h antes do patógeno, e dos isolados 137G, 115G e 14F quando aplicados concomitantemente ao patógeno. Há de se lembrar que a relação entre o endofítico e seu hospedeiro é variável podendo, por diversos fatores, deixar de ser simbiótica ou mutualística, se tornando saprofítica ou oportunística, nesse caso fitopatogênica, conforme revela Strobel & Daisy (2003). Da mesma forma que nos discos, apesar de se verificarem reduções no número de lesões por folha ao se aplicar os endófitas 24 h antes e concomitante ao patógeno em mudas, estatisticamente não houve diferença entre os isolados e a testemunha.

Para investigar a hipótese de indução de resistência sistêmica, foi realizado um ensaio para detecção do aumento da atividade de enzimas relacionadas à defesa da planta. Para isso, avaliaram-se os níveis de peroxidase (Hammerschmidt *et al.*, 1982), lipoxigenase (Axelrod *et al.* 1981) e fenilalanina amônia-liase (Pascholati *et al.* 1986), em mudas tratadas com os isolados 3F, 109G, 115G e 119G, aos sete dias após a inoculação do patógeno. As análises foram feitas em folhas diferentes daquelas onde o endófito e o patógeno foram aplicados, para avaliar se houve sistemicidade da indução de resistência. Houve aumento significativo da atividade de peroxidase em plantas tratadas com os isolados 3F e 119G. Não se detectaram aumentos nos níveis das outras enzimas, mesmo para os demais isolados (Silva *et al.*, 2008). A escolha de uma data fixa, sete dias após a inoculação, para a coleta do material vegetal e a análise da presença das enzimas pode ter contribuído para a não detecção do aumento da atividade de fenilalanina amônia-liase e lipoxigenase, e a favor da atividade da peroxidase. Bhattacharya & Ward (1988) reportam que na fase de estabelecimento de um patógeno nos tecidos do hospedeiro geralmente aumenta a atividade de fenilalanina amônia-liase. Ainda, segundo Podile & Laxmi (1998), os maiores níveis de atividade desta enzima acontecem em torno de 24 h após o início da infecção. Deste modo, não se descarta a possibilidade de ter havido picos de atividade de fenilalanina amônia-liase nos dois primeiros dias após a inoculação. Já o aumento da atividade de peroxidase geralmente está associado com estádios mais tardios do processo de infecção (Hammerschmidt *et al.*, 1982). Os resultados de atividade de peroxidase estão de acordo com o Podile & Laxmi (1998), que verificaram aumento nos níveis da enzima em plantas de ervilhaca tratadas com *Bacillus subtilis*, com ponto ótimo aos sete dias após inoculá-las com *Fusarium udum*.

A ausência de aumento significativo nos níveis enzimáticos para os isolados 109G e 115G sugere que tais isolados podem estar atuando contra a ferrugem por outros mecanismos de controle, tais como inibição da germinação dos uredíniosporos ou lise das estruturas do patógeno. Realizou-se então um teste de inibição da germinação dos uredíniosporos com os isolados 109G, 115G, 119G e 3F, em lâminas de microscopia, sendo observada redução significativa da germinação, comparados à testemunha (em torno de 40%). Provavelmente, a produção de substâncias antimicrobianas seja uma característica destes isolados, mas ainda precisa ser comprovado com testes adicionais.

Há vários relatos de bactérias endofíticas exercendo atividade inibitória contra fitopatógenos (Levy & Carmeli, 1995; Wilhelm *et al.*, 1998). Trabalhando com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 4 e a endófito *Burkholderia cepacia* isolada de aspargo, Pan *et al.* (1997) realizaram estudos por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Os autores observaram que a endófito colonizou a superfície de hifas e de macroconídios do patógeno, ocasionando deformação de micélio, com espessamentos terminais e intercalares em hifas. Existe a possibilidade de ter havido também esse efeito do isolado 3F sobre os uredíniosporos de ferrugem, além da produção de inibidores da germinação, uma vez que Shiomi *et al.* (2006) verificaram a ocorrência de deformações em tubos germinativos de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix* tratados com bactérias endofíticas.

