Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplane com *Eucalyptus*

Anderson Ferreira

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba

2008

Anderson Ferreira

Biólogo

Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplano com *Eucalyptus*

Orientador:

Prof. Dr. **WELINGTON LUIZ DE ARAÚJO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento
de Plantas

Piracicaba

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Ferreira, Anderson

Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplane com *Eucalyptus* / Anderson
Ferreira. - - Piracicaba, 2008.

77 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. Ecologia microbiana 3. Eucalipto 4. Fungos fitopatogênicos
Microrganismos endofíticos I. Título

5

CDD 634.9734

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A minha esposa Fátima pelo amor,... tudo.

DEDICO

*Aos meus pais Antonio e Nedi
e aos meus irmãos Clederson e Peterson,
pelos ensinamentos, amor e alegria.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A vida que nos é dada traz consigo tudo que precisamos aprender e, não há do que reclamar, é preciso agradecer e semear sempre novos campos aonde abundantemente vamos colher. Então agradeço...

A minha família pelo apoio, amor incondicional e principalmente por não deixar a distância interferir nos ensinamentos que me foram passados: *humildade e respeito sem nunca desistir do objetivo;*

Companheirismo, amor, respeito, alegria, compreensão, ajuda e persistência são algumas palavras que podem ser utilizadas para definir a minha querida esposa Fátima: *você faz minha vida mais feliz;*

Ao CNPq e CAPES pela concessão de bolsas e pelo financiamento do material de pesquisa;

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo, pela orientação e fundamental colaboração na execução desse trabalho e na minha formação.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela amizade e ensinamentos no laboratório;

À Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho;

A empresa SUZANO Papel e Celulose pelo apoio logístico e financeiro na condução deste trabalho, principalmente aos Drs. Esteban Gonzáles e Shinitiro Oda pelo apoio e valiosas dicas.

As pessoas que são os principais responsáveis pela base da minha formação acadêmica e profissional, Dr. Fernando Adami Tcacenco (Epagri), Dra. Laura Isabel Weber da Conceição (Univali e Nupem) e Dr. André Oliveira Souza Lima (Univali).

Aos funcionários e colegas do Departamento de Genética da ESALQ/USP;

A todos os colegas de trabalho que fazem parte ou passaram pelo laboratório de genética de microrganismos: Ademir Durrer, Aldo Procópio, Aline S. Romão, Alessandro Riffel, Ana Paula Pallu, Andrea Bogas, Armando Dias, Carlos Ivan Aguilar, Cláudia Gai, Cristina S. Maki, Danice Luvizotto, Fernanda Bernardes, Fernanda Bueno, Fernanda Sebastianes, Fernando Andreote, Francisco Andreote, Joelma Marcon, José Antonio da Silva (vulgo Zezo), Léa Fávaro, Manuella Dourado, Maria Beatriz Calderan, Maria Carolina Quecine, Marise Suzuki, Michele Silva, Paulo Lacava, Priscilla Rossetto, Renata Assis, Ricardo Yara, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Uira Belmonte, Vanessa de Cássia, Vanderlei Varizi (veia) e Viviane Colombari pela alegria, amizade e discussões.

Ao Dr. Mateus Mondin e Dra. Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar-Perecin pelos ensinamentos, principalmente em microscopia de fluorescência, e pelas facilidades concedidas quando do uso do microscópio de fluorescência e do Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas da ESALQ;

A Silvia Menuzzo e Andressa Góis do Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas da ESALQ pela amizade, ajuda e dicas quando do uso do laboratório;

Ao Laboratório de Genética de Leveduras pelas facilidades quando do uso de equipamentos e estrutura;

Ao Laboratório de Bioquímica de Plantas pelas facilidades concedidas quando do uso de equipamentos e estrutura;

Lembre-se que um bom “guerreiro” compartilha com o outro o que sabe do caminho.

Quem ajuda sempre é ajudado, e precisa ensinar o que aprendeu. Por isso ele senta-se ao redor da fogueira e conta como foi seu dia de luta.

Um amigo sussurra: “por que falar tão abertamente de sua estratégia? Não vê que, agindo assim, corre o risco de ter que dividir suas vitórias com os outros?”.

O “guerreiro” apenas sorri, e não responde. Sabe que, se chegar ao final da jornada num paraíso vazio, sua luta não terá valido a pena. (Paulo Coelho).

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Revisão de literatura.....	13
1.1.1 Microrganismos endofíticos	13
1.1.2 <i>Ceratocystis fimbriata</i>.....	15
1.1.3 Biologia molecular no estudo de ecologia microbiana.....	17
Referências.....	19
2 COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AS RAÍZES DE <i>Eucalyptus</i>	
INFECTADO POR <i>Ceratocystis fimbriata</i>, AGENTE CAUSAL DO	
CANCRO.....	28
Resumo.....	28
Abstract.....	29
2.1 Introdução.....	30
2.2 Desenvolvimento.....	32
2.2.1 Material e métodos.....	32
2.2.1.1 Material vegetal.....	32
2.2.1.2 Isolamento das comunidades bacterianas associadas as raízes.....	33
2.2.1.2.1 Isolamento de bactérias do rizoplane.....	33
2.2.1.2.2 Isolamento de bactérias endofíticas de raiz.....	34
2.2.1.3 Amplificação do gene 16S rRNA de colônias bacterianas.....	34
2.2.1.4 Caracterização dos isolados por ARDRA (Análise de restrição do rDNA	
amplificado)	35
2.2.1.5 Sequenciamento e análise do gene 16S rRNA.....	35
2.2.1.6 Extração de DNA total a partir de amostras do rizoplane e das raízes.....	36
2.2.1.7 Amplificação e Análise por DGGE.....	36
2.2.2 Resultados.....	37
2.2.2.1 Isolamento e caracterização molecular da comunidade bacteriana do	
rizoplane.....	37

2.2.2.2 Isolamento e caracterização molecular da comunidade bacteriana endofítica de raiz.....	40
2.2.2.3 Análise da diversidade bacteriana por DGGE.....	43
2.2.3 Discussão.....	46
Referências.....	50
3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE <i>Eucalyptus</i> sp. E A COLONIZAÇÃO DE PLÂNTULAS POR <i>Pantoea agglomerans</i>.....	58
Resumo.....	58
Abstract.....	59
3.1 Introdução.....	60
3.2 Desenvolvimento.....	61
3.2.1 Material e métodos.....	61
3.2.1.1 Plantas e microrganismos utilizados.....	61
3.2.1.2 Germinação das sementes e obtenção das plântulas.....	62
3.2.1.3 Isolamento de bactérias endofíticas das sementes e das plântulas.....	62
3.2.1.4 Amplificação do gene 16S rRNA de colônias bacterianas.....	63
3.2.1.5 Análise da diversidade por ARDRA (<i>Amplified rDNA restriction analysis</i>).....	63
3.2.1.6 Sequenciamento e análise do gene 16S rRNA.....	64
3.2.1.7 Inoculação das sementes e reisolamento de <i>Pantoea agglomerans</i> 33.1: <i>gfp</i>	64
3.2.1.8 Microscopia de fluorescência	65
3.2.1.9 Análises estatística.....	65
3.2.2 Resultados.....	65
3.2.2.1 Isolamento e identificação das bactérias endofíticas nativas.....	65
3.2.2.2 Colonização das plântulas por <i>Pantoea agglomerans</i> 33.1: <i>gfp</i>	66
3.2.3 Discussão.....	67
Referências.....	71
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77

