

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

**ATIVIDADE ANTAGÔNICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS**  
**ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE DIFERENTES CULTIVARES DE *Musa* spp.**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Manaus  
Estado do Amazonas – BRASIL  
Junho - 2012

**ATIVIDADE ANTAGÔNICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS  
ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE DIFERENTES CULTIVARES DE *Musa* spp.**

Orientador: Prof. Dr. **Aldo Rodrigues de Lima  
Procópio**

Co-orientador: Dr. **Gilvan Ferreira da Silva**

**Átila de Souza**

Biólogo

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Manaus

Estado do Amazonas – BRASIL

Junho - 2012

*Dedico essa dissertação aos meus Pais.*

## AGRADEÇO

Primeiramente a Deus, pois sem ele nada sou!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aldo Rodrigues de Lima Procópio pela oportunidade de orientação.

Ao meu co-orientador Dr. Gilvan Ferreira da Silva pelas sugestões e contribuições oferecidas cooperando para o desenvolvimento desse trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Nelcimar Reis de Sousa pelas sugestões e contribuições oferecidas, as quais sem dúvidas enriqueceram o trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Paula Ângelo pelas contribuições oferecidas.

À EMBRAPA Amazônia Ocidental, pela infraestrutura.

Ao Jeferson Cruz pelo apoio técnico e científico.

Aos professores de Mestrados em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, que contribuíram para a minha formação.

Aos meus amigos de turma da Pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa, Sandra, Lucas, Vaneza, Édil, Rodrigo, Ana Mara, Elizângela, Joelma, Gilvana, Viviane, Igor, Maysa, Raquel e Flávia.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, Karina, Ricardo e Ingrid.

Aos meus pais, Jose de Souza e Maria Zélia de Souza, por terem me ensinado a buscar meus ideais e pelo esforço e compreensão pela distância de todos esses anos que dediquei aos estudos.

À minha amiga Antônia Natália pelo apoio e companheirismo.

Aos meus amigos e familiares pelo carinho, compreensão e incentivo nesse período, mesmo ausentes para alguns. Sobretudo pelos exemplos de dedicação e respeito.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de mestrado.

Obrigado!

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	II
INTRODUÇÃO	11
1 REFERÊNCIAL TEÓRICO	13
1.1 Produção de banana	13
1.2 Micro-organismo Endofíticos	14
1.3 Marcadores Moleculares	16
1.4 Controle Biológico	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Material Vegetal	19
3.2 Desinfecção de Superfícies	20
3.3 Isolamento Bacteriano	20
3.4 Teste de Antagonismo	20
3.5 Extração de DNA	21
3.6 PCR( Reação em Cadeia da Polimerase)	21
3.6.1 Reação com ERIC-PCR	21
3.6.2 Reação com BOX-PCR	21
3.7 Análise de Dados	22
3.7.1 Antagonismo	22
3.7.2 Diversidade Genética	22
4 RESULTADOS	22
4.1 Isolamento de Bactérias Endofíticas	22
4.2 Teste de Antagonismo <i>in vitro</i>	23
4.3 Caracterização da Diversidade por ERIC-PCR	26
4.4 Caracterização da Diversidade por BOX-PCR	29
5 DISCUSSÃO	32
5.1 Triagem e Atividade Antagônica	32

5.2	Diversidade Genética	33
6	CONCLUSÃO	3
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	3

## FIGURAS

- 1 Teste de atividade antagônica *in vitro* de bactérias endofíticas à *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **A** e **D**. Controle, **B**. Isolados M5, **C**. Isolados M28. **E**. Isolados SM28 **F**. Isolados RP6. 24
- 2 Teste de antagonismo *in vitro* de bactérias endofíticas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em confronto direto. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,01\%$ ). M5, M10, M28: isolados da cultivar Maçã, e PS6 isolado da cultivar Pisangue Seilão. 25
- 3 Teste de atividade antagônica *in vitro* de bactérias endofíticas contra *Colletotrichum* sp.; **A** e **D** Controles **B** isolado M5, **C**. isolado M10 **E** isolado M28 **F**. isolado PS6. 25
- 4 Teste de antagonismo *in vitro* de bactérias endofíticas contra *Colletotrichum* sp. em confronto direto. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,01\%$ ). M5, M10, M28: isolados da cultivar Maçã, e PS6 isolado da cultivar Pisangue Seilão. 26
- 5 Em **A**. Perfil de bandas gerado por BOX-PCR. **B**. Perfil de bandas gerado por ERIC-PCR, onde M representa Marcador 1Kb Plus DNA Lander Fermentas e os números de 01 á 10 corresponde aos isolados M10, M16, BRS 10B, BRS10A, PS11, PS6A, P2A, P15B, FH1A, e FH8 respectivamente. 27
- 6 Dendograma de similaridade calculado por meio do Coeficiente de Dice e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA com base nos dados de ERIC-PCR dos 122 isolados endofíticos de diferentes cultivares de *Musa* spp. 28
- 7 Dendograma de similaridade calculado por meio do Coeficiente de Dice e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA com base nos dados de BOX-PCR dos 122 isolados endofíticos de diferentes cultivares de *Musa* spp. 30

- 8 Dendograma de similaridade calculado por meio do Coeficiente de Dice e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA com base nos dados de ERIC-PCR e BOX-PCR dos 122 isolados endofíticos de diferentes cultivares de *Musa* spp., com ponto de corte de 60% de similaridade para formação de OTUs. 31

## RESUMO

Bactérias endofíticas foram isoladas de tecido foliar de cinco diferentes cultivares de bananeiras: Maçã, Pacovan, FHIA 18, BRS Conquista e Pisangue Seilão, foram analisadas quanto a diversidade genética e potencial para biocontrole de fungos fitopatogenicos. Das 122 bactérias endofíticas analisadas, três bactérias isoladas da cultivar Maçã e uma de Pisangue Seilão apresentaram atividade antagônica *in vitro* contra *Colletotrichum* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. A análise da diversidade genética foi realizada utilizando as técnicas de ERIC e BOX-PCR a partir das quais foram obtidas 35 e 26 bandas polimórficas respectivamente. A similaridade obtido pelo Coeficiente de Dice variou entre 1% a 100% para ERIC e de 0.6% a 100 % para BOX. Ambos marcadores permitiram a formação de seis grupos, onde os subgrupos foram formados por isolados da mesmo cultivar demonstrando que ambos marcadores foram capazes de correlacionar os isolados ao hospedeiro. Utilizando 60% de similaridade como critério para formação de OTUs (Operational Taxonomic Units) foram obtidas 64 possíveis OTUs, indicando um grande número de espécies em potencial. Os dados também indicam que nenhuma OTU foi compartilhada entre as cultivares o que sugere uma possível preferência por hospedeiro.

Palavras-chaves: Endofíticos, Operational Taxonomic Units (OTU), controle biológico, ERIC-PCR, BOX-PCR.

## ABSTRACT

Endophytic bacteria isolated from leaf tissue of five different cultivars of banana: Maçã, Pacovan, FHIA 18, BRS Conquista and Pisangue Seilão, were considered as the genetic diversity and potential for biocontrol of fitopatogenics fungi. Of the 122 endophytics bacteria analyzed, three bacteria isolated, of Maçã cultivar and one of Pisangue Seilão submitted in vitro antagonistic activity against *Colletotrichum* sp. and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (FOC). Genetic diversity analysis was conducted using the techniques of ERIC and BOX-PCR from which were obtained 35 and 26 polymorphic bands respectively. The similarity obtained by Dice coefficient varied from 1% to 100% for ERIC and 0.6% to 100% for BOX. Both markers allowed the formation of six groups, where the subgroups were composed of isolated from cultivar, demonstrating that both markers were able to correlate the isolates to the host. Using 60% of similarity as a criterion for formation of OTUs (Operational Taxonomic Units) were obtained 64 possible OTUs, indicating a large number of potential species. The data also indicate that no OTU was shared among the cultivars, which suggests a possible preference for host.

## INTRODUÇÃO

Os micro-organismos endofíticos são organismos presentes nos tecidos das plantas sem causar quaisquer danos e sem produzir estruturas externas emergidas dos tecidos dos vegetais (YATES et al., 1997; AZEVEDO et al., 2007). Em geral, os micro-organismos endofíticos são representados por fungos, bactérias e actinomicetos que desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta com o meio ambiente (MENDES e AZEVEDO, 2007).

As plantas são consideradas microecossistemas complexos, onde diferentes nichos podem ser explorados por uma extensa variedade de micro-organismos, dentre estes os micro-organismos endofíticos (AZEVEDO et al., 2000). Estudos sobre interação planta/micro-organismos e sobre o entendimento das diferentes funções destes no interior das plantas mostram um grande número de aplicações no controle biológico de inúmeras doenças (ZHENG et al., 2011; CEBALLOS et al. 2012), na promoção de crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; COOMBS et al., 2004; HALLMANN e BERG, 2006; RYAN et al., 2008; MONTAÑEZ et al., 2012) e na biorremediação de ambientes contaminados (NEWMAN e REYNOLDS, 2005; GERMAINE et al., 2009; WEYENS et al., 2009; MA et al., 2011).

Os micro-organismos endofíticos podem ser utilizados também como alternativa ao uso de fertilizantes e de pesticidas químicos, não somente devido ao menor custo, mas também por contribuir com um sistema agrícola sustentável (ZINNIEL et al., 2002). Além disto, os endofíticos são atualmente considerados como fontes ricas de novos compostos naturais, com amplo espectro de atividades biológicas e elevado nível de diversidade estrutural (PIMENTEL et al., 2011). Logo representam uma porta para a descoberta de novas drogas e proteínas de alto valor biotecnológico agregado, como as actinobactérias endofíticas associada a plantas medicinais, especialmente dos trópicos, que são consideradas uma fonte rica de metabólitos funcionais (STROBEL et al., 2004).

Os micro-organismos endofíticos foram isolados de diferentes partes dos vegetais como: raízes, caules, nódulos, folhas e frutos em uma gama de variedades de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como cana-de-açúcar (LIRA-CADETE et al., 2012), milho (ARAUJO et al., 2000), videira (BELL et al., 1995), algodão (QUADT-HALLMANN et al., 1997), arroz (STOLZFUS et al., 1997), tomate (PILLAY e NOWAK, 1997), batata (REITER et al., 2003), trigo e sorgo (ZINNIEL et al., 2002).

Em bananeira pelo menos 20 gêneros de bactérias endofíticas, cultiváveis e não cultiváveis, foram identificadas na cultivar Grand Naine (THOMAS et al., 2008). Também foi verificado que a comunidade de bactérias endofíticas antagonista aumentou em relação ao controle quando o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) foi inoculado, indicando que bactérias endofíticas antagônicas podem ser induzidas pela presença do patógeno (LIAN et al., 2008).

Entre as ferramentas moleculares utilizados para análise da diversidade de endofíticos, destacam-se os marcadores baseados em sequencias repetitivas tais como ERIC e BOX. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) são encontrados em uma gama de enterobactérias e são prováveis transposons não autônomos denominados MITEs (Miniature Inverted Transposable Elements) (DE GREGORIO et al., 2005; ILYINA, 2010; BERTELS and RAINEY 2011). BOX são elementos extragênicos repetitivos descobertos em 1992, porém sua origem está em discussão, mas há evidências indiretas de que são derivados de elementos de sequencias de inserção (MARTING et al., 1992, ILYINA, 2010).

ERIC e BOX-PCR já foram utilizados na caracterização e obtenção de *fingerprinting* de centenas de diferentes tipos de bactérias e podem ser aplicados para determinação de Unidades taxonômicas operacionais conhecidas como OTUs (*Operational Taxonomic Units*) (YANG et al., 2004; TORRES et al., 2008; GRANGE e HUNGRIA 2004; ALBERTON et. al., 2006; SCHLOSS et al., 2006).

Os objetivos deste estudo foram analisar a diversidade genética de bactérias endofíticas de cinco cultivares de bananeira por meio da técnica de BOX e ERIC-PCR e avaliar o potencial antagônico contra fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Colletotrichum* sp..

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Produção de banana

Originária do sudeste da Ásia, a bananeira (*Musa spp.*) é atualmente cultivada em mais de 100 países das regiões tropicais do planeta. Por seu valor nutricional constituem a base da alimentação de milhões de pessoas em vários países em vias de desenvolvimento e constitui o quarto produto alimentar mais produzido no mundo, perdendo apenas para o arroz, trigo e milho (MARÍN et al., 2003).