Prospecção de Microrganismos Endofíticos com Potencial para Promoção do Crescimento de Mudanças de Cafeeiro

Os mesmos endófitas empregados nos ensaios de controle da ferrugem foram testados quanto à capacidade de promoverem o crescimento de mudas de cafeeiro. Para isso, sementes de cafeeiro (cv. Mundo Novo) foram microbiolizadas por 24 h com suspensão de propágulos dos microrganismos endofíticos em fase exponencial de crescimento e a seguir semeadas em sacos plásticos (0,5 l) contendo solo não esterilizado, que permaneceram em telado por 180 dias. Transcorrido esse período foram determinados a altura das plantas, número de folhas e peso da matéria seca do sistema radicular e da parte aérea.

Do total de isolados testados, 109 endófitas proporcionaram índices de promoção de crescimento superiores à testemunha. Porém, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott seis isolados de bactérias endofíticas (85G, 161G, 163G, 160G, 150G e 109G) diferiram da testemunha. Os demais isolados testados não demonstraram características de promoção de crescimento e alguns inibiram o crescimento. Isso pode ser explicado pelo fato que bactérias endofíticas podem estimular o crescimento de plantas em um estágio de desenvolvimento e inibir em outro (Sturz *et al.*, 2000).

Bactérias endofíticas têm sido associadas à promoção de crescimento em diversas culturas não perenes, como tomate, alface, batata e milho (Bashan *et al.*, 1989; Frommel *et al.*, 1991; Hinton & Bacon, 1995). Raros são os trabalhos envolvendo endofítia e promoção de crescimento em plantas perenes, particularmente em cafeeiro. Porém, alguns pesquisadores afirmam que endófitas podem atuar como eficientes microrganismos promotores de crescimento, talvez de modo semelhante às rizobactérias como pela produção de hormônios e fatores de crescimento (Musson, 1994).

Neste caso deve-se considerar que os microrganismos endofíticos foram aplicados por tratamento de sementes. O processo de germinação libera grandes quantidades de metabólitos na forma de exsudatos e, desta forma, os microrganismos aplicados na semente têm oportunidade de serem os primeiros a utilizar estes substratos e com isso aumentam suas chances de estabelecimento (Stirling, 1991). Porém, sementes de cafeeiro têm germinação lenta, 30-40 dias geralmente, o que faz com que a liberação das substâncias que serviriam como fonte de carbono e nitrogênio para os endófitas seja lenta. Além disso, precisa ser considerado que microrganismos endofíticos ocupam um nicho bastante específico e não se estabelecem facilmente na rizosfera (Hallmann *et al.*, 1997). Estes podem ter sido os maiores obstáculos para as bactérias endofíticas testadas, o que explicaria o baixo número de isolados eficientes na promoção do crescimento.

Na tentativa de elucidar os mecanismos de promoção de crescimento envolvidos, os isolados 85G, 161G, 163G, 160G, 150G e 109G, que se destacaram como promotores do crescimento, foram analisados quanto à capacidade *in vitro* de produzirem fosfatase, sideróforos, ácido indol acético (AIA), citocininas e giberelinas (Cattelan, 1999). Todos os isolados apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos testes, exceção feita ao 150G (Tabela 3). O destaque foi o isolado 85G, capaz de produzir sideróforos e ácido indol acético. Essa característica faz desse isolado promissor para aplicação tanto no sistema radicular quanto na parte aérea, uma vez que a produção de sideróforos disponibilizaria ferro para as raízes, enquanto o ácido indol acético atuaria diretamente na parte aérea.

Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas por microrganismos endófitas e também habitantes da rizosfera ou epifíticos são discutidos por Frommel *et al.* (1991); Kloepper *et al.* (1991) e Holland (1997). Além dos mecanismos estudados neste trabalho, a literatura inclui a mineralização da matéria orgânica do solo, alteração na permeabilidade das raízes, fixação de nitrogênio atmosférico e o próprio efeito indireto de estímulo ao crescimento pelo biocontrole de pragas e doenças (Sumner, 1990; Kloepper, 1993; Glick & Bashan, 1997). É possível que o isolado 150G esteja atuando por um destes mecanismos que não foram estudados.

Embora isoladas de galhos de cafeeiro, ou seja, da parte aérea, as endófitas 85G, 163G, 160G e 161G produziram sideróforo e fosfatase, respectivamente, substâncias que teoricamente teriam maior utilidade num ambiente de rizosfera. Está envolvida nesta questão a origem dos microrganismos colonizando os vegetais. Se endófitas colonizam tecidos internos de plantas vivas, neles se multiplicando e sobrevivendo, por alguma via a penetração ocorreu, seja uma abertura natural ou um ferimento.

Tabela 3. Mecanismos de promoção de crescimento dos endófitas selecionados.

Endófitas	Fosfatase	Sideróforo	AIA	Citoínina/Giberelina
85G	-	+	+	-
161G	+	-	-	-
163G	-	+	-	-
160G	+	-	-	-
150G	-	-	-	-
109G	-	-	+	-

A maioria dos trabalhos reporta a rizosfera como a principal fonte de microrganismos endofíticos (Verma *et al.*, 2001; McInroy & Kloepper, 1995b; Shishido *et al.*, 1999). Isso foi confirmado pelo trabalho de De Boer & Copeman (1974) que plantaram mudas axênicas de batata no campo e isolaram espécies saprófitas delas após algumas semanas. Segundo Hinton & Bacon (1995), o caminho mais lógico para a colonização dos tecidos por microrganismos endófitas parece começar com a migração da bactéria ou fungo para locais onde sementes estejam germinando ou raízes crescendo. Isso pode explicar a presença nas bactérias da característica de produção de enzimas de degradação de fosfatos e moléculas quelantes de ferro.

Estudos de outros mecanismos de promoção de crescimento, como os citados, poderiam aumentar o conhecimento sobre a capacidade das bactérias endofíticas selecionadas em promover o crescimento de mudas de café.

Considerações Finais

Os estudos futuros com microrganismos endofíticos para fins agronômicos devem focar principalmente a parte ecológica e interações com outros microrganismos, aplicação dos endófitas e/ou movimento nos tecidos das plantas. A literatura reporta que endófitas não atuam sozinhas ou apenas ao nível de seu hospedeiro, e sim numa complexa rede de interações com a microbiota nativa e com o metabolismo vegetal. Embora estudados separadamente neste trabalho, nada impede que os mecanismos de controle possam atuar simultaneamente, aumentando a capacidade de controle do endófitas.

O emprego de misturas de isolados benéficos é outro ponto pouco explorado, mesmo porque pesquisas com endófitas são relativamente recentes. Desenvolvimento de formulações contendo microrganismos endofíticos como agentes ativos de controle de doenças e/ou promoção de crescimento é outro ponto a ser buscado. Isso facilitaria a integração do uso destes agentes na rotina agrícola.

Com relação à seleção realizada, constatou-se que não houve correspondência entre os melhores isolados com características de promoção de crescimento e os isolados mais promissores como agentes de biocontrole da ferrugem. Tais resultados fornecem subsídio experimental ao conceito estabelecido por Bashan & Holguin (1997) de que a promoção de crescimento e o controle de patógenos em

plantas podem não ser características simultâneas de um mesmo antagonista. Lazarovits & Nowak (1997) levantam as possibilidades de insucessos em programas de seleção de antagonistas com base somente em um critério desejável.

Talvez a principal questão para o emprego de microrganismos endófitas para fins agrônômicos, depois de se ter o isolado selecionado, implica em como dispensá-los na planta, de forma que penetrem e se estabeleçam nos tecidos. Métodos práticos e confiáveis devem ser desenvolvidos, sendo que os utilizados para aplicação de inoculantes microbianos na rizosfera e filosfera podem ser válidos para endófitas (Andrews, 1992).