RESUMO

Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplane com *Eucalyptus*

Os microrganismos endofíticos são aqueles, cultiváveis ou não, que habitam o interior da planta hospedeira sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis. Essa interação microrganismos-planta é intrínseca a determinadas espécies de plantas e/ou bactérias. Nas últimas décadas os estudos de microrganismos endofíticos têm sido realizados em diversas plantas hospedeiras, sendo esses estudos direcionados principalmente para a diversidade e características benéficas induzidas, inclusive o controle biológico de doenças. A doença causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* é considerada emergente no setor florestal. O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de eucalipto e a expansão do setor juntamente com o cultivo clonal tem acarretado o aumento da incidência de patógenos. O surgimento de novas doenças exige estudos relacionados tanto a interação do agente patogênico com hospedeiro quanto de todos os componentes do patossistema. Neste contexto, os microrganismos endofíticos têm sido descritos como potenciais controladores biológicos de doenças. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a interação de *C. fimbriata* com a comunidade bacteriana associada à *Eucalyptus* sp. Adicionalmente, foi estudada a possível transferência desses endófitos via sementes e o padrão de colonização de *Pantoea agglomerans* em plântulas. Foi observado que plantas não infestadas por *C. fimbriata* apresentaram maior densidade bacteriana no rizoplane (20,66 x 10⁴ UFC.cm⁻² de raiz), enquanto que para a comunidade endofítica, a maior densidade foi observada em plantas infectadas pelo fungo (25,13 x 10⁴ UFC.g⁻¹ de raiz). As análises por ARDRA possibilitaram a obtenção de 8 e 13 ribotipos nas comunidades endofítica de raiz e do rizoplane, respectivamente. Os ribotipos mais frequentes foram identificados como *Bacillus cereus*. As análises de diversidade por meio de DGGE das comunidades do rizoplane e endofítica de raiz mostraram que a infestação pelo fungo interfere na colonização de *Eucalyptus*. Foi observado também que bactérias endofíticas estão presentes no interior de sementes de *Eucalyptus* spp. em uma densidade de 0,33 a 1,83 X 10² UFC.g⁻¹, para as espécies *E. camandulensis* e *E. urophylla*, respectivamente. A densidade bacteriana endofítica de plântulas obtidas de sementes desinfetadas superficialmente variaram entre 0,27 X 10² a 0,87 X 10² UFC.g⁻¹, para *E. citriodora* e o híbrido *E. robusta* x *E. grandis*, respectivamente. Em algumas espécies de *Eucalyptus* não foram isoladas bactérias endofíticas das sementes e plântulas. Os resultados mostraram que algumas espécies de bactérias endofíticas podem ser transmitidas verticalmente por sementes. *P. agglomerans* inoculada nas sementes foi capaz de colonizar as plântulas após a germinação da semente, indicando que esta pode ser uma das formas utilizadas pelos microrganismos para colonizar e se estabelecer na planta hospedeira. Assim, os resultados obtidos neste trabalho mostram ainda que possa existir interação entre a presença de *C. fimbriata* e a comunidade bacteriana endofítica e do rizoplane de *Eucalyptus*. Foi possível observar também que estas bactérias endofíticas que são transmitidas por meio de sementes, permitindo que plântulas previamente inoculadas com bactérias benéficas possam ser produzidas antes de serem levadas a campo.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; 16S rDNA; Interações planta-bactéria; DGGE; Microscopia de fluorescência.

ABSTRACT

Interaction between endophytic and rhizoplane bacteria with *Eucalyptus*

The endophytic microorganisms are those, cultivated or not, that inhabit the interior of the plant host without causing apparent damages or visible external structures. This interaction microorganisms-plant is specific to certain species of plants and/or bacteria. In the last few years studies of endophytic microorganisms have been carried out in several plant hosts, being these studies focused mainly to diversity and biotechnological potential, such as biological control of disease. The disease caused by the phytopathogenic fungi *Ceratocystis fimbriata* is considered emerging by the reforestation companies. Brazil is one of the largest world eucalyptus producers and the increasing of the eucalyptus production associated to clonal reproduction has allowed the increase in pathogen incidence. Studies that evaluate the interaction between pathogens and the microbial community associated to the host plant may allow understanding how disease symptoms come up. Endophytic microorganisms have been described as potential biological control of diseases and therefore, the aims of the present work were to i) study the interaction between *C. fimbriata* and the bacterial community associated to the *Eucalyptus* sp.; ii) evaluate the bacterial dissemination by seeds; iii) evaluate the colonization profile of *Pantoea agglomerans* in seedlings after seed inoculation. It was observed that the highest bacterial density on the rhizoplane (20.66×10^4 CFU.cm⁻² of root) was observed in *C. fimbriata* uninfected-plants, while for endophytic community the highest density was observed in *C. fimbriata* infected plants (25.13×10^4 CFU.g⁻¹ of root). The ARDRA analyses showed that the bacterial community of eucalyptus is composed by 8 and 13 ribotypes on rhizoplane and inside the roots (endophytic), respectively. The most frequent ribotypes were identified as *Bacillus cereus*. The DGGE analyses of diversity of endophytic and rhizoplane community showed that fungi infection shift the colonization of *Eucalyptus* associated bacteria. The bacterial community inside *Eucalyptus* spp. seeds ranged from 0.33 to 1.83×10^2 CFU.g⁻¹, for *E. camandulensis* and *E. urophylla*, respectively. After seed germination the endophytic bacterial density in seedlings ranged from 0.27×10^2 to 0.87×10^2 CFU.g⁻¹, for *E. citriodora* and the hybrid *E. robusta* x *E. grandis*, respectively. Although, endophytic bacteria have been isolated from seeds, for some plant species, bacteria were not isolated from seedlings. Also, some bacteria may be vertically transmitted from seed to seedlings, but some is specific for seeds. Seed inoculation of *P. agglomerans* resulted in seedlings colonized by these bacteria, suggesting that these bacteria could be seed transmitted. The results obtained in the present study show that the fungi *C. fimbriata* inside the *Eucalyptus* host can shift the endophytic and rhizoplane bacterial diversity. Also, these endophytic bacteria could be transmitted vertically by seeds, allowing that seeds previously inoculated with beneficial bacteria may result in protected plants before planting in the field.

Keywords: Microbial ecology; 16S rDNA; Plant microbe interactions; DGGE; Fluorescence microscopy.

1 INTRODUÇÃO

O plantio de *Eucalyptus* vem crescendo nas últimas décadas e ocupando posição de destaque na economia mundial. O Brasil possui mais de 3 milhões de hectares plantados, representando aproximadamente 50% da área coberta por florestas exóticas no país. O setor florestal, no qual se inclui o eucalipto, foi responsável por 4,5% do PIB nacional no ano de 2005. No entanto, juntamente com o crescimento da área plantada e conseqüente expansão do cultivo para novas regiões, pode ocorrer a incidência de novos patógenos, a qual pode ser favorecida pela implantação de monoculturas, como por exemplo, o reflorestamento com *Eucalyptus* sp. Dessa forma, à medida que aumenta a incidência de fitopatógenos aumenta também a preocupação acerca dessas doenças, dos agentes causadores, das formas de dispersão e também de estratégias de controle das mesmas.