De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) (2010) a maioria dos produtores praticam uma agricultura de subsistência ou para venda em mercados locais. Como a bananeira é uma planta não sazonal, produzindo até nas estações mais susceptíveis de escassez alimentar, ela é de grande importância em qualquer sistema sustentável de luta contra a fome.

A banana é considerada a fruta de consumo mais popular no mundo, com uma produção média estimada em 58 milhões de toneladas anuais no período de 1990 a 2005 e o seu mercado movimentado, em termos de exportações, 4 bilhões de dólares por ano (FAO, 2007). O Brasil ocupa a quarta colocação no *ranking* mundial, tendo uma produção de 7.116.808 toneladas e área colhida de 510.825 mil hectares (AGRIANUAL, 2011).

Na região Norte do Brasil a cultura da banana é muito importante, por ser uma atividade ligada à agricultura familiar. No estado do Amazonas a produção de banana é uma atividade agrícola relevante e coloca o estado como o segundo maior produtor da região, sendo o primeiro o Pará. No entanto o rendimento da produção no Amazonas depende de vários fatores, inclusive de investimento, para vencer as barreiras fitossanitárias (GASPAROTTO et al., 2010).

As bananeiras assim como todas as plantas são consideradas microecossistemas complexos, onde diferentes nichos podem ser explorados por uma extensa variedade de microorganismos, dentre estes os endofíticos (AZEVEDO et al., 2000).

## 1.2 Micro-organismo Endofíticos

Os micro-organismos endofíticos são organismos presentes nos tecidos das plantas sem causar quaisquer danos às mesmas e sem produzir estruturas externas emergidas dos tecidos dos vegetais (YATES et al., 1997; AZEVEDO et al., 2007). Em geral os endofíticos são representados por fungos, actinomicetes e bactérias, que desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta ao meio ambiente (MENDES e AZEVEDO, 2007).

Diferentes dos patogênicos que causam doenças nas plantas e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais a distinção entre endofíticos, patogênicos e epifíticos ainda não é claro, uma vez que micro-organismo endofíticos pode tornar-se patogênico conforme o genótipo do hospedeiro e as condições do ambiente, e um micro-organismo epifítico pode eventualmente tornar-se um endofítico quando penetra a célula das plantas permanecendo no interior da planta por um determinado período (AZEVEDO, 1998).

Relatos de que bactérias endofíticas, possivelmente influenciam na fisiologia da planta hospedeira por processos ainda não esclarecidos foi demonstrado por Sturz & Nowak (2000). Segundo Azevedo et al., (2000) e Azevedo et al., (2003) bactérias endofíticas desempenham no interior de seus hospedeiros, diversas atividades tais como: proteção contra ataque de insetos, patógenos, herbívoros; produção do composto de crescimento vegetal, maior disponibilização de nutrientes e fixação biológica de nutrientes.

Os micro-organismos endofíticos são mais estáveis por não estarem exposto às condições ambientais externas aos órgãos vegetais, havendo assim pouca ou nenhuma competição microbiana (STURZ & NOWAK, 2000). Além do fato destes serem capazes de colonizar os tecidos internos das plantas, constituem-se vantagens sobre os micro-organismos que habitam partes externas, pois podem sobreviver em um ambiente mais uniforme e serem menos afetadas pela temperatura, potencial osmótico e radiação ultravioleta (LODEWYCKX et al., 2002).

Com as análises dos estudos sobre interação planta/micro-organismos e com o entendimento das diferentes funções destes no interior das plantas, trabalhos tem relatado a possibilidade destes serem usados para controle biológico de inúmeras doenças, na promoção de crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; COOMBS et al., 2004; HALLMANN e BERG, 2006; RYAN et al., 2008), na biorremediação de ambientes contaminados (NEWMAN

e REYNOLDS, 2005; GERMAINE et al., 2009; WEYENS et al., 2009 e Ma et al., 2011) e na síntese de compostos de importância biotecnológica (RODRIGUES, 2006).

Os micro-organismos endofíticos foram isolados de diferentes partes dos vegetais como raízes, caules, nódulos, folhas e frutos em uma gama de variedade de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988), milho (ARAUJO et al., 2000), videira (BELL et al., 1995), algodão (QUADT-HALLMANN et al., 1997), arroz (STOLZFUS et al., 1997), tomate (PILLAY e NOWAK, 1997), citros (MARCON, 2002), batata (REITER et al., 2003), trigo e sorgo (ZINNIEL et al., 2002), bananeira (THOMAS et al., 2009) entre outras.

Vários estudos foram realizados com objetivo de isolar, identificar e estudar a diversidade de bactérias endofíticas nos tecidos de várias plantas, trabalhando com endofíticos de mandioca em três estados brasileiros, Teixeira et al., (2007), isolaram 482 endofíticos, entre os gêneros mais frequentes estavam: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Escherichia*, *Burkholderia* e *Stenotrophomonas*, sendo o gênero *Bacillus* encontrado em maior frequência em todas as regiões amostradas. Analisando os efeitos da inoculação de rizóbios em sistemas de cultivos e estágios de crescimento sobre a comunidade endofítica bacteriana de raízes de soja Zhang et al., (2011) sugeriram que a inoculação de rizóbios e prática consorciada podem aumentar a diversidade de endofíticos de raiz de soja, influenciando o crescimento da planta.

Bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar tem demonstrado potencial na expressão de genes responsáveis pela solubilização de fosfato inorgânico (LIRA-CADETE et al., 2012). A capacidade de bactérias diazotróficas solubilizarem fosfato foi também descrita em cultivares de milho (MONTÁNEZ et al., 2012). Actinobactérias isoladas de plantas herbáceas nativa da Coreia apresentaram atividade enzimática e antagônica contra agentes patogênicos indicando que estas podem ser uma importante fonte de compostos bioativos (KIM et al., 2012).

As explorações das interações entre endofíticos e vegetais podem resultar em promoção da saúde da planta e podem desempenhar um papel significativo na agricultura sustentável, uma vez que a compreensão dos mecanismos que permitem essas interações é essencial para desenvolver o potencial das bactérias endofíticas em uma gama de aplicações biotecnológica (RYAN et al., 2008).

### 1.3 Marcadores Moleculares

Tradicionalmente, o estudo de endofíticos foi baseado em técnicas de isolamento em meios de cultura. Entretanto, nos últimos anos, com o avanço das técnicas moleculares, é possível investigar aqueles que não são cultiváveis ou de natureza fastidiosa, possibilitando o estudo do material genético a partir de amostras coletadas no ambiente (CONN e FRANCO 2004; MYAMOTO et al., 2004).

Entre as ferramentas moleculares utilizados para análise da diversidade de endofíticos, destacam-se os marcadores baseados em sequencias repetitivas tais como ERIC e BOX. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) são encontrados em uma gama de enterobactérias e são prováveis transposons não autônomos denominados MITEs (Miniature Inverted Transposable Elements) (DE GREGORIO et al 2005; ILYINA, 2010; BERTELS and RAINEY 2011). BOX são elementos extragênicos repetitivos descobertos em 1992, porém sua origem está em discussão, mas há evidências indiretas de que são derivados de elementos de sequencias de inserção (MARTING et al., 1992, ILYINA, 2010).

Por ser uma ferramenta simples, rápida, barata, aplicável para a caracterização e genotipagem a nível molecular, BOX e ERIC-PCR são muito utilizados para análises moleculares de micro-organismos nos últimos anos. Para Bishi et. al., (2008) ERIC-PCR é um método molecular de tipagem altamente discriminatório para genotipagem de *Streptococcus agalactiae*, podendo ser usado para identificação de isolados pertencentes a diferentes regiões geográficas e até mesmo em estudos de investigação epidemiológica de *Streptococos*. Por meio de ERIC-PCR, Mondal et al., (2009) estudaram a variabilidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *punicae*, onde foi possível agrupar os isolado em dois estados geograficamente distintos na Índia, além de demonstrar a correlação existente entre ERIC-PCR e os correspondentes padrões de virulência do patógeno bacteriano, diferenciação e virulência do agente patogênico.

Já para a técnica de BOX-PCR Fernades et al., (2009) trabalhando com estirpes de bactérias endofíticas isoladas da rizosfera de plantas de milho verificaram alta diversidade genética entre os isolados bacterianos. Lira-Cadete et al., (2012) também por meio de BOX-PCR observaram alta variabilidade genética em populações de bactérias diazotróficas capazes de solubilizar fosfato inorgânico, associado a plantas de cana-de-açúcar.

ERIC e BOX-PCR já foram utilizados na caracterização e obtenção de *fingerprinting* de centenas de diferentes tipos de bactérias e podem ser aplicados para determinação de

unidades taxonômicas operacionais conhecidas como OTUs (*Operational Taxonomic Units*) (YANG et al., 2004; TORRES et al., 2008; GRANGE e HUNGRIA 2004; ALBERTON et al., 2006; SCHLOSS et al., 2006).

#### **1.4 Controle Biológico**

Segundo Pal et al., (2006) o termos controle biológico ou biocontrole é usados em diferentes campos da biologia, especialmente entomologia e fitopatologia. Em entomologia, tem sido utilizado para descrever a utilização de insetos predadores, nematóides entomopatogênicos ou agentes patogênicos microbianos utilizados para suprimir as populações de pragas de diferentes insetos. Em fitopatologia, o termo é aplicado à utilização de micro-organismos antagonistas capazes de suprimir as doenças, bem como a utilização de patógeno hospedeiro específico para controlar populações de plantas daninhas. Em ambos os campos, o organismo que suprime a praga ou o agente patogênico é referido como o agente de controle biológico (BCA).

Para Cook, (1993) o controle biológico de doenças de plantas é um método alternativo viável, considerando que micro-organismos presentes naturalmente em ecossistema das plantas ajudam a reduzir o potencial da doença, além destes, o uso de micro-organismo exótico também podem ser introduzidos na tentativa de controle da doença. Quando micro-organismos vivos são introduzidos em certas culturas, podem aumentar populações naturais benéficos, reduzindo os danos causados por patógenos específicos (HEYDARI & MISANGHI 2003).

O uso do controle biológico em substituição ao químico é dependente da disponibilidade e da efetividade dos agentes de controle, bem como dos produtos comerciais contendo estes micro-organismos. Entretanto, até o momento, são poucos os produtos biológicos disponíveis no mercado para essa modalidade de controle. Sendo que a maioria não é devidamente registrada para uso em escala comercial (LOPES, 2001). Para Gravena (1992) a generalização da prática do controle biológico poderá oferecer ao meio ambiente e à sociedade mais qualidade e proteção sem comprometer a produção de alimentos e fibras.

Os testes *in vitro* possibilitam a análise de grande número de potenciais antagonistas, permitindo o estudo do mecanismo de ação e facilitando a observação da interação antagonista-patógeno. Além disso, os organismos selecionados *in vitro* podem servir como fonte de genes para transformação de micro-organismos não antagônicos (MARIANO, 1993).

Vários trabalhos sobre interações antagônicas foram desenvolvidos nas últimas décadas; interação *in vitro* entre isolados de *Guignardia citricarpa* e bactérias endofíticas, mostraram que metabólitos secretados por *G. citricarpa* tem um efeito inibitório sobre o crescimento de algumas espécies do Gênero *Bacillus* e um efeito estimulador sobre o crescimento *Pantoea agglomerans* (Araujo et. al., 2001). Já em teste *in vitro* usando bactérias endofítica de citrus, *Xylella fastidiosa* teve seu crescimento estimulado por *Methylobacterium extorquens* e inibido por *Curtobacterium flaccumfaciens* (LACAVA et al., 2004).

Analisando a atividade antagônica entre *Trichoderma* ssp. contra fungo *Phytophthora citrophthora* Silva et al., (2008) concluiu que isolados de *Trichoderma* ssp são capazes de inibir o crescimento micelial do fungo *P. citrophthora*, sendo que *Trichoderma stromaticum* apresenta maior antagonismo. Em estudo *in vivo* com *Gliocladium catenulatum* reduziram 70% a incidência de *Moniliophthora perniciosa* agente causal da doença vassoura-de-bruxa do cacau (RUBINI et al., 2005).

Em estudo de resposta de comunidades bacterianas endofíticas em plântulas de banana em cultura de tecido a infecção pelo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 4 Lian et al., (2008) verificaram que comunidade de bactérias endofíticas antagonista tende a aumentar em bananeiras quando inoculadas com FOC, indicando que a infestação auxilia a seleção de antagonistas (LIAN et al., 2008). Na associação de populações de bactérias cultiváveis de folhas de bananeiras e sua atividade antagônica contra *Mycosphaerella fijiensis*, bactérias endofíticas testadas mostraram maior percentual de inibição do que *Bacillus subtilis* usado como controle positivo (CEBALLOS et al., 2012).