Referências

- Adams, P.D.; Klopper, J.W. Seed-borne bacterial endophytes in different cotton cultivars. *Phytopathology* 86: S97. 1996. (Abstract).
- Andrews, J.H. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603-635. 1992.
- Axelrod, B.; Cheesbrough, T.M. & Laakso, S. Lipoygenase from soybean. *Methods in Enzymology* 71: 441-451. 1981.
- Bacon, C.W. & White Jr., J.F. *Microbial Endophytes*. New York. Marcel Dekker. 2000.
- Bacon, C.W.; Richardson, M.D. & White Jr., J.F. Modification and uses of endophytic-enhanced turfgrasses: a role for molecular technology. *Crop Science* 37: 1415-1425. 1997.
- Bashan, Y. & Holguin, G. *Azospirillum* - Plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology* 139: 103-121. 1997.
- Bashan, Y.; Ream, Y.; Levany, H. & Sade, A. Non-specific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany* 67: 1317-1324. 1989.
- Beattie, G.A. & Lindow, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology* 33: 145-172. 1995.
- Bhattacharya, M.K. & Ward, E.W.B. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean hypocotyls and leaves following infection with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Canadian Journal of Botany* 66: 18-23. 1988.
- Cameron, H.R. Pseudomonas content of cherry trees. *Phytopathology* 60: 1343-1346. 1970.
- Cattellan, A.J. Métodos Quantitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Londrina. Embrapa Soja. 1999.
- Chen, C.; Bauske, E.M.; Musson, G.; Rodriguez-Kabana, R. & Klopper, J.W. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control* 5: 83-91. 1995.
- Chen, Y.; Mei, R.; Liu, L. & Klopper, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: Utkhede, R.S. & Gupta, V.K. (Ed.) *Management of soil born diseases*. Ludhiana. Kalyani Publishers. 1996. pp. 165-184.
- Clay, K. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 275-295. 1990.
- De Boer, S.H. & Coperman, R.J. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot disease. *Canadian Journal of Plant Science* 54: 115-122. 1974.
- Dong, Z.; Canny, M.J.; McCully, M.E.; Roboredo, M.R.; Cabadilla, C.F.; Ortega, E. & Rodés, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiology* 105: 1139-1147. 1994.
- El-Abyad, M. S.; El-Sayed, M. A.; El-Shanshoury, A. R. & El-Sabbagh, S. M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant and Soil* 149: 185-195. 1993.
- Frommel, M.I.; Nowak, J. & Lazarovits, G.; Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology* 96: 928-936. 1991.