Dentre as doenças consideradas emergentes na área florestal, alguns autores consideram o cancro e/ou murcha uma das mais graves ameaças às florestas plantadas no mundo. Esta doença é causada pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*, sendo que os primeiros relatos de ataque a *Eucalyptus* foram publicados no ano de 1988. Desde então, as áreas de ocorrência vêm aumentando e estudos recentes alertam para as dificuldades do controle químico da doença devido à plasticidade do fungo e também, às formas de dispersão do mesmo no ambiente.

Dentre as ferramentas alternativas ao controle químico, pode ser citado o controle biológico realizado com uso de microrganismos capazes de combater um determinado fitopatógeno por meio de competição ou produção de compostos antagônicos. Nesse contexto, microrganismos de comunidades do rizoplane e endofítica estão sendo descritos na literatura como benéficos às plantas hospedeiras, inclusive como potenciais controladores biológicos de fitopatógenos. Dentre esses microrganismos destacam-se os endófitos, que são aqueles que habitam o interior da planta hospedeira sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis. Da mesma forma que fitopatógenos, os endófitos apresentam a capacidade de penetrar na planta e colonizar o hospedeiro de forma sistêmica ou localizada, ocupando o mesmo nicho ecológico dentro do hospedeiro. Essa interação microrganismo-planta é intrínseca a determinadas espécies de plantas e/ou bactérias.

Nas últimas décadas os estudos de microrganismos endofíticos têm aumentado de forma consistente, focando principalmente no controle biológico, promoção de crescimento vegetal,

bem como a investigação de padrões de colonização e forma de penetração e transferência desses microrganismos nas plantas.

Para realização de estudos de ecologia microbiana têm sido utilizadas técnicas dependentes e independentes do cultivo bacteriano permitindo um melhor conhecimento sobre a diversidade microbiana. Essas técnicas, embasadas na biologia molecular, tem possibilitado acessar com maior critério e acuracidade a diversidade microbiana, e dessa forma avaliar o efeito de diferentes variáveis nesta diversidade.

Atualmente há pouca informação sobre a interação entre bactérias endofíticas, *Eucalyptus* e fitopatógenos. Muitos estudos têm avaliado bactérias ou plantas individualmente e não a interação entre eles. Porém, quando se está em busca de alternativas de controle biológico de uma doença emergente, como a causada por *C. fimbriata*, há a necessidade de se entender melhor o funcionamento de algumas dinâmicas como: interação planta-patógeno e a interação do patógeno com a comunidade microbiana associada.

Dessa forma, com intuito de entender a interação da comunidade bacteriana endofítica e do rizoplane com *Eucalyptus* e avaliar o seu papel sobre o desenvolvimento da planta e controle do fungo fitopatogênico *C. fimbriata*, o presente trabalho teve como objetivos i) estudar a interação entre as comunidades bacterianas associadas às raízes de *Eucalyptus* e o fitopatógeno *C. fimbriata*; ii) estudar o padrão de colonização de diferentes espécies de *Eucalyptus* sp. por um isolado endofítico de *Pantoea agglomerans* geneticamente modificado; iii) estudar a diversidade de bactérias endofíticas em sementes e plântulas de espécies e híbridos de *Eucalyptus* e a possível transmissão vertical desses microrganismos.

1.1 Revisão de literatura

“Faça o necessário, depois o possível e se ainda der tempo, faça o impossível”

Autor desconhecido

1.1.1 Microrganismos endofíticos

São denominados de endófitos, todos os microrganismos capazes de colonizar, em alguma fase do seu ciclo vida, tecidos vegetais da parte aérea, sem causar danos à planta (CARROLL, 1986), excluindo dessa forma microrganismos micorrízicos. De outra forma, segundo Hallmann et al. (1997), bactérias endofíticas são aquelas isoladas de tecidos vegetais superficialmente desinfetados ou extraídas do interior da planta e que não causam danos aparentes ao hospedeiro. Atualmente, uma definição mais abrangente foi proposta por Azevedo e Araújo (2007), os quais definem endófitos como sendo todo microrganismo, cultivado ou não, que coloniza o interior da planta hospedeira e que não causa danos aparentes e nem forma estruturas externas visíveis. Esses microrganismos podem penetrar e colonizar a planta hospedeira de formas diferentes, tais como: por estômatos, ferimentos e pelas raízes. Em plantas cultivadas no campo, tem sido observado que há tendência de ocorrer maior colonização nas áreas basais dos hospedeiros e menor nos ramos e folhas (FISHER et al., 1992; ELVIRA-RECUENCO e van VUURDE, 2000; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; MENDES et al., 2007).

Embora fungos e bactérias endofíticas colonizem preferencialmente as raízes e caule da planta hospedeira, alguns autores tem relatado a sua presença em sementes, desinfestadas superficialmente, de diversas espécies vegetais (RUDGERS et al., 2004; MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004; JORDAAN et al., 2006; RUDGERS; CLAY, 2007). As espécies normalmente relatadas em sementes já foram descritas como endófitos em outros estudos, como é o caso dos gêneros *Bacillus* e *Methylobacterium* (HOLLAND, 1997; FREYERMUTH et al., 1996; RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR et al., 2007), sugerindo que isolados endofíticos possam colonizar o sistema reprodutor da planta hospedeira e serem transmitidos verticalmente via sementes. O melhor entendimento dos mecanismos de penetração, aliado ao conhecimento

dos perfis de colonização das plantas hospedeiras podem ser decisivos na ampliação do uso dos endófitos na agricultura.

Dentre as aplicações desses microrganismos na agricultura podem ser destacadas características benéficas ao hospedeiro tais como maior resistência em condições de estresse; alterações nas condições fisiológicas; produção de fitohormônios e outros componentes de interesse biotecnológico (como enzimas e fármacos). Porém, a maioria dos estudos realizados até o momento tem suas implicações práticas concentradas no potencial dos microrganismos endofíticos para atuar no controle biológico de doenças e insetos-praga, além da promoção de crescimento vegetal (CHANWAY, 1998; AZEVEDO et al., 2000).

Endófitos e fitopatógenos apresentam a capacidade de penetrar na planta e colonizar o hospedeiro de forma sistêmica ou localizada, habitando ativamente o apoplasto (QUADT-HALLMANN et al., 1997), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997) e ocasionalmente, pode ocorrer colonização intracelular (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996). Dessa forma, os endófitos por estarem habitando o mesmo nicho ecológico dos fitopatógenos, podem ser favorecidos como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997). Este controle biológico pode ocorrer, principalmente, devido à atuação direta sobre o patógeno (PAN et al., 1997), por antagonismo (ALTINDAG et al., 2006; KOZDRÓJ et al., 2004), por indução de resistência sistêmica (VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2002; KAVINO et al., 2007) e/ou por competição (MARI et al., 1996). O estudo e uso de microrganismos endofíticos no controle biológico é promissor e o aumento das pesquisas sobre o assunto pode permitir a utilização prática dos conhecimentos gerados. Os microrganismos utilizados podem ser selvagens, ou seja, já possuem em seu genoma os genes que codificam para ações de controle biológico ou serem geneticamente modificados para introdução de genes exógenos. Neste contexto, Kavino et al. (2007) avaliaram a indução de resistência sistêmica em plantas de banana (*Musa* spp.) após inoculação de isolados bacterianos. Segundo os autores, as bactérias foram pré-selecionadas como potenciais biocontroladoras de um vírus que ataca essa cultura.