Zinniel et al., (2002), demonstraram a ocorrência e diversidade de endófitos cultiváveis em um grande número de espécies de plantas, a colonização bem sucedida de diversas culturas com tais micróbios sugere que eles podem ser utilizados em futuras aplicações, tais como liberação de enzimas degradativas para controlar determinadas doenças de plantas ou outros produtos úteis. Sugerindo ainda que o uso de endofíticos específicos possa ser preferível à utilização de fertilizantes e pesticidas químicos não específicos, devido ao custo, a eficácia do tempo e as contribuições de sistemas agrícolas sustentáveis.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a diversidade genética e o potencial para o controle biológico de bactérias endofíticas de *Musa* spp..

### 2.2 Objetivos Específicos

Analisar a diversidade genética de bactérias endofíticas de diferentes cultivares de bananeiras, por meio de marcadores ERIC e BOX-PCR.

Testar o potencial das bactérias endofíticas como agentes de controle biológico de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *Colletotrichum* sp..

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material Vegetal

Foram isoladas bactérias endofíticas de cinco cultivares de bananeiras, sendo estas: BRS Conquista, Pinsangue Seilão, FHIA 18, Maçã e Pacovan. As amostras foram obtidas na Embrapa Amazônia Ocidental localizada em Manaus - Amazonas exceto a cultivar Maçã que foi oriunda de Manacapuru - Amazonas (Tabela 1).

Amostras de tecido foliar foram coletas ao acaso a partir de plantas adultas sadias, armazenadas à temperatura ambiente e processadas no prazo de 24 horas após a coleta.

**Tabela1.** Genótipo e coordenadas geográficas das amostras coletadas.

Cultivar	Genótipo	Localização	Coordenadas
<b>Pinsangue Seilão</b>	BB	Manaus-AM	“S 02° 53’ W 059° 58’
<b>Pacovan</b>	AAB	Manaus-AM	“S 02° 53’ W 059° 58’
<b>BRS Conquista</b>	AAA	Manaus-AM	“S 02° 53’ W 059° 58’
<b>FHIA 18</b>	AAAB	Manaus-AM	“S 02° 53’ W 059° 58’
<b>Maçã</b>	AAB	Manacapuru-AM	‘S 03°18’ W 060° 32’

### **3.2 Desinfestação de Superfícies**

Inicialmente o tecido foliar foi lavado em água corrente e posteriormente classificado por cultivar. Para desinfestação, primeiramente, os fragmentos das folhas de cada cultivar foram lavados em etanol 70%, em seguida o material foi imerso em uma solução de hipoclorito de sódio 3% por um minuto. Ao final desse processo o material foi lavado novamente em uma solução de etanol a 70% e duas vezes em água destilada estéril, como controle da desinfestação 50µL da água utilizada na última lavagem foi plaqueado em meio TSB (PROCÓPIO et al., 2009).

### **3.3 Isolamento Bacteriano**

Para isolamento das bactérias endofíticas, fragmentos de folhas de 4 a 5 mm, foram inoculados em meio TSB por até 4 dias a 28°C. As colônias crescidas em torno dos fragmentos foram escolhidas aleatoriamente (PROCÓPIO et al., 2009). Oito réplicas de cada amostra foram armazenadas, sendo quatro em glicerol e quatro em meio TSB semi-sólido. Essas amostras foram depositadas na coleção do MBT (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas).

### **3.4 Testes de Antagonismo**

Para triagem das bactérias endofíticas com potencial antagonico, discos miceliais de 5 mm de circunferência de FOC foram colocados no centro das placas de Petri contendo meio BDA (Batata 200 g/mL<sup>-1</sup>, Dextrose 20,0 g/mL<sup>-1</sup> e Ágar 15 g/mL<sup>-1</sup>), em seguida, as placas foram inoculadas com quatro diferentes bactérias endofíticas, a 3,5 cm do disco micelial. As placas foram avaliadas no sétimo dia.

Já para os testes de antagonismo contra FOC e *Colletotricum* sp. um disco de micélio de 5 mm foi posicionado no centro da placa contendo BDA e em seguida duas colônias da mesma bactéria foram inoculadas a 3,5 cm de distância do patógeno em posições opostas e incubados a 28 °C.

Foram realizadas três réplicas para cada tratamento e controle. O crescimento dos fitopatógenos foi mensurado no eixo de inibição entre as colônias a partir do terceiro dia com avaliações a cada dois dias, durante sete dias para FOC e 11 dias para *Colletotricum* sp..

### **3.5 Extração de DNA**

DNA bacteriano foi extraído de acordo com o protocolo de Sun et al., (2008) modificado. A quantificação foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro (NanoDrop - Thermo) e em gel de agarose 0,8 % para análise da qualidade.

### **3.6 Reação de PCR ERIC and BOX-PCR**

#### **3.6.1 Reação com ERIC-PCR**

Para o marcador ERIC-PCR foram utilizados os primers ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' e ERIC2 5'-AAGTAAGTGA CTGGGGTGAGCG-3'(Hulton et al, 1991), e as reações realizadas com: 1X de tampão IO (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton X-100), 2 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de cada dNTP, 50 ng de DNA, 0,5 mM de cada primer e 1 U da Taq. Polimerase Phoneutria.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti Applied Biosystems com os seguintes ciclos. Desnaturação inicial 94°C por 2 minutos, 35 ciclos com desnaturação de 94°C por 1 min, anelamento 45,5°C por 1,5 min. Síntese 72°C 2 min. Síntese final: 72°C, por 8 minutos.

#### **3.6.2 Reação com BOX-PCR**

Para Box-PCR foi utilizado o primer BOX 1R (5'-CTCCGGCAAGGCGACGCTGAC-3') (VERSALOVIC et al., 1994), e as reações foram realizadas contendo 1X de tampão IO (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton X-100), 3 mM de cloreto de magnésio, 0,25 mM de cada dNTP, 50ng de DNA , 2 mM de cada primer e 1U da Taq. polimerase Phoneutria.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti Applied Biosystems com os seguintes ciclos. Desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação de 94°C 1 min, anelamento 50°C por 1,5 min. Síntese 68°C, por 8 min. Síntese final 68°C por 8 minutos.

### **3.6 Análises dos Dados**

#### **3.6.1 Antagonismo**

Para teste de antagonismo, os dados de três réplicas foram submetidos á análise de variância e teste de Tukey ( $P < 0,01$ ). A percentagem de inibição foi calculada com base na razão entre a média de inibição e a média de crescimento do controle.

#### **3.6.1 Antagonismo**

Para análise da diversidade com base nos dados obtidos dos marcadores ERIC e BOX-PCR, os perfis de bandas presença (1) e ausência (0) foram transformada em uma matriz binária e em seguida utilizada para obter um dendograma de similaridade calculado por meio do Coeficiente de Dice e agrupado utilizando o algoritimo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average). O dendograma foi obtido usando o software NTSys v.2.1 (ROHLF, 2002). Um nível de 60% de similaridade mínima entre os isolados foi considerado para definição de Unidade Taxonômica Operacional (OTU) (Torres et al., 2008).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Isolamento Bacteriano**

Foram isoladas 122 colônias de bactérias endofíticas, sendo 23 isoladas da cultivar Pacovan, 29 da Maçã, 9 da BRS Conquista, 6 da Pisangue Seilão e 55 isolados da FHIA 18 (Tabela 2).

**Tabela.02-** Lista de isoladas obtidos por cultivar com número de depósito.

<b>Maçã</b>	<b>Coleção</b>	<b>FHIA 18</b>	<b>Coleção</b>	<b>FHIA 18</b>	<b>Coleção</b>	<b>Pacovan</b>	<b>Coleção</b>	<b>BRS Conquista</b>	<b>Coleção</b>	<b>Pisangue Seilão</b>	<b>Coleção</b>
M01	CBA-1869	FH6B	CBA-1716	FH14A	CBA-1702	P1	CBA-1748	BRS3	CBA-1739	PS6*	CBA-1731
M02	CBA-1870	FH7C	CBA-1722	FH9B	CBA-1730	P1A	CBA-1804	BRS12	CBA-1745	PS9	CBA-1732
M03	CBA-1871	FH14	CBA-1701	FH1A	CBA-1706	P2A1	CBA-1806	BRS10	CBA-1741	PS11	CBA-1734
M04	CBA-1872	FH5A1	CBA-1711	FH5A	CBA-1712	P2B	CBA-1807	BRS10A	CBA-1742	PS6A	CBA-1737
M05*	CBA-1873	FH12C	CBA-1691	FH6C	CBA-1717	P2B1	CBA-1803	BRS10C	CBA-1744	PS11A	CBA-1735
M06	CBA-1874	FH11E1	CBA-1688	FH9	CBA-1728	P3A	CBA-1761	BRS6	CBA-1733	PS6A1	CBA-1738
M07	CBA-1875	FH9A1	CBA-1693	FH11C	CBA-1762	P6	CBA-1750	BRS12F	CBA-1747		
M08	CBA-1876	FH14C	CBA-1705	FH11D	CBA-1764	P8	CBA-1751	BRS10B	CBA-1743		
M09	CBA-1877	FH12B	CBA-1690	FH10C	CBA-1685	P11B	CBA-1758	BRS12.1	CBA-1746		
M10*	CBA-1878	FH10B1A	CBA-1683	FH8	CBA-1724	P11E	CBA-1765				
M11	CBA-1879	FH5	CBA-1710	FH12D	CBA-1694	P13	CBA-1769				
M12	CBA-1880	FH11	CBA-1686	FH8B	CBA-1726	P13D	CBA-1774				
M13	CBA-1881	FH10B1	CBA-1681	FH6D	CBA-1719	P2A	CBA-1805				
M14	CBA-1882	FH6C1	CBA-1718	FH11E	CBA-1668	P14A	CBA-1775				
M15	CBA-1883	FH11E1A	CBA-1689	FH14A1	CBA-1703	P14B	CBA-1777				
M16	CBA-1884	FH7B	CBA-1721	FH1D	CBA-1709	P14C	CBA-1779				
M17	CBA-1885	FH13	CBA-1695	FH7A	CBA-1720	P14D1	CBA-1781				
M18	CBA-1886	FH10B	CBA-1680	FH8A	CBA-1725	P14E	CBA-1782				
M19	CBA-1887	FH13A	CBA-1696	FH13D1	CBA-1700	P15B	CBA-1784				
M20	CBA-1888	FH10B1	CBA-1681	FH11	CBA-1686	P15C	CBA-1786				
M21	CBA-1889	FH13B	CBA-1697	FH10	CBA-1677	P15D1	CBA-1787				
M22	CBA-1890	FH13D	CBA-1699	FH5A1A	CBA-1713	P17E	CBA-1797				
M23	CBA-1891	FH18C	CBA-1746	FH16E	CBA-1749	P18A	CBA-1798				
M24	CBA-1992	FH11B	CBA-1727	FH1B	CBA-1707						
M25	CBA-1993	FH14B	CBA-1704	FH1C	CBA-1708						
M26	CBA-1994	FH9A	CBA-1729								