- Glick, B.R. & Bashan, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances* 15: 353-378. 1997.
- Godoy, C.V.; Bergamin Filho, A. & Salgado, C.L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: Kimati, H. (Ed.) Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas e seu controle, v.2. 3ª. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. pp.184-200.
- Guetskyl, R.; Shtienberg, D.; Dinor, A. & Elad, Y. Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillemontii* and *Bacillus mycodides* applied as a mixture on strawberry plants. *Biocontrol Science and Technology* 12: 705-714. 2002.
- Hallmann, J. Plant interactions with endophytic bacteria. In: Jeger, M.J. & Spencer, N.J. Biotic interactions in plant pathogen associations. CAB. p.87-120. 2001.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W.F. & Kloepper, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914. 1997.
- Hammerschmidt, R.; Nuckles, E. & Kuc, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology* 20: 73-80. 1982.
- Hinton, D.M. & Bacon, C.E. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia* 129: 117-125. 1995.
- Holland, M.A. Occam's razor applied to hormonology. Are cytokinins produced by plants? *Plant Physiology* 115: 865-868. 1997.
- Kloepper, J.W. Plant growth promotion rhizobacteria as biological control agents. In: Meeting Jr., F.B. (Ed.) Soil microbial ecology: Applications in agricultural and environmental management. New York. Academic Press. 1993. pp. 255-274.
- Kloepper, J.W.; Zablotowicz, R.M.; Tipping, E.M. & Lifshitz, R. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Metting, B.; Dekker, M. & Cregan, P. B. (Eds.) The rhizosphere and plant growth. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1991. pp. 315-326.
- Kloepper, J.W.; Lifshitz, R. & Schroth, M.N. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Science: Animal Plant Science. 1988. pp. 60-64.
- Kowalski, T. & Sadlowski, W. Endophytic fungi II. Their importance for plants and possibilities of use. *Sylwan* 137: 9-15. 1993.
- Lazarovits, G. & Nowak, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *HortScience* 32: 188-192. 1997.
- Leben, C. How plant pathogens survive. *Plant Disease* 65: 633-637. 1981.
- Levy, E. & Carmeli, S. Biological control of plant pathology by antibiotic-producing bacteria. Allelopathy, organisms, process and applications. Washington, DC. American Chemical Society. 1995. pp. 300-309.
- McInroy, J.A. & Kloepper, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173: 337-342. 1995a.
- McInroy, J.A. & Kloepper, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 895-901. 1995b.
- Mundt, J.O. & Hinkle, N.F. Bacteria within ovules and seeds. *Applied and Environmental Microbiology* 32: 694-698. 1976.
- Musson, G. Ecology and effects of endophytic bacteria in plants. Master Dissertation. Auburn. Auburn University. 1994.
- Pan, M.J.; Rademan, S.; Kunert, K. & Hastings, J.W. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 by the endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopathology* 45: 479-486. 1997.
- Pascholati, S.F.; Nicholson, R.L. & Butler, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. *Journal of Phytopathology* 115: 165-172. 1986.
- Podile, A.R. & Laxmi, V.D.V. Seed factorization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonia-lyase and reduces the incidence of Filarial wilt in pigeon pea. *Journal of Phytopathology* 146: 255-259. 1998.
- Schardl, C.L. & Phillips, T.D. Protective grass endophytes. Where are they from and where are they going? *Plant Disease* 81: 430-438. 1997.
- Shiomi, H.F.; Silva, H.S.A.; Melo, I.S.; Nunes, F.V. & Bettioli, W. Bioprospecting bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola* 63: 32-39. 2006.
- Shishido, M.; Breuil, C. & Chanway, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 191-196. 1999.

- Silva, H.S.A.; Terrasan, C.R.F.; Tozzi, J.P.L.; Melo, I.S. & Bettiol, W. Bactérias endofíticas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). *Tropical Plant Pathology* 33: 49-54. 2008.
- Stirling, G.R. Mass production and release of biological control agents. In: Stirling, G.R. *Biological control of plant parasitic nematodes - Progress, problems and prospects*. Redwood Press. Mekshom. 1991. pp. 125-165.
- Strobel, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology* 22: 315-333. 2002.
- Strobel, G.A. & Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 491-502. 2003.
- Sturz, A.V. & Nowak, J. Endophytic communities of rhizobacteria and strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology* 15: 183-190. 2000.
- Sumner, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Advances in Soil Science* 12: 53-123. 1990.
- van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483. 1998.
- 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* 91: 127-141. 2001.
- Weller, D.M.; Zhang, B.X. & Cook, R.J. Application of a rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. *Plant Disease* 69: 710-713. 1985.
- Whipps, J.M. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26: 1-134. 1997.
- 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* 88: 174-178. 1996.
- Whitesides, S.K. & Spotts, R.A. Frequency, distribution and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathology* 81: 453-457. 1991.
- Wilhelm, E.; Arthofer, W.; Schafleitner, R. & Krebs, B. *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 105-108. 1998.
- Wilson, D. Endophyte - the evolution of a term, and classification of its use and definition. *Oikos* 73: 274-276. 1995.