Estudos utilizando a tecnologia do DNA recombinante estão sendo amplamente utilizados e focados para a transformação genética de microrganismos. Uma das estratégias utilizadas é a introdução de genes exógenos com funções de sinalização, como, por exemplo, para produção de GFP (Proteína verde fluorescente) (KOZDRÓJ et al., 2004). Outra é a introdução de genes que proporcionam ao endófito a capacidade de controlar um determinado patógeno ou induzir

resistência sistêmica na planta hospedeira (DOWNING; THOMSOM, 2000, EASTWEL et al., 2006). Um exemplo de aplicação comercial desses biocontroladores geneticamente modificados é a bactéria endofítica *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, na qual foi introduzido o gene da endotoxina de *B. thuringiensis* (FAHEY et al., 1991; TOMASINO et al., 1995). Esta bactéria engenheirada foi comercializada com o nome de “Incide”, a qual foi utilizada para o controle da broca do milho (*Ostrinia nubilalis*). Foi verificado que a presença deste gene de *B. thuringiensis* em *C. xyli* subsp. *cynodontis* não alterou a capacidade desta bactéria endofítica em colonizar colmos de milho.

Os estudos com microrganismos geneticamente modificados também estão sendo monitorados quanto a possíveis impactos negativos em comunidades bacterianas selvagens (ANDREOTE et al., 2004). O melhor entendimento dessa relação ambiental é importante para manutenção do equilíbrio nos vários nichos ecológicos envolvidos quando do uso da tecnologia do DNA recombinante.

1.1.2 *Ceratocystis fimbriata*

Ceratocystis fimbriata Ellis e Halsted é um fungo ascomiceto peritecial. Esse fungo foi descrito pela primeira vez como agente fitopatogênico, por HALSTED em 1890, atacando tubérculos de batata-doce, mas posteriormente foi observado que este fungo poderia causar injúrias em outras espécies de interesse agrícola e florestais (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005). Nas décadas de 1940 foram observados os primeiros relatos de ataque a espécies arbóreas como murcha do Carvalho (HENRY et al., 1944); o cancro do café (PONTIS, 1951); cancro de *Platanus* sp. (WALTER et al., 1952); e doenças em fruteiras (de VAY et al., 1963). Já, a ocorrência de *C. fimbriata* em espécies arbóreas exóticas cultivadas tem seus primeiros relatos publicados na década de 1980, quando foi observado o cancro e a morte de *Acacia decurrens* no Brasil (RIBEIRO et al., 1988).

Em *Eucalyptus* a ocorrência desse fungo foi relatada a partir de 1998, quando os primeiros casos foram observados no Brasil e na República do Congo (FERREIRA et al., 1999; ROUX et al., 1999). Posteriormente outros trabalhos foram publicados para *E. grandis* em Uganda (ROUX et al., 2001), e no Uruguai (BARNES et al., 2003). Os sintomas freqüentemente observados em plantas atacadas por *C. fimbriata* incluem i) cancrios; ii) murcha generalizada; iii) apodrecimento

de raiz e/ou fruto; iv) obstrução e descoloração vascular (ROUX et al., 2004; ZAUZA et al., 2004; BAKER; HARRINGTON, 2004).

Segundo Ferreira e Milane (2002), o sintoma principal causado por *C. fimbriata* é observado em cortes transversais de ramos e raízes lenhosas, na forma de estrias radiais escuras. Essas estrias aparecem da medula para o exterior do lenho, ou da periferia do lenho para a medula. Outro sintoma característico é a presença de manchas escuras (descoloração) em forma de cunha, geralmente da periferia do lenho para a medula. No entanto, é preciso alguns cuidados, já que, sintomas semelhantes à descoloração podem ser causados também por *Botryosphaeria* (BAKER; HARRINGTON, 2004).

A plasticidade de *C. fimbriata* parece ser grande, visto que a quantidade de espécies vegetais que pode servir de hospedeira, formas de dispersão e as dificuldades de controle químico são os principais problemas observados. O setor de reflorestamento com *Eucalyptus*, está preocupado com a rápida disseminação de *C. fimbriata*, pois de acordo com Zauza et al. (2004), na África e América do Sul, a mortalidade de plantas já ganhou dimensões significativas em algumas plantações.

Dessa forma tem sido observado um aumento em estudos genético-moleculares com *C. fimbriata*, os quais estão sendo realizados com objetivo de entender melhor os aspectos da biologia, comportamento e genética do fungo, bem como da interação deste fungo com seu hospedeiro. Neste contexto, tem sido avaliada a diversidade genética entre isolados de diferentes regiões do mundo (WITTHUHN et al., 1999; BAKER et al., 2003; ENGELBRECHT et al., 2004; BARNES et al., 2005); o impacto da ocorrência do fungo em florestas naturais de *Eucalyptus* (BURGESS; WINGFIELD, 2002); a virulência de *C. fimbriata* e plantas resistentes (ZAUZA et al., 2004) e o desenvolvimento de metodologias para detecção de *C. fimbriata* em lenho de *Eucalyptus* infectado (FERREIRA et al., 2005).

Porém, não estão sendo realizados estudos de interação *C. fimbriata* com outros microrganismos, e principalmente de que forma esta interação pode resultar no controle ou diminuição dos sintomas causados por esse fungo. Esses estudos investigatórios e de ecologia microbiana podem ser de grande valia na busca por inimigos naturais do fungo e até na busca direta por potenciais agentes de controle biológico do mesmo.

1.1.3 Biologia molecular no estudo de ecologia microbiana

As técnicas normalmente utilizadas para avaliar a comunidade endofítica de plantas são baseadas em isolamentos em meios de cultivo. Essa forma de estudo dificulta a obtenção e acesso aos microrganismos que não crescem nas condições utilizadas, dificultando uma análise global da comunidade bacteriana. Devido a isso, estudos têm mostrado que apenas uma pequena porção da diversidade microbiana total é acessada por meio das técnicas baseadas em cultivo (TYSON; BANFIELD, 2005), restringindo, dessa forma, os estudos a grupos microbianos já conhecidos.

Com intuito de reduzir as dificuldades decorrentes de métodos dependentes do cultivo o interesse tem sido focalizado no desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Essas técnicas podem permitir o estudo de endófitos em seu habitat natural, ou ainda, o estudo de diferentes populações endofíticas presentes na planta hospedeira. Neste contexto, as análises do 16S rDNA tem sido largamente utilizadas, principalmente em bactérias, para o estudo de microrganismos no ambiente (LOUWS et al, 1999; ANDREOTE et al., 2006; LACAVA et al., 2006; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005; ANDREOTE, 2007).