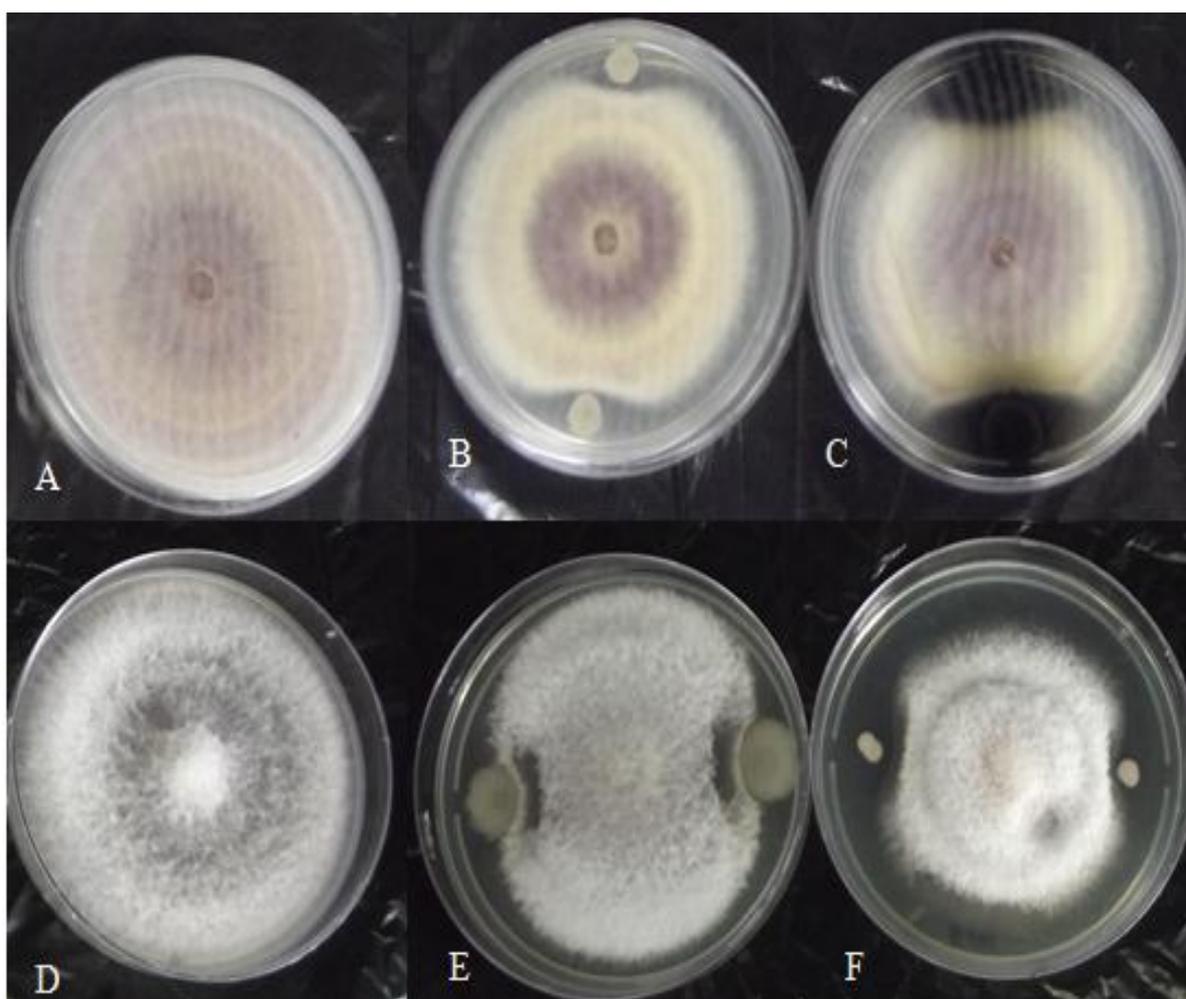
M27	CBA-1995	FH7D	CBA-1723								
M28*	CBA-1996	FH9C	CBA-1682								
M29	CBA-1897	FH10F	CBA-1714								

\*Bactérias que apresentaram atividade antagônica á FOC e *Colletotricum* sp.

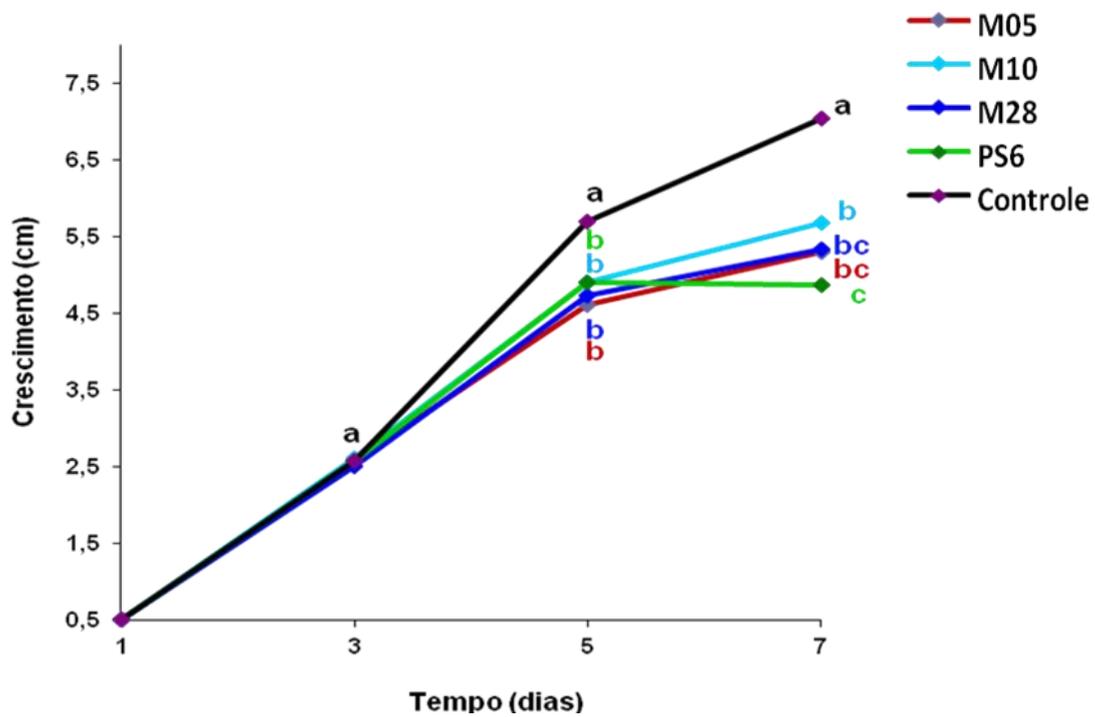
#### 4.2 Teste de Antagonismo *in vitro*

As bactérias endofíticas foram avaliadas pela técnica de cultura pareada contra FOC e *Colletotrichum* sp.. Das 122 bactérias endofíticas avaliadas quatro apresentaram atividade antagonista contra FOC e *Colletotrichum* sp., sendo três isolados da cultivar Maçã (M05, M10, e M28) e um de Pisangue Seilão (PS6).

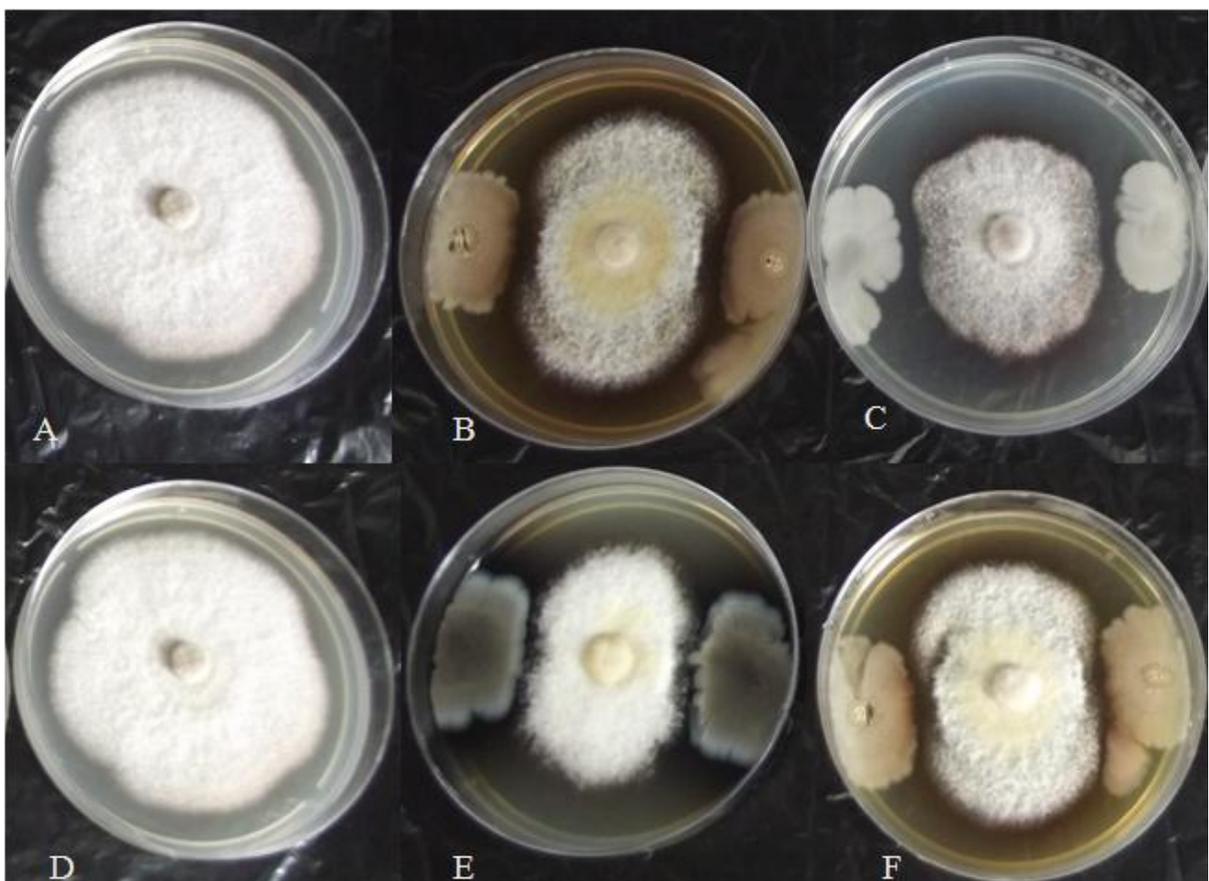
A inibição significativa com ( $P < 0,01$ ) foi observado a partir do 5º dia para FOC (Figura 2) e do 7º dia para *Colletotrichum* sp. (Figura 4). Os dados mostram diferenças por isolados na percentagem de inibição para FOC onde o isolado PS6 apresentou maior taxa de inibição (30%), seguido por M05 (28%), M28 (24%) e M10 (19%). Contra *Colletotrichum* sp., o isolado M28 apresentou maior taxa de inibição 35%, seguido por M05 (32%), PS6 (30%) e M10 (27%).



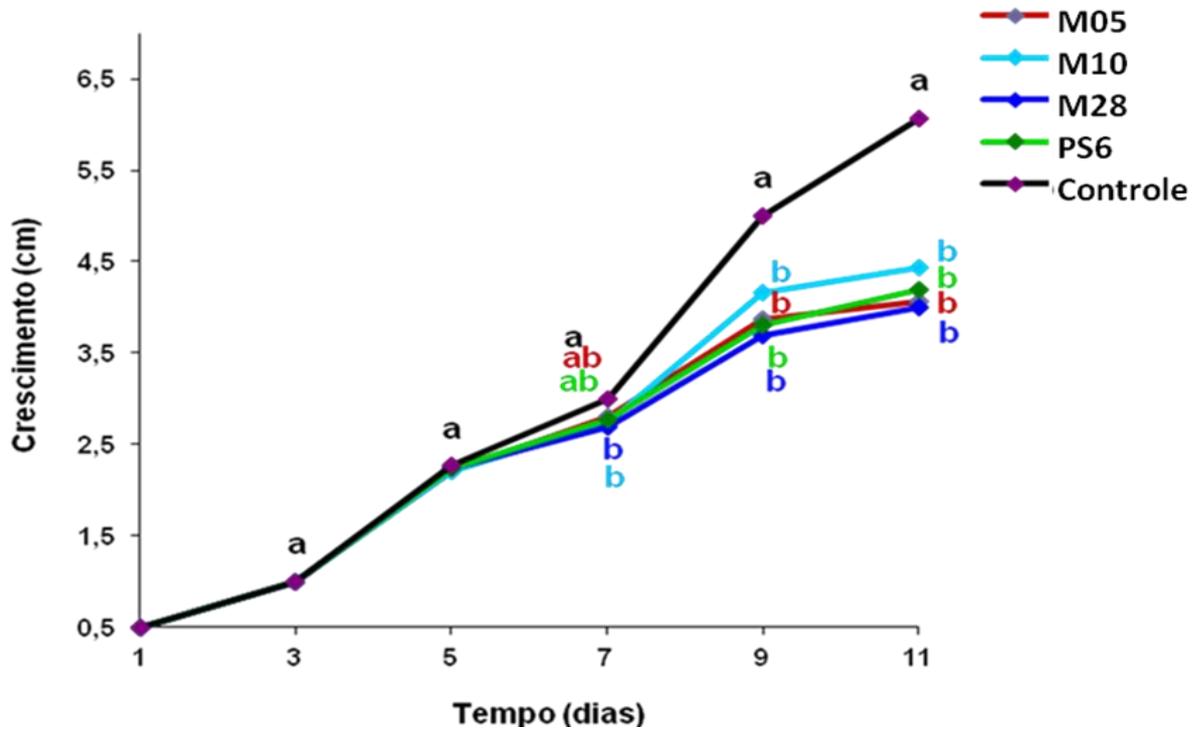
**Figura 1.** Teste de atividade antagonista *in vitro* de bactérias endofíticas à *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **A e D.** Controle, **B.** Isolados M5, **C.** Isolados M28. **E.** Isolados SM10 **F.** Isolados RP6.



**Figura 2.** Teste de antagonismo *in vitro* de bactérias endofíticas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em confronto direto. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,01\%$ ). M5, M10, M28: isolados da cultivar Maçã, e PS6 isolado da cultivar Pisangue Seilão.



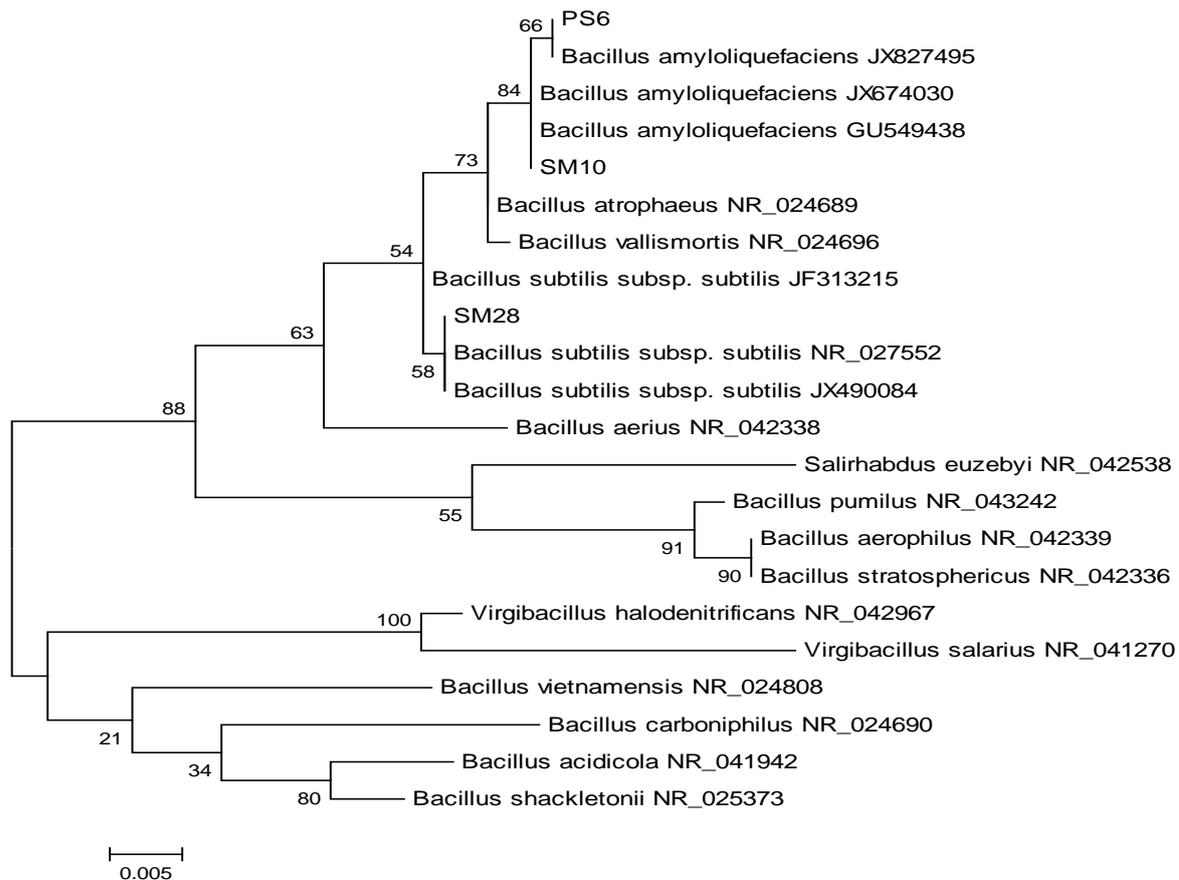
**Figura 3.** Teste de atividade antagônica *in vitro* de bactérias endofíticas contra *Colletotrichum* sp.; A e D Controles B isolado M5, C. isolado M10 E isolado M28 F. isolado PS6.



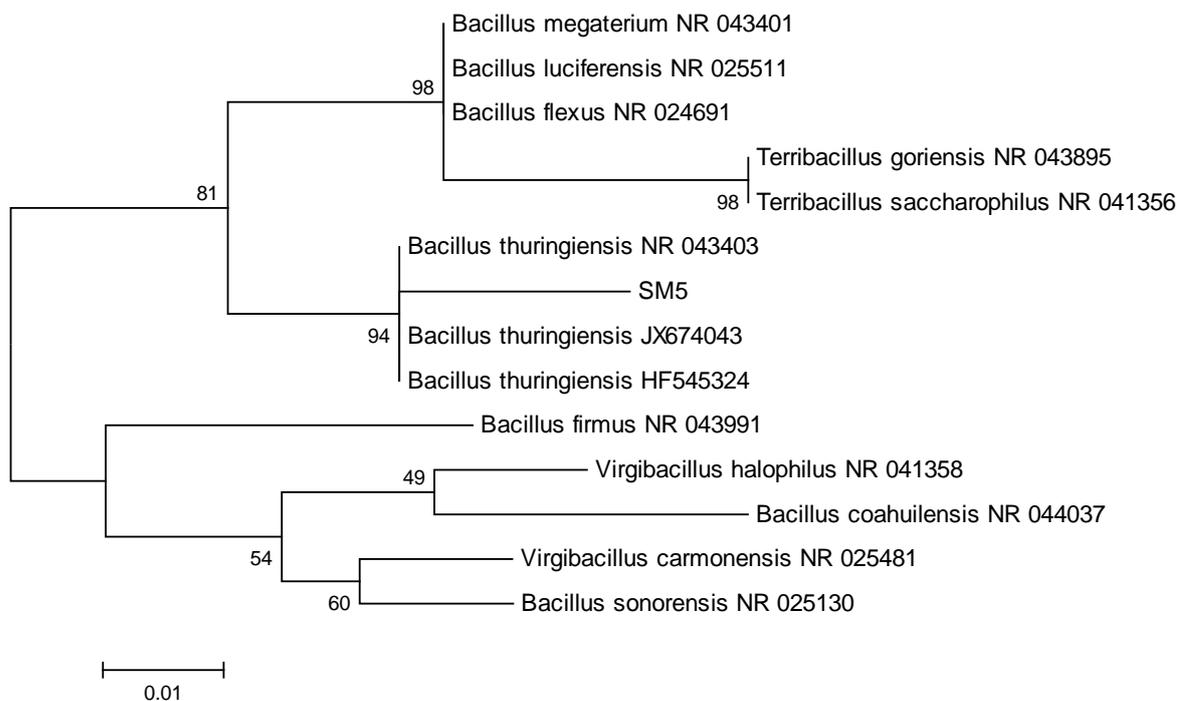
**Figura 4.** Teste de antagonismo *in vitro* de bactérias endofíticas contra *Colletotrichum* sp. em confronto direto. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,01\%$ ). M5, M10, M28: isolados da cultivar Maçã, e PS6 isolado da cultivar Pisangue Seilão.

### 4.3 Identificação dos Isolados Seleccionados

A análise filogenética da região do 16S das quatro bactérias que apresentaram atividades antifúngicas revelou que estas correspondem a três possíveis espécies diferentes de *Bacillus*, onde as bactérias PS6 e SM10 apresentaram maior correlação com *Bacillus amyloliquefaciens*, SM28 á *Bacillus subtilis* subsp. *subtillis* (Figura 5) e a bactéria SM5 está mais relacionada com *Bacillus thuringiensis* (Figura 6).



**Figura 5.** Relação filogenética de bactérias endofíticas baseadas em sequência de 16S rDNA pelo método Maximum Likelihood de Tamura-Nei, com 1000 bootstrap.



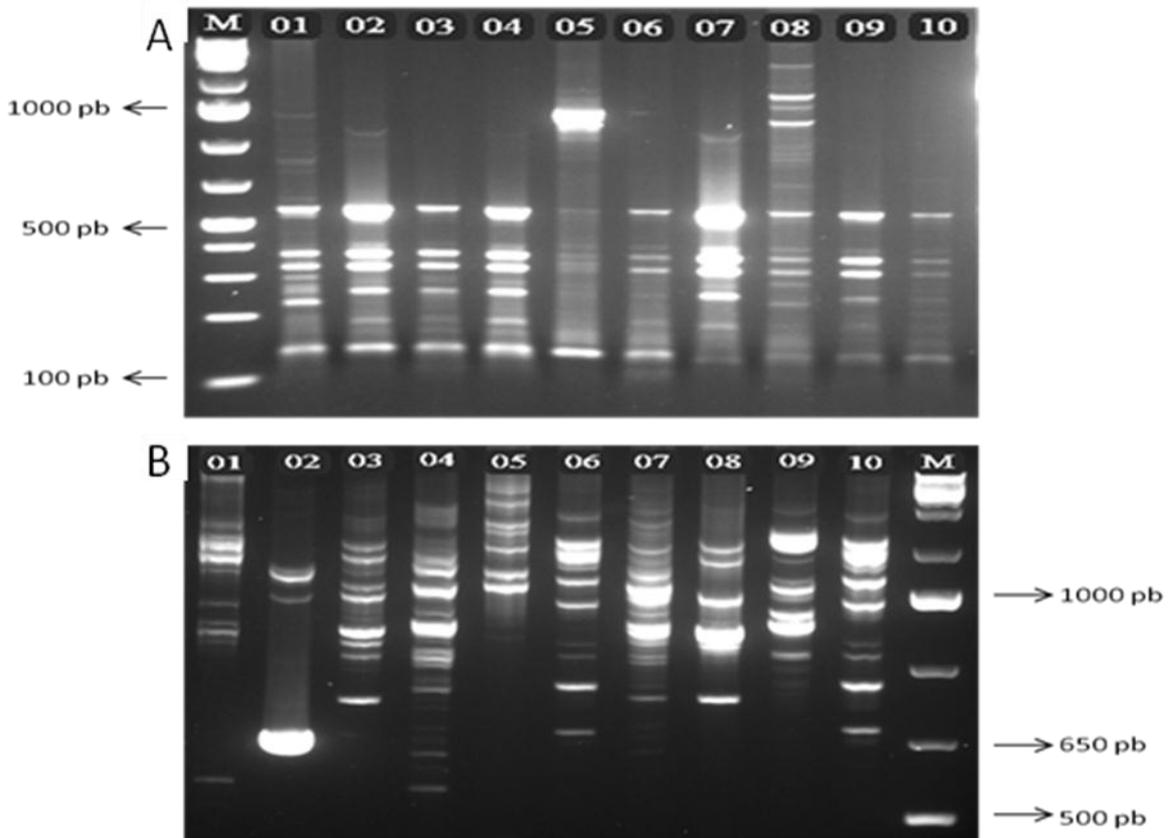
**Figura 6.** Relação filogenética de bactérias endofíticas baseadas em sequência de 16S rDNA pelo método Maximum Likelihood de Tamura-Nei, com 1000 bootstrap.