A amplificação do 16S rDNA por PCR permite realizar análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA), a qual consiste na digestão do rDNA com enzimas de restrição e posterior separação dos mesmos por eletroforese em géis de agarose. O polimorfismo dos perfis de bandas (ribotipos) observados nos géis pode ser utilizado para estudos de filogenia ou agrupamento genotípico de isolados bacterianos (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Adicionalmente, o 16S rDNA depois de amplificado e seqüenciado, pode ser analisado em diferentes bases de dados, permitindo a identificação dos isolados.

Das metodologias baseadas no 16S rDNA para o estudo de populações microbianas, o DGGE (Gradiente Desnaturante em Gel de Eletroforese), possibilita realização de análises independentes do cultivo dos isolados em meios de cultura. Essa técnica permite identificar diferenças baseadas na desnaturação da dupla fita de DNA em um ambiente desnaturante crescente, onde se separam fragmentos chamados de domínios de desnaturação (MUYZER et al., 1993). A T_m (temperatura de desnaturação) de domínios individuais é específica para cada seqüência. Quando a T_m de um domínio menor é alcançado, o DNA se torna parcialmente

desnaturado criando moléculas ramificadas, com menor mobilidade em géis de poliacrilamida. No DGGE, o ambiente desnaturante é criado pela combinação uniforme de temperatura de corrida variando entre 50 e 65°C e um gradiente desnaturante linear de uréia e formamida (ANDREOTE, 2007).

O DGGE pode ser utilizado tanto para estudos de diversidade bacteriana total, utilizando conjuntos de iniciadores chamados “universais” para o 16S rDNA (HEUER, 1997), quanto para estudar grupos bacterianos específicos como alfa e beta proteobacteria e actinomicetos (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001).

A plasticidade dessa técnica e amplitude de aplicações tem difundido cada vez mais a sua utilização em estudos de ecologia microbiana. Essa técnica também tem sido largamente difundida por permitir a avaliação dessa diversidade em diferentes habitats naturais, permitindo detectar variações na comunidade microbiana em ambientes contaminados com agroquímicos (FANTROUSSI et al., 1999), poluídos (BRIM et al., 1999), com restrição nutricional e fisiológica da planta hospedeira (HENCKEL et al., 1999; YANG; CROWLEY, 2000), para estudar a comunidade microbiana associada a plantas (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005) e para estudar a interação entre comunidades bacterianas endofíticas e fitopatógenos (ARAÚJO et al., 2002; ANDREOTE et al., 2006). Outro ponto a ser destacado é a alta reprodutibilidade dos dados obtidos, o que permite o processamento de um grande número de amostras em um tempo reduzido, aspectos ideais para estudos ambientais e de ecologia microbiana (MUYZER; SMALLA, 1998).

O uso dessas ferramentas moleculares possibilita avaliar tanto as comunidades bacterianas cultivadas, quanto as não cultivadas nos meios de cultura normalmente utilizados para estudá-los. Dessa forma, a biologia molecular pode auxiliar no estudo de microrganismos e permitir avaliar as interações de bactérias endofíticas, geneticamente modificadas ou não, com as plantas hospedeiras sob diferentes condições ambientais.

Referências

ALTINDAG, M.; SAHIN, M.; ESITKEN, A.; ERCISLI, S.; GULERYUZ, M.; DONMEZ, M.F.; SAHIN, F. Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholdria*, and *Pseudomonas* application under *in vitro* and *in vivo* conditions. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 369–372, 2006.

ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S. VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada as plantas**. 2007. 201 p. (Tese de Doutorado, Genética e melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W. JR.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB - Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, 2000.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plant. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Eds.) **Fungi: Multifaceted Microbes**, New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. chap. 6, p. 189-207.

BARNES, I.; NAKABONGE, G.; ROUX, J.; WINGFIELDAND, B.D.; WINGFIELD, M.J. Comparison of populations of the wilt pathogen *Ceratocystis Albifundus* in South Africa and Uganda. **Plant Pathology**, London, v. 54, p. 189–195, 2005.

BARNES, I.; ROUX, J.; WINGFIELD, B.D.; O’NEIL, M.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. **Australasian Plant Pathology**, London, v. 32, p. 361-366, 2003.

BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C.; KRAUSS, U.; ALFENAS, A.C. Genetic variability and host specialization in the Latin America clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 1274-1284, 2003.

BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C. *Ceratocystis fimbriata*. Surrey, CABI Publishing, 2004.

BRIM, H.; HEUER, H.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; MERGEAY, M.; SMALLA, K. Characterization of bacterial community of a zinc-polluted soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 326-338, 1999.

BURGESS, T.; WINGFIELD, M.J. Impact of fungal pathogens in natural forest ecosystems: a focus on *eucalyptus*. In: SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K.W.; BARRETT, R.L.(Eds). **Microorganisms in Plant Conservation & Biodiversity**. Kluwer: Academic Publishers, 2002, p. 285-306.

CARROLL, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema, N.J, Heuvel, J. Van den, Eds. **Microbiology of Phyllosphere**, London: Cambridge University Press: 1986, p. 205-222.

CHANWAY, C.P. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. **Sydowia**, Horn, v. 50, p. 149-170, 1998.

DE VAY, J.E.; LUKEZIC, F.L.; ENGLISH, W.H.; TRUJILLO, E.E. *Ceratocystis* canker of stone fruit trees. **Phytopathology**, Lancaster, v. 53, p. 873, 1963.

DOWNING, K.J.; THOMSON, J.A. Introduction of the *Serratia marcescens* *chiA* gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 363-369, 2000.

EASTWELL, K.C.; SHOLBERG, P.L.; SAYLER, R.J. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. **Crop Protection**, Guildford, v. 25, p. 1191-1200, 2006.

ELVIRA-RECUENCO, M.; van VUURDE, J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 1036-1041, 2000.

ENGELBRECHT, C.J.B.; HARRINGTON, T.C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia**, New York, v. 97, p. 57-69, 2005.

ENGELBRECHT, C.J.B.; HARRINGTON, T.C.; STEIMEL, J.; CAPRETTI, P. Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 2995-3005, 2004.

FAHEY, J.W.; DIMOCK, M.B.; TOMASINO, S.F.; TAYLOR, J.M.; CARLSON, P.S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study in industry. In: **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer –Verlag, 1991, p. 401-411.

FANTROUSSI, S.E.L.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP E. M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 982-988, 1999.

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

FREYERMUTH, S.K.; LONG, R.L.G.; MATHUR, S. Metabolic aspects of plant interaction with commensal methylotrophs. In: LIDSTROM, M.E.; TABITA, F.R. (Eds). **Microbial growth on C1 compounds**. Kluwer: The Netherlands, 1996, p. 277-284.

FERREIRA, F.A.; DEMUNER, A.M.; DEMUNER, N.L. & PIGATTO, S. Murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto no Brasil (Abstr.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 24, p. 284, 1999.

FERREIRA, F.A.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.A. Detecção rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infetado de eucalipto, mangueira e outros hospedeiros lenhosos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 30, p. 543-545, 2005.