#### 4.4 Caracterização da Diversidade por ERIC-PCR.

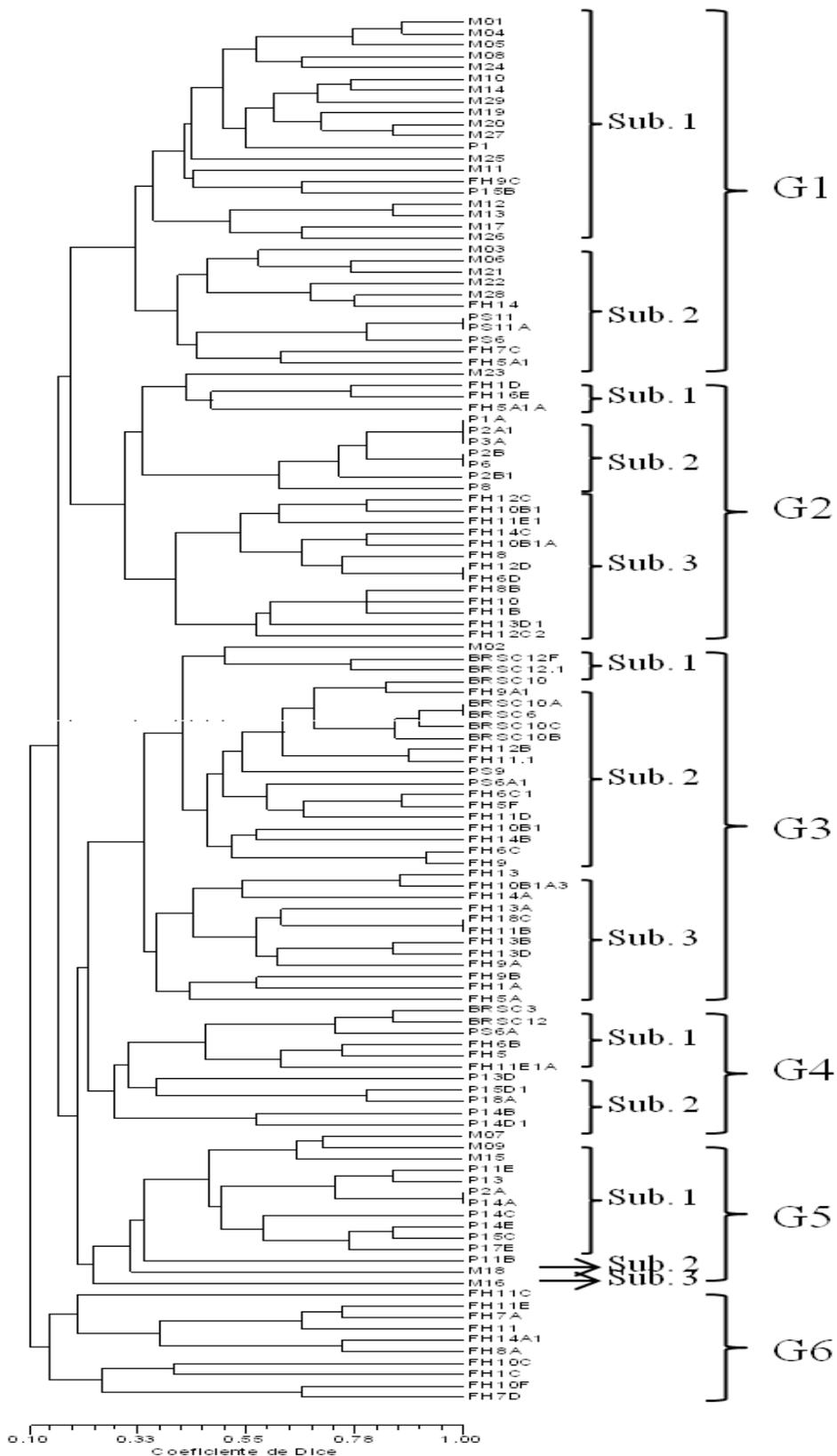
A diversidade genética de 122 linhagens de bactérias endofíticas foi avaliada por meio da análise comparativa entre os padrões eletroforéticos gerados pela amplificação de sequências conservadas e repetitivas no DNA genômico.

Foram obtidas 35 bandas, com variação de 3 a 16 por isolado a partir de ERIC-PCR das quais uma foi monomórfica para a comunidade de bactéria da cultivar Pisangue Seilão e outra para comunidade de BRS Conquistas. A partir dos 29 isolados da cultivar maçã, foram obtidas 30 bandas 100% polimórficas. Com nove isolados da BRS Conquista e seis isolados da Pisangue Seilão geraram respectivamente 19 e 13 bandas. Os 23 isolados da cultivar Pacovan e os 55 de FHIA 18 amplificaram 26 e 33 bandas polimórficas respectivamente (Figura 5 B).

Analisando a estrutura dos grupos formados por UPGMA, a partir dos dados de ERIC-PCR, observou-se a formação de seis grupos, formados por 31 isolados (G1), 24 (G2), 29 (G3), 11(G4) 14 (G5) e o G 6 formado por 10 isolados da cultivar FHIA 18 (Figura 6).



**Figura 5.** Em A. Perfis eletroforéticos das bandas geradas por ERIC-PCR. B. Perfis eletroforéticos das bandas geradas por BOX-PCR, onde M representa Marcador 1Kb Plus DNA Lander Fermentas e os números de 01 á 10 corresponde aos isolados M10, M16, BRS10B, BRS10A, PS11, PS6A, P2A, P15B, FH1A, e FH8 respectivamente.



**Figura 6.** Dendrograma de similaridade calculado por meio do Coeficiente de Dice e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA com base nos dados de ERIC-PCR dos 122 isolados endofíticos de diferentes cultivares de *Musa* spp.

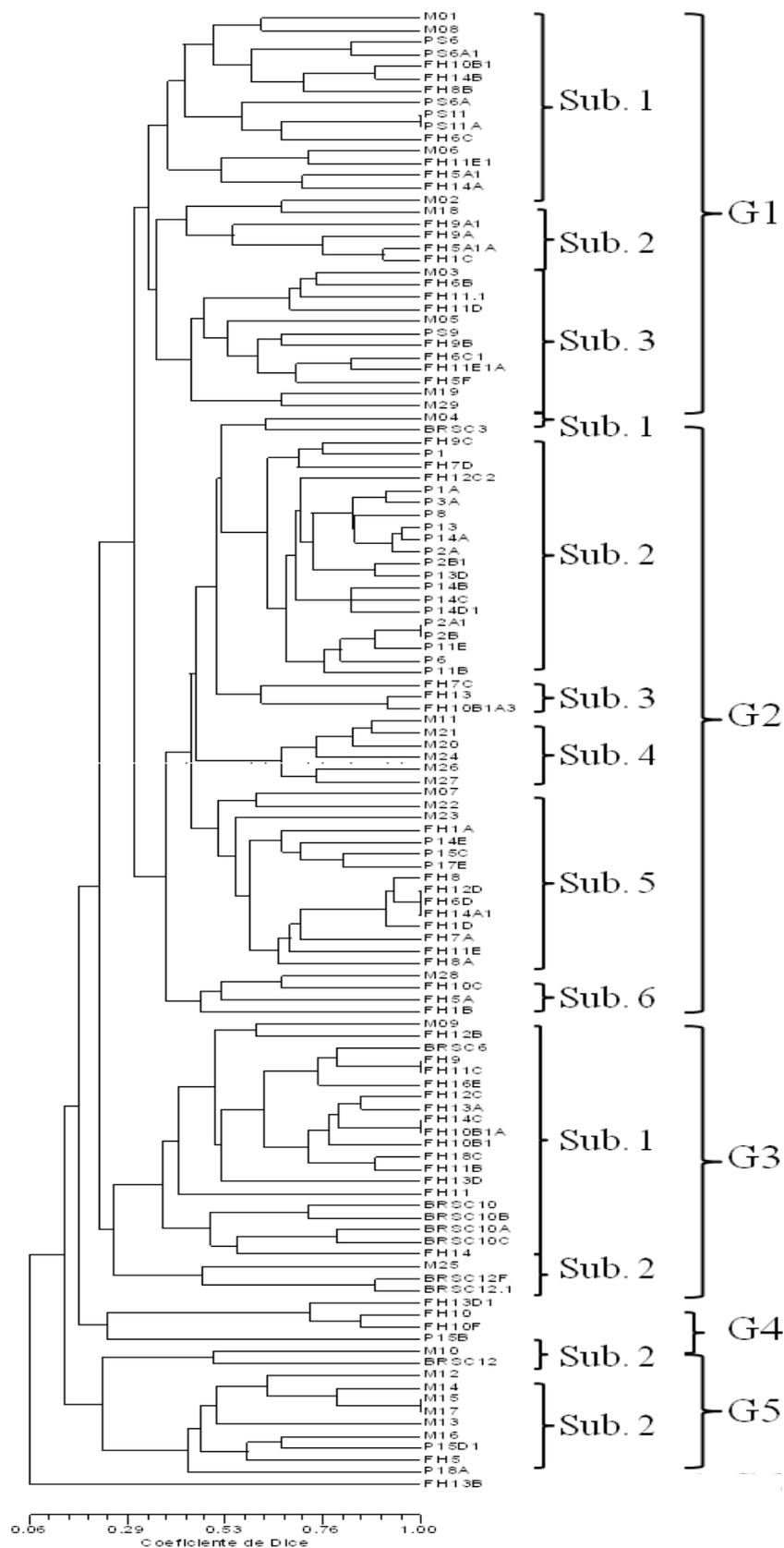
#### **4.5 Caracterização da Diversidade por BOX-PCR.**

Foram obtidas 26 bandas polimórficas variando de 2 a 16 por isolado. A partir das cultivares Maçã, Pacovan e FHIA 18, foram obtidas 23, 22 e 21 bandas respectivamente. Os isolados das cultivares BRS Conquista e Pisangue Seilão apresentaram 13 e 17 bandas.

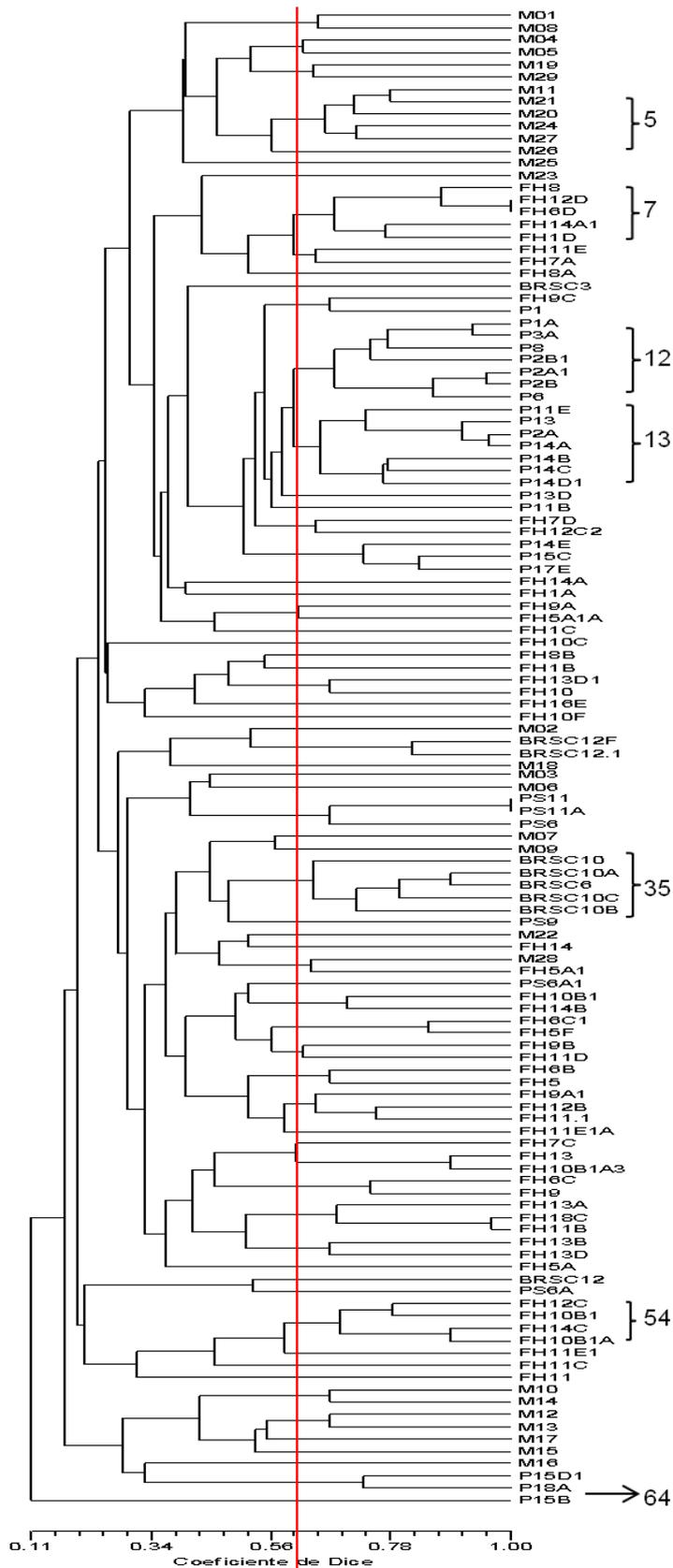
A estrutura dos grupos formados pelo UPGMA, a partir dos dados de BOX-PCR também permitiram a formação de seis grupos: G1 com 33 isolados, G2 com 50, G3 com 23. O grupo G4 apresentou apenas quatro isolados sendo três isolados da cultivar FHIA 18 e um da cultivar Pacovan. O grupo 5 apresentou onze isolados, já o isolado FH11B proveniente da cultivar FHIA 18 diferenciou-se dos demais permanecendo em um perfil único.

A análise polifásica com os dois marcadores (BOX e ERIC em conjunto) permitiu a formação de um dendrograma comum com a distância genética dos isolados variando entre 11% e 100%. Apenas quatro isolados oriundos da mesma cultivar apresentaram similaridade de 100% (Figura 8). Os isolados FH12D e FH6D, obtidos da cultivar FHIA 18, e os isolados PS11 e PS11A de Pisangue Seilão também apresentaram similaridade de 100%.

Através da análise de agrupamento dos dados de ERIC e BOX-PCR com 60% de similaridade, foram observadas 64 possíveis OTUs compostas por 30 grupos e 34 perfis únicos. Entre as OTUs formadas destacam-se a 5, 7, 12, 13, 35 e 54 estas foram as únicas formadas por mais de quatro isolados.



**Figura 7.** Dendrograma de similaridade calculado por meio do Coeficiente de Dice e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA com base nos dados de BOX-PCR dos 122 isolados endofíticos de diferentes cultivares de *Musa* spp.



**Figura. 8.** Dendrograma de similaridade calculado por meio do Coeficiente de Dice e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA com base nos dados de ERIC-PCR e BOX-PCR dos 122 isolados endofíticos de diferentes cultivares de *Musa* spp., com ponto de corte de 60% de similaridade para formação de OTUs.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem e atividade antagônica

Bactérias endofíticas de bananeira foram estudadas por Thomas et al., (2008), Thomas et al., (2009) que identificaram bactérias endofíticas cultiváveis e não cultiváveis cv. Grand Naine. Contudo, este é o primeiro trabalho desenvolvido com cinco diferentes cultivares dos genótipos: BB, AAA, AAAB, e AAB (Tabela 1). No presente, trabalho foram isoladas e caracterizadas 122 bactérias endofíticas provenientes de folhas de cinco cultivares de bananeira: Maçã, Pacovan, FHIA18, BRS Conquista e Pisangue Seilão, todas obtidas da região Amazônica.

Todos os isolados foram submetidos a testes de antagonismos contra FOC, que é agente causal do mal-do-Panamá em bananeiras, para triagem das linhagens potencialmente produtoras de compostos que propiciem a inibição do crescimento de fungos. Dos 122 isolados analisados, quatro apresentaram atividade antagônica *in vitro* contra FOC (Figura 1). Para analisar se o antagonismo também ocorreriam em outros fitopatógenos, testes foram realizados com *Colletotrichum* sp..

Os resultados mostrados nas Figuras 2 e 4 revelam diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com as quatro diferentes linhagens de bactérias tanto para FOC quanto para *Colletotrichum* sp.. Apesar do maior percentual de inibição ter ocorrido em *Colletotrichum* sp., não houve diferenças significativas de inibição entre os isolados M28 (35%), M5 (32%), PS6 (30%) e M10 (27%) (Figura 4). Já para FOC, o isolado PS6 apresentou maior taxa de inibição 30%, seguido por M5 (28%), M28 (24%) e M10 (19%), porém apenas os isolados PS6 e M10 apresentaram diferença significativa ( $P < 0,01$ ) (Figura 2).

Diferenças no potencial de inibição de bactérias endofíticas contra diferentes espécies de fungos, por meio da produção de metabólitos antifúngicos, também foram observadas por Swain e Ray (2009) durante a análise da atividade antagônica de *Bacillus subtilis*, que inibiu de 25% a 34% o crescimento de *F. oxysporum* e 100% o de *Botryodiplodia theobromae*. O percentual de eficiência de inibição obtido tanto por bactérias quanto por fungos utilizados para controle biológico varia de acordo com os organismos testados. Em teste de inibição contra *Verticillium dahliae* a partir de fungos da rizosfera e endorrizas a eficiência destes variou entre 8,58% e 69,78% (Zheng et al., 2011).

Neste trabalho, dos quatro isolados que apresentaram atividade antagônica contra FOC

e *Colletotrichum* sp., três foram provenientes da cultivar Maçã, uma das cultivares consideradas mais susceptível a doenças causadas por fitopatógenos. Em interações de bactérias endofíticas diazotróficas e FOC em mudas de bananeiras maçã, as bactérias diazotróficas reduziram as unidade de propágulos de FOC, além de promover o crescimento da planta (WEBER et al., 2007). A comunidade de bactérias endofíticas antagonista tende a aumentar em bananeiras quando inoculadas com fitopatógeno indicando que a infestação auxilia a seleção de antagonistas (LIAN et al., 2008). Na associação de populações de bactérias cultiváveis de folhas de bananeiras, e sua atividade antagônicas contra *Mycosphaerella fijiensis*, bactérias endofíticas testadas mostraram maior percentual de inibição do que *Bacillus subtilis* usado como controle positivo por meio de alterações na morfologia do micélio e do ascósporo (CEBALLOS et al., 2012).

*Bacillus* spp. têm sido descrito como os mais promissores agente de controle biológico, vários trabalhos demonstram o potencial deste gênero para o controle de patógenos de diferentes culturas (WULFF et al. 2002; KILDEA et al. 2008, ARGUELLES-ARIAS et al. 2009; PÉREZ-GARCÍA et al. 2011). Recentemente *Bacillus amyloliquefaciens*, isolado da rizosfera de bananeiras sadias em campo altamente contaminado com *Fusarium oxysporium* sp. *cubense* (FOC), mostrou efeito na promoção do crescimento de plantas de bananeira e atividade antagônica contra FOC por meio da produção de lipopeptídeos antifúngicos e composto voláteis (WANG et al., 2012). Pesquisas realizadas por Yuan et al., (2012) também revelam que *B. amyloliquefaciens* produz pelo menos 11 compostos voláteis capazes de reduzir o crescimento micelial e inibir a germinação dos esporos do patógeno FOC.

Principalmente devido à produção de compostos antimicrobianos semelhantes ao lipopeptídeo iturina (iturin-like), linhagens de *B. subtilis* tem sido utilizadas como agentes para biocontrole de doenças fúngicas e bacterianas (ZERIOUH et al., 2011). *B. subtilis* também mostraram atividade in vitro contra várias espécies de *Fusarium*, o componente responsável pela atividade antifúngica foi identificada como fengicina, outro lipopeptídeo comumente produzido por *B. subtilis* (HANENE et al., 2012).

Outra espécie que também tem demonstrado grande potencial para aplicações em controle biológico é *B. thuringiensis*, Mojica-Marín e colaboradores (2008) revelam não só o potencial antagônico de *B. thuringiensis* contra *Rhizoctonia solani* de pimenta, como também o aumento do crescimento das mudas associadas às estipes antagônicas. Embora tenha sido demonstrado o potencial de *B. thuringiensis* para controle biológico de fungo, esta espécie

tem se destacado no controle biológico de vários insetos vetores, sendo uma boa alternativa aos pesticidas e produtos químicos. *B. thuringienses* pode produzir toxicidade 24 vezes maior quando comparado a inseticida de incursão (KONECKA et al., 2012). Já Liu et al., (2012) por meio de recombinação do gene cryIE demonstraram que *B. thuringienses* é capaz de controlar pragas e doenças fúngicas em uma cultura. Isso demonstra o potencial do gênero *Bacillus* na produção de compostos com potencial biotecnológico e uso como agentes para controle biológico de diversas culturas.

## 5.2 Diversidade Genética

Neste trabalho, as técnicas de ERIC e BOX-PCR foram utilizadas na análise da diversidade e na obtenção de OTUs.

Analisando a estrutura dos grupos formados pelo Coeficiente de Dice, a partir dos dados de ERIC-PCR, observa-se a formação de seis grupos compostos por subgrupos relacionados a cada hospedeiro. O grupo 2 apresentou menor distância genética, tendo sete isolados com 100% de similaridade, enquanto o grupo 6 apresentou a maior distância genética com 73% de similaridade, este grupo foi formado unicamente por isolados da cultivar FHIA 18 (Figura 6). Ainda com ERIC-PCR foi possível diferenciar 107 dos 122 isolados, visto que para 15 isolados de diferentes grupos foi encontrada similaridade de 100%, indicando a possibilidade de clones ou a incapacidade do marcador em diferenciá-los.

Por meio de BOX-PCR, foram obtidas 26 bandas, todas polimórficas diferente da técnica de ERIC, onde foram identificados loci monomórficos para bactérias isoladas das cultivares BRS Conquista e Pisangue Seilão. Assim como ERIC-PCR, o marcador BOX agrupou os isolados em seis clusters. Embora, este marcador tenha apresentado um número de bandas inferior ao ERIC-PCR, o agrupamento obtido por BOX-PCR foi capaz de diferenciar isolados que apresentaram similaridade de 100% com ERIC-PCR, como por exemplo, os isolados P2A e P14A. Com BOX, a similaridade mudou para 95%. Além disso, os isolados M1 e M4 que apresentaram 87,7% de similaridade com ERIC apresentaram 35% com BOX-PCR e foram agrupados em ramos diferentes no dendrograma (Figura 6 e 7). Os resultados diferentes, gerados por BOX em relação a ERIC-PCR, foram úteis no estudo da diversidade de bactérias endofíticas, possibilitando a diferenciação entre organismos, que para ERIC eram muito semelhantes.

Alta diversidade genética também foi descrita por meio de BOX-PCR, analisando bactérias diazotróficas (LIRA-CADETTE et al., 2012). Também em análise de diversidade de bactérias endofíticas, BOX-PCR foi altamente bem sucedida em discriminar bactérias intimamente relacionadas a partir da família *Enterobacteriaceae* (TORRES et al., 2008).

Para determinação de OTUs, foram utilizados os dados em conjuntos dos dois marcadores (BOX e ERIC). A análise polifásica permite mais confiabilidade segundo Rademaker et al., (2000), os resultados obtidos por combinação destes marcadores evidentemente são mais significativos e consistentes, pois o número total de bandas é consideravelmente aumentado. Quando comparadas análise única e a análise polifásica constatou-se que nesta última apenas quatro isolados da mesma cultivar apresentaram similaridade de 100% (Figura 08), enquanto que em análise única, 15 isolados apresentaram 100% de similaridade para ERIC e 13 para BOX. O dendrograma gerado pela análise polifásica mostrou uma tendência de agrupamento dos isolados de bactérias endofíticas por cultivar.

O critério para determinação do ponto de corte para formação de OTUs diverge entre diferentes autores. Encontram-se valores como de 60% (YANG et al., 2004; TORRES et al., 2008), 70% (GRANGE e HUNGRIA 2004; ALBERTON et al., 2006; SCHLOSS et al., 2006) entre outros.

Diferentes números de OTUs foram obtidas quando consideramos um ponto de corte de 70% e 60% de similaridade entre os isolados. Quando traçado um ponto de corte em 70% de similaridade, verificou-se a formação de 89 possíveis OTUs. Esse número diminui quando um ponto de corte é traçado em 60% de similaridade, onde ocorre a formação de 64 possíveis OTUs (Figura 8). Grande número de OTUs também tem sido identificado em bactérias endofíticas isoladas de diferentes plantas hospedeiras. Torres et al., (2008) identificaram a formação de 23 OTUs em uma amostra de 53 isolados, utilizando BOX-PCR com ponto de corte em 60% de similaridade.

Considerando um ponto de corte de 60% de similaridade, foram obtidas 64 possíveis OTUs, indicando que os 122 isolados analisados no presente estudo podem representar 64 possíveis espécies, uma vez que OTUs individuais podem ser definidas como espécies em potencial. Grange e Hungria (2004) analisaram a diversidade genética de rizóbios de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em dois ecossistemas brasileiros e os dados obtidos a partir de ERIC-PCR revelaram enorme variabilidade genética com 81% dos isolados representando estirpes únicas quando considerado um nível de 70% de similaridade.

Diferente do observado por Torres et al., (2008) que verificaram uma relação não estreita entre endofítico de diferentes espécies hospedeiras, a diversidade genética e análise de OTUs dos 122 isolados avaliados neste trabalho mostraram uma relação estreita entre as cultivares de origem e os isolados, sugerindo uma possível preferência dos endofíticos pela cultivar hospedeira.

## 6. CONCLUSÃO

As técnicas BOX e ERIC-PCR foram bem sucedidas em discriminar os endofíticos.