FERREIRA, F.A.; MILANE, D. Diagnose visual e controle de doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. **International Paper**, Mogi-Guaçu, 2002.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONCA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 167-180, 2001.

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

HENRY, B.W.; MOSES, C.S.; RICHARDS, C.A.; RIKER, A.J. Oak Wilt: its significance, symptoms, and cause. **Phytopathology**, Lancaster, v. 34, p. 636–47, 1944.

HENCKEL, T.; FRIEDRICH, M.; CONRAD, R. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1980-1990, 1999.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HOLLAND, M.A. *Methylobacterium* in plants. **Recent Research Development**, Trivandrum, v. 1, p. 207-213, 1997.

JORDAAN, A.; TAYLOR, J.E.; ROSSENKHAN, R. Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods of *Colophospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 72, p. 245-255, 2006.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; DAMODARAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; SAMIYAPPAN, R. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1087-1098, 2007.

KOZDRÓJ, J.; TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1775–1784. 2004.

KUKLINSKY-SOBRA, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUKLINSKY-SOBRA, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, The Hague, v. 273, p. 91-99, 2005.

LACAVA, P.T.; LI, W.B.; ARAUJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; HARTUNG, J.S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 535-541, 2006.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MARI, M.; GUIZZARDI, M.; PRATELLA, G. C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v.7, p. 30-37, 1996.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, P.7259 – 7267, 2007.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; NAKASHIMA, H. Endophyte transmission via seeds of *Lolium perenne* L.: immunodetection of fungal antigens. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 534-541, 2004.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16s Ribosomal RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

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

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**, Berlim, v. 145, p. 479-486, 1997.

PONTIS, R.E. A canker disease of the coffee tree in Colombia and Venezuela. **Phytopathology**, Lancaster, v. 41, p. 179-184, 1951.

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

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

RUDGERS, J.A.; CLAY, K. Endophyte symbiosis with tall fescue: How strong are the impacts on communities and ecosystems? **Fungal Biology Reviews**, 2007. In Press.

RUDGERS, J.A.; KOSLOW, M.; CLAY, K. Endophyte fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, Oxford, v. 7, p. 42-51, 2004.

RIBEIRO, I.J.A.; ITO, M.F.; FILHO, O.P.; DECASTRO, J.P. Gomose da *Acacia-negra* causada por *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **Bragantia**, Campinas, v. 47, p. 71-74, 1988.

ROUX, J.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, E.D.; BOUILLETT, J.P.; ALFENAS, A.C. A serious new disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. **Forest Pathology**, Berlim, v. 30, p. 175-184, 1999.

ROUX, J.; COUTINHO, T.A.; MUJUNI BYABASHAIJA, D.; WINGFIELD, M.J. Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 97, p. 16-18, 2001.

ROUX, J.; WYK, M. VAN; HATTING, H.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. **Plant Pathology**, London, v. 53, p. 414-421, 2004.

RYU, C.M.; KIM, J.; CHOI, O.; KIM, S.H.; PARK, C.S. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 282-289, 2006.

SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 25-29, 2007.

TOMASINO, S.F.; LEISTER, R.T.; DIMOCK, M.B.; BEACH, R.M.; KELLY, J.L. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene *cryIA(c)* of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 442-448, 1995.

TYSON, G.W.; BANFIELD, J.F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 411-415, 2005.

ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C.; HARRINGTON, T.C.; MIZUBUTI, E.S.; SILVA, J.F. Resistance to *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis frimbiata*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 758-760, 2004.

WALTER, J.M.; REX, E.G.; SCHREIBER, R. The rate of progress and destructiveness of canker stain of plane trees. **Phytopathology**, Lancaster, v. 42, p. 236-239, 1952.

WITTHUHN, R.C.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.; HARRINGTON, T.C. PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis sensu stricto*. **Mycological Research**, Oxford, v. 100, p. 743-749, 1999.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 345-351, 2000.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent *pseudomonas* against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 1-10, 2002.

2 COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AS RAÍZES DE *Eucalyptus* INFECTADO POR *Ceratocystis fimbriata*, AGENTE CAUSAL DO CANCRO

Resumo

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de eucalipto e com o crescimento de área plantada no país e conseqüente expansão do cultivo para novas regiões, pode ocorrer um aumento na incidência de novos patógenos, entre estes o fungo *Ceratocystis fimbriata*, o qual tem sido considerado um fitopatógeno emergente na área florestal. Os microrganismos endofíticos colonizam o interior de plantas sem causar danos aparentes e têm sido estudados em muitos hospedeiros devido à capacidade destes microrganismos em promover o crescimento vegetal e proteger a planta hospedeira de pragas e doenças. Os endófitos e os fitopatógenos são capazes de penetrar na planta e colonizar o hospedeiro de forma sistêmica ou localizada e isso pode estar relacionado com a diversidade ou possibilitar ações de controle biológico. Dessa forma, o presente trabalho teve com objetivo avaliar a interação entre o fungo *C. fimbriata* e bactérias associadas às raízes de eucalipto. Para isso, foram estudadas comunidades do rizoplane e endofítica de quatro tratamentos com diferentes níveis de infestação pelo fungo patogênico. A diversidade bacteriana associada às plantas foi acessada por métodos dependentes de cultivo seguido da caracterização genotípica por ARDRA e identificação dos ribotipos por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Adicionalmente, diversidade bacteriana foi caracterizada por DGGE. Foi observado que plantas não infestadas por *C. fimbriata* apresentaram maior densidade bacteriana no rizoplane ($20,66 \times 10^4$ UFC.cm⁻² de raiz) enquanto a comunidade bacteriana endofítica apresenta uma maior densidade em plantas infectadas pelo fungo ($25,13 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de raiz). As análises por ARDRA possibilitaram a obtenção de 8 e 13 ribotipos nas comunidades endofítica de raiz e do rizoplane, respectivamente. Foi observado que *Bacillus cereus* é a bactéria mais freqüente na comunidade amostrada, mas não apresentou interação com *C. fimbriata*, o qual parece apresentar uma correlação negativa com *Pseudomonas fluorescens*, *P. veronii* e *Rahnella aquatilis*. As análises de diversidade por meio de DGGE das comunidades do rizoplane e endofítica de raiz mostraram que a infestação pelo fungo interfere na diversidade bacteriana associada à *Eucalyptus*. Os resultados obtidos neste trabalho, além de comprovar a interação entre os fatores patógeno e endófitos, são de grande importância no direcionamento de futuros estudos relacionados ao uso de microrganismos endofíticos ou do rizoplane no controle de *C. fimbriata*.

Palavras-chave: Interações planta-bactéria; 16S rDNA; DGGE.