Os isolados apresentaram alta diversidade genética com os dois marcadores estudados sendo encontradas associações entre os endofíticos e as cultivares hospedeiras.

Bactéria endofítica da cultivar Pisangue Seilão apresentou melhor potencial no controle in vitro de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGRIANUAL . Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, p 170-180, 2011.

ALBERTOM, O., KASCHUK, G., HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biology & Biochemistry* 38 p. 1298–1307, 2006.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Archives of Biology Technology*, Piracicaba, v. 43, p. 447-451, 2000.

ARAUJO, W. L., MACCHERONI, W. JR., AGUILAR-VILDOSO, S. I., BARROSO, P. A., SARIDAKIS, H. O., AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*. 47(3):229-36, 2001.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. Pp. 117-137. In: I.S. MELO & J.L.

AZEVEDO (EDS.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 1998.

AZEVEDO, J. L., MACCHERONI, J. W., PEREIRA O. J. and ARAUJO L. W. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advance on tropical plants. *J. Biotechnol.*, 3: 40–65, 2000.

AZEVEDO, J. L. and ARAUJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. *Fungi: multifacetated microbes*. Boca Raton: CRC Press, Anamaya Publishers. p. 189-207, 2007.

AZEVEDO, J. L., W. MACCHERONI JR., PEREIRA J. O., ARAÚJO. W. L. (2003) Importância dos Microrganismos Endofíticos na Agricultura. *Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP*, 11: 333-371, 2003.

BELL, C. R., DICKIE, G. A., HARVEY, W. L. G., CHAN, J. W. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, 1995, 41:46-53, 1995.

BERTELS, F., and RAINEY, P. B. Within-Genome Evolution of REPINs: a New Family of Miniature Mobile DNA in Bacteria. *PLoS Genetics*. Volume 7, 2011.

BISHI, D. K., VERGHESE, S., VERMA, R. S. Molecular typing of colonizing streptococcus agalactiae strains by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) in a Chennai based hospital *Indian J. Microbiol.* 48:291–296, 2008.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.108, p. 23-31, 1998.

CEBALLOS, I., MOSQUERA, S., ANGULO, M., MIRA, J. J., ARGEL, L. E., URIBE-VELEZ, D., ORDUZ-PERALTA, S., and VILLEGAS, V. Cultivable Bacteria Populations Associated with Leaves of Banana and Plantain Plants and Their Antagonistic Activity Against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microb Ecol*, 2012.

CONN, V. M., FRANCO, C. M. M. Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1787–1794. Vol. 70, No. 3, 2004.

COOK, R. J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v.31. p.53-80, 1993.

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.

DE GREGORIO, E., SILVESTRO, G., PETRILLO, M., CARLOMAGNO, M. S., and DI NOCERA, P. P. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence Repeats in *Yersiniae*: Genomic Organization and Functional Properties. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, p. 7945–7954, 2005.

FAO. Food Agriculture Organization. Crops e livestock. Disponível em: <https://www.fao.org>. acesso em 05 de mar. 2011.

FAO. Food Agriculture Organization. Banana statistic 2005.2005. Disponível em: [https://www.fao.org/es/esc/common/ecg/192/en/BAN\\_STAT\\_06.pdf](https://www.fao.org/es/esc/common/ecg/192/en/BAN_STAT_06.pdf). Acesso em: 15 mar 2011.

FERNANDES, M. F., FERNANDES, R. P. M., HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 38, n. 8, p. 911-920, 2003.

FERNANDES, G. C., SOUZA, J. A. M., CAMPANHARO, J. C. Uso da técnica BOX-PCR na caracterização molecular de isolados rizosféricos de plantas de milho. *Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética*, 2009.

GASPAROTTO, L. (Org.) ; PEREIRA, J. C. R. (Org.) *A cultura da bananeira na região Norte do Brasil*. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica. v. 1. p.310, 2010.

GERMAINE K. J., KEOGH E., RYAN D., DOWLING D. N Bacterial endophyte-mediated naphthalene phytprotection and phytoremediation. *FEMS Microbiol Lett* 296:226–234, 2009.

GRANGE, L. and HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* 36 1389–1398, 2004.

GRAVENA, S. Controle biológico no manejo integrado de pragas. *Pesq. Agropec. bras.*, Brasília, 27 S/N:281 – 299, 1992.

HALLMANN, J. QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFE, J. W., KLOEPPER, J. W. Bacterial

endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HALLMANN, J.; BERG, G. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. *Soil Biology*, Berlin, v. 9, p.15-31, 2006.

HEYDARI, A. & MISAGHI, I. J. The role of rhizosphere bacteria in herbicide-mediated increase in *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling damping-off. *Plant and Soil* 257: 391–396, 2003.

HULTON C. S. J., HIGGINS C. F. and SHARP P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 5:825–834, 1991.

ILYNA, T. S. Miniature Repetitive Mobile Elements of Bacteria: Structural Organization and Properties. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, Vol. 25, No. 4, pp. 139–147, 2010.

KIM, T., CHO, S., HAN, J., SHIN, Y. M., LEE, H. B., KIM, S. B., (2012) Diversity and Physiological Properties of Root Endophytic Actinobacteria in Native Herbaceous Plants of Korea. *The Journal of Microbiology* Vol. 50, No. 1, pp. 50–57, 2012.

LACAVALA, P. T., ARAUJO, W. L., MARCON, J., MACCHERONI, W. JR., AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology* 39, 55–59, 2004.

LIAN, J., WANG, Z., and ZHOU, S. Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infect, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 83-91, 2008.

LIRA-CADETE, L., FARIA, A. R. B., SOUZA, A. P., COSTA, D. P., FREIRE, F. J., KUKLINSKY-SOBRAL, J., Variabilidade Genética de Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas de Cana-de-Açúcar Capazes de Solubilizar Fosfato Inorgânico. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 28, Supplement 1, p. 122-129, Mar. 2012.

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*, Boca Raton, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOPES, E. A. G. L. Controle biológico de *Botrytis cinera* in vitro em mudas de *Eucalyptus* sp. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2001.

MA, Y., PRASAD, M. N. V., RAJKUMAR, M., FREITAS, H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* 29, 248–258, 2011.

MARCON, J. Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus* spp. e interação com *Xyella fastidiosa*. 150 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção “in vitro” para controle microbiológico. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 1, p. 369–409, 1993.

MARÍN D. H., ROMERO R. A., GUZMÁN, M., SUTTON, T. B. Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. *Plant Disease* / Vol. 87 No. 3, 2003.

MARTIN B, HUMBERT O, CAMARA M, GUENZI E, WALKER J, MITCHELL T, ANDREW P, PRUDHOMME M, ALLOING G, HACKENBECK R, MORRISON DA, BOULNOIS G. J., CLAVERYYS J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3479-3483, 1992.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L. C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO A.M. *Micologia: avanços no conhecimento*. 1ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, p.129-140, 2007.

MIYAMOTO, T., KAWAHARA, M., MINAMISAWA, K. Novel Endophytic Nitrogen-Fixing Clostridia from the Grass *Miscanthus sinensis* as Revealed by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 6580–6586, 2004.

MONDAL, K. K., and MANI C. ERIC-PCR-Generated Genomic Fingerprints and Their Relationship with Pathogenic Variability of *Xanthomonas campestris* pv. *punicae*, the Incitant of Bacterial Blight of Pomegranate. *Curr Microbiol* 59:616–620, 2009.

MONTAÑEZA, A., BLANCO, A. R., BARLOCCO, C., BERACOCHEA, M., SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology* 58 21– 28, 2012.

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

PAL, K. K. and GARDENER B. M. *Biological Control of Plant Pathogens*. The Plant Health Instructor. 2006.

PILLAY, V. K.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature and genotype effectson in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p. 354- 36, 1997.

PIMENTEL, M. R., MOLINA, G., DIONÍSIO, A. P., MARÓSTICA, M. R. J., PASTORE, G. M. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. *Biotechnology Research International*. 2011.

PROCÓPIO R. E. L., ARAÚJO W. L., MACCHERONI Jr W. and AZEVEDO J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. *Genetics and Molecular Research* 8 (4): 1408-1422, 2009.

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

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS J. D.; DE BRUIJN F. J. *Molecular microbial ecology manual*. 1 ed. Dordrecht: Kluwer. p. 1- 26, 1998.

REITER, B., BURGMANN, H., BURG, K., and SESSITSCH, A. Endophytic nifH gene diversity in African sweet potato. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 9, p. 549-555, 2003.

RODRIGUES, K., Identificação, Produção de Antimicrobianos e Complexos Enzimáticos

isolados de Actinomicetos. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.

ROHLF, F. J. (2002). NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.1. Exeter Publishing, Setauket, NY.

RUBINI, M. R., SILVA-RIBEIRO, R. T., POMELL, A. A. W. V., MAKI, C. S., ARAÚJO, W. L., SANTOS, D. R. D., 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. *Int J Biol Sci* 1:24-33, 2005.

RYAN, R. P, GERMAINE, K. J, FRANKS A, RYAN DJ, DOWLING D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Letters*. Ireland, v. 278:1–9, 2008.

SCHLOSS, P. D. and HANDELSMAN, JO Introducing SONS, a Tool for Operational Taxonomic Unit-Based Comparisons of Microbial Community Memberships and Structures Applied and Environmental Microbiology, p. 6773–6779, 2006.

SILVA, K. S., REBOUÇAS, T. N. H., BOMFIM, M. P., SILVA, D. S., JOSÉ, A. R. S., BENETT, G. S. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

STOLZFUS J. R., SO R, MALARVITHI P. P., LADHA J. K., DE BRUIJN F. J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 194, p. 25-36, 1997.

STROBEL, G., DAISY, B., CASTILLO U., HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, Vol. 67, No. 2, 2004.

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

SUN, L., QIU, F., ZHANG, X., DAI, D., DONG, X., SONG, W. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microb Ecol* 55:415–424, 2008.

SWAIN, M. R., and RAY, R. C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research* 164 121—130, 2009.

TEIXEIRA, M. A., MELLO, I. S., VIEIRA, R. F., COSTA, F. E. C., HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, 2007.

THOMAS, P., SWARNA, G. K., ROY, P. K., PATIL, P. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 93:55–63, 2008.

THOMAS, P., and SOLY, T. A. Endophytic Bacteria Associated with Growing Shoot Tips of Banana (*Musa sp.*) cv. Grand Naine and the Affinity of Endophytes to the Host. *Microb Ecol* 58:952–964, 2009.

TORRES, A. R., ARAÚJO, W. L., CURSINO, L., HUNGRIA, M., PLOTTEGHER, F., MOSTASSO, F. L., AZEVEDO, J. L. Diversity of Endophytic Enterobacteria Associated with Different Host Plants. *The Journal of Microbiology*, p. 373-379, 2008.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, Houston, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

WEYENS N., VAN der LELIE D., ARTOIS T., SMEETS K., TAGHAVI S., NEWMAN L., CARLEER R., VANGRONSVELD J. Bioaugmentation with engineered endophytic bacteria improves contaminant fate in phytoremediation. *Environ Sci Technol* 43:9413–9418, 2009.

WEBER, O. B., MUNIZ, C. R., VITOR A. O., FREIRE, F. C. O., OLIVEIRA V. M., Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on plantlets of banana 'Maça'. *Plant Soil* 298:47–56, 2007 .

YANG, H., VINOPAL, R. T., GRASSO, D., SMETS, B. F. High Diversity among Environmental *Escherichia coli* Isolates from a Bovine Feedlot. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 1528–1536 Vol. 70, No. 3. 2004.

YATES I. E, BACON C. W, HINTON D. M. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Dis* 81:723–728, 1997.

ZHANG, Y. Z., WANG, E. T., LI, M., LI, Q. Q., ZHANG, Y. M., ZHAO, S. J., JIA, X. L.,

ZHAN, L. H., CHEN, W. F., CHEN, W. X. Effects of rhizobial inoculation, cropping systems and growth stages on endophytic bacterial community of soybean roots. *Plant Soil* 347:147–161, 2011.

ZHENG, Y., XUE, Q. Y., XU, L. L., XU, Q., LU, L., GU, C., GUO, J. H. A screening strategy of fungal biocontrol agents towards *Verticillium* wilt of cotton. *Biological Control*, 56 209–216, 2011.

ZINNIEL, D. K. LAMBRECHT, P., HERRIS, 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*, Nebraska, v. 69, p. 2198-2208, 2002.