BACTERIAL COMMUNITY ASSOCIATED TO *Eucalyptus* ROOTS INFECTED BY *Ceratocystis fimbriata*, CAUSAL AGENT OF CANKER

Abstract

Brazil is one of the largest world eucalyptus producers and the cultivation area is increasing, resulting the industry expansion and cultivation in new regions. Also, the incidence of new pathogens is expected, and among these *Ceratocystis fimbriata*, which is considered an emerging phytopathogen. The endophytic microorganisms colonize the plants interior without causing apparent damages and have been studied in many hosts by ability of these microorganisms to promote plant growth and to protect the plant host against pest and diseases. Endophytes and phytopathogens are able to penetrate into the host plant and than colonize the host systemically or localized. This related behavior may allow the application of endophytic bacteria to control phytopathogens. Therefore, the aims of the present study were to study the diversity of bacterial communities of rhizoplane and root interior (endophytic) of *C. fimbriata* infected and uninfected-plants. For this, rhizoplane and endophytic communities of four plant categories with different *C. fimbriata* infection levels were studied. The plant associated bacterial diversity was accessed by isolation method followed by genotypic characterization by ARDRA and 16S rDNA sequencing. Additionally, the bacterial diversity was studied by DGGE. It was observed that uninfected-plants presented the highest bacterial density on rhizoplane (20.66×10^4 CFU.cm⁻² of root), while the endophytic bacterial community showed the highest density inside infected-plants (25.13×10^4 CFU.g⁻¹ of root). Eight and 13 ARDRA ribotypes were observed in endophytic and rhizoplane communities, respectively, being *Bacillus cereus* the most frequent bacterium. The frequency of this bacterium was not dependent of the presence of *C. fimbriata*, which may be related with *Pseudomonas fluorescens*, *P. veronii* and *Rahnella aquatilis*. The DGGE analyses of the endophytic and rhizoplane communities showed that the fungus infection interferes in the *Eucalyptus* associated bacterial diversity. The results obtained in the present work provide some new information about the microbial interaction associated to *Eucalyptus* plants, and more studies should be focused in the application of endophytic and rhizoplane communities for biological control of *C. fimbriata*.

Keywords: Plant-bacteria-phytopathogen interaction; 16S rDNA; DGGE.

2.1 Introdução

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae* e é composto por mais de 700 espécies distribuídas predominantemente em áreas tropicais e subtropicais. As áreas de cultivo de *Eucalyptus* vêm crescendo nas últimas décadas e ocupando posição de destaque na economia mundial. Os maiores produtores mundiais de eucalipto são Brasil, Índia, África do Sul, Portugal, Angola, Espanha e China (BRACELPA, 2006). O Brasil possui mais de 3 milhões de hectares cultivados, os quais representam aproximadamente 50% da área plantada com florestas exóticas no país (EMBRAPA, 2006).

Juntamente com o aumento da área plantada e conseqüente expansão do cultivo para novas regiões, pode ocorrer a incidência de novos patógenos. Muitas vezes a ocorrência de fitopatógenos é favorecida pela implantação de monoculturas, como por exemplo, o reflorestamento de grandes áreas apenas com *Eucalyptus* sp. Dentre as doenças consideradas emergentes na área florestal, o cancro ou murcha é uma das mais graves ameaças às florestas plantadas no mundo. Esta doença é causada pelo fungo ascomiceto peritecial *Ceratocystis fimbriata* Ellis; Halsted, o qual causa sintomas tais como cancos, murcha generalizada, apodrecimento de raízes e frutos e a obstrução e a descoloração vascular (ROUX et al., 2004; ZAUZA et al., 2004).

Esse fungo foi descrito pela primeira vez como agente fitopatogênico por Halsted em 1890, atacando tubérculos de batata-doce. Já a ocorrência em espécies arbóreas exóticas cultivadas tem seus primeiros relatos publicados na década de 1980, quando foi observado o cancro e a morte de *Acacia decurrens* no Brasil (RIBEIRO et al., 1988). Em *Eucalyptus* spp., a ocorrência de *C. fimbriata* foi relatada a partir de 1998, quando os primeiros casos foram observados no Brasil e na República do Congo (FERREIRA et al., 1999; ROUX et al., 1999). A partir desta data outros trabalhos foram publicados relatando ataques deste fungo na espécie *E. grandis* em Uganda (ROUX et al., 2001) e no Uruguai (BARNES et al., 2003). Desde então, as áreas de ocorrência vêm aumentando e estudos recentes estão sendo realizados com objetivo de melhor entender os aspectos da biologia, comportamento e genética do fungo, bem como da interação com o hospedeiro (WITTHUHN et al., 1999; BURGESS; WINGFIELD, 2002; BAKER et al., 2003; ENGELBRECHT et al., 2004; ZAUZA et al., 2004; BARNES et al., 2005; FERREIRA et al., 2005). De maneira adicional, pode ser sugerida uma interação deste patógeno

com outros fatores componentes deste ecossistema, onde pode ser destacada a possível interação entre patógenos e microrganismos endofíticos.

Microrganismos endofíticos são aqueles fungos ou bactérias, cultiváveis ou não, que colonizam o interior de plantas hospedeiras sem causar danos aparentes e nem formar estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Atualmente os estudos realizados com esses microrganismos estão focados no potencial para o controle de insetos e doenças, além de promoção de crescimento vegetal (AZEVEDO, 2000; KOZDRÓJ; VAN ELSAS, 2000; KAVINO et al 2007).

Os endófitos e os fitopatógenos são capazes de penetrar e colonizar a planta hospedeira de forma sistêmica ou localizada, habitando ativamente o apoplasto (QUADT-HALLMANN et al., 1997), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997; GERMAINE et al., 2004), e ocasionalmente, pode ocorrer colonização intracelular (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996; MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004). Dessa forma, por ocuparem o mesmo nicho que os fitopatógenos, estes microrganismos apresentam potencial como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997; RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR et al., 2007). Este controle biológico pode ocorrer devido a atuação direta sobre o patógeno (PAN et al., 1997), por antagonismo (ALTINDAG et al., 2006; KOZDRÓJ et al., 2004), por meio de indução de resistência sistêmica na planta hospedeira (VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2002; KAVINO et al., 2007) ou por competição (MARI et al., 1996).

As técnicas normalmente utilizadas de isolamento, quando aplicadas para estudar comunidades endofíticas não permitem o acesso de grande parte das espécies microbianas componentes deste nicho, uma vez que nem todas são facilmente cultivadas. Os estudos ficam, desta forma, restritos a grupos bacterianos já previamente isolados e conhecidos. As técnicas de análise de maneira independente de cultivo, dentre elas a análise de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE) têm sido utilizadas para estudar as comunidades microbianas presentes em diferentes ambientes. Análises baseadas no DGGE são descritas na literatura permitindo estudar variações na comunidade microbiana em ambientes contaminados (FANTROUSSI et al., 1999; BRIM et al., 1999), com restrição nutricional e fisiológica da planta hospedeira (HENCKEL et al., 1999; YANG; CROWLEY, 2000), associada às plantas transgênicas (ANDREOTE, 2007), além de interação entre bactérias endofíticas e fitopatógenos (ARAÚJO et al., 2002) e mudança no trato cultural (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2005).

Atualmente há pouca informação na literatura sobre as interações presentes no patossistema microrganismos endofíticos-eucalipto-fitopatógenos. Procópio (2004) estudou a diversidade de bactérias endofíticas presentes em espécies de *Eucalyptus*, bem como, a possível aplicação biotecnológica dos mesmos. Neste estudo foi observado que *Pantoea* sp. apresenta especificidade ao local de origem mas não à espécie de *Eucalyptus*, bem como em algumas condições, genótipos desta bactéria podem estar associados aos sintomas da seca-do-ponteiro em *Eucalyptus*. Entretanto, outras espécies bacterianas mostraram a capacidade de aumentar o crescimento de plântulas de *Eucalyptus*, bem como controlar patógenos.

No presente trabalho métodos dependentes de cultivo como isolamento, seguido de ARDRA e sequenciamento foram aplicados conjuntamente com a análise independente de cultivo, realizada por meio de DGGE. Esta análise combinada de métodos foi utilizada para melhor entender as comunidades bacterianas associadas às raízes de *Eucalyptus* sp. e a sua interação com o fitopatógeno *C. fimbriata*. Dessa forma, os objetivos desse estudo foram: i) estudar os microrganismos cultiváveis das comunidades bacterianas do rizoplane e endofítica de raiz de *Eucalyptus* sp. sob diferentes níveis de infestação pelo fungo fitopatogênico *C. fimbriata*; ii) identificar esses microrganismos por amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA; iii) estudar o efeito da presença do patógeno na diversidade de microrganismos endofíticos nessas comunidades utilizando a técnica de DGGE.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Material vegetal

O estudo de interação entre bactérias associadas às raízes de eucalipto foi realizado utilizando plantas do híbrido espontâneo *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, gentilmente cedidas pela Cia. Suzano de Papel e Celulose. As plantas foram cultivadas em campo localizado em área experimental localizada no município de Mucuri, região sul do estado da Bahia, e coletadas em junho de 2006. A coleta foi realizada em local com intensa infestação de *Ceratocystis* sp., onde se

observava a existência de plantas com e sem sintomas de ataque por este fitopatógeno. Foram realizadas amostragens de cinco plantas de cada um dos tratamentos apresentados a seguir:

i) Plantas sadias, sem sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; sem manchas escuras (fungo) no interior do caule e sem manchas escuras nas raízes.

ii) Plantas sadias, sem sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; sem manchas escuras no interior do caule; porém com manchas escuras nas raízes.

iii) Plantas doentes, com sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; com manchas escuras interior do caule; porém sem manchas escuras nas raízes.

iv) Plantas doentes, com sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; manchas escuras interior do caule e com raízes com manchas escuras.

Para todas as amostras, fragmentos das raízes de plantas cultivadas no campo foram removidos e transportados em embalagem térmica (10°C) para o Laboratório de Genética de Microrganismos (Departamento de Genética, ESALQ/USP).

2.2.1.2 Isolamento das comunidades bacterianas associadas às raízes

2.2.1.2.1 Isolamento de bactérias do rizoplane

Foram cortados cinco fragmentos com 25,12 cm² de cada uma das amostras para cada isolamento. As amostras foram lavadas para retirar solo aderido e as extremidades foram fechadas com parafina para evitar eventual saída de microrganismos endofíticos. Os fragmentos foram então submersos em 50 ml de tampão fosfato (PBS - 1,44g ml⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,24 g ml⁻¹ de KH₂PO₄, 0,20 g ml⁻¹ de KCl, 8,00 g ml⁻¹ de NaCl e pH 7,4) acrescido de pérolas de vidro (0,1 cm de diâmetro) e mantidos sob agitação por uma hora a temperatura constante de 28°C. Para cada amostra foram realizadas diluições em PBS e semeadas sobre meio de cultura TSA 10% (Tryptona Soja Agar – Merk, pH 7,3 suplementado com benomil (50 µg.ml⁻¹) para evitar o crescimento de fungos. As placas foram incubadas a 28°C por 72 horas. Posteriormente, as unidades formadoras de colônia (UFCs) foram quantificadas, e uma amostragem aleatória de aproximadamente 160 colônias representantes da diversidade bacteriana foi coletada, purificada e armazenada em solução de glicerol a -80°C.

2.2.1.2.2 Isolamento de bactérias endofíticas de raiz

O material vegetal utilizado para isolamento de bactérias endofíticas foi o mesmo utilizado para isolamentos de rizoplano. Após a retirada das bactérias da superfície da raiz, os fragmentos de raiz de cada amostra foram submetidos à desinfestação superficial conforme descrito por Araújo et al. (2001), seguindo os seguintes passos: lavagem com álcool 70 % por um minuto (min); lavagem com hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (v/v) por dois min; lavagem com álcool 70% por um min; duas lavagens com água destilada autoclavada. A eficácia do processo de desinfestação superficial foi avaliada por meio da semeadura de alíquotas da água da última lavagem em meio de cultura TSA 10% suplementado com benomil ($50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Após a desinfestação superficial, os 1 gr de fragmentos radiculares foi macerado em 10 ml de PBS. Posteriormente, o macerado foi passado para tubos de 50 ml e incubados sob agitação por uma hora a 28 °C. Para cada amostra foram realizadas diluições em tampão PBS, semeadas sobre meio de cultura TSA 10% suplementado com benomil ($50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e incubadas a 28°C por 72 horas. Posteriormente, as colônias foram contadas e uma amostra aleatória de aproximadamente 20% dos isolados representantes da diversidade bacteriana foi purificada e armazenada em solução de glicerol 30% a -80°C.

Para os dados de isolamentos, os números de UFCs obtidos, tanto para o isolamento de bactérias endofíticas de raiz quanto para bactérias do rizoplano, foram transformados ($\log_{10}$ de $X+1$) e analisados com auxílio do programa SAS (Proc GLM no SAS *Copyright* © 1989-1996; SAS institute, Cary, NC, USA). O teste de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças entre as médias ao nível de 5% de significância.

2.2.1.3 Amplificação do gene 16S rRNA de colônias bacterianas

A amplificação do 16S rDNA foi realizada por PCR direto de colônias bacterianas sem extração de DNA. As colônias de interesse foram crescidas em meio de cultura TSA 10% e transferidas para um tubo contendo 200 μl de água deionizada ultra-pura esterilizada. A quantidade de 1 μL dessa suspensão bacteriana foi utilizada como fonte de DNA para realização da PCR. Os iniciadores ou *primers* utilizados foram o PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1387R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-

3'). As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 1 µL da suspensão bacteriana, 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxiribonucleotídeos trifosfato, 0,2 µM de cada iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Um controle negativo (reação de PCR sem suspensão bacteriana) foi incluído em todos os eventos de amplificação. A PCR foi realizada em um termociclador PTC – 200 (MJ Research, USA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 62,5 °C por 1 min e 72 °C por 1 min. Uma extensão final de 72 °C por 7 min. A confirmação da amplificação do fragmento de DNA alvo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), coloração com brometo de etídio e observação do fragmento de tamanho esperado (1400 pb) sobre luz ultravioleta.

2.2.1.4 Caracterização dos isolados por ARDRA (Análise de restrição do rDNA amplificado)

A análise de restrição dos fragmentos amplificados a partir dos isolados foi realizada por digestão de 1 µg dos produtos de PCR utilizando 2 U da enzima de restrição HhaI (Fermentas Life Sciences, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. A avaliação dos perfis de restrição foi realizada por eletroforese em géis de agarose 2,5% (p/v) corados com brometo de etídio e observados sobre luz ultravioleta. Os perfis de clivagem foram comparados e a ocorrência de cada um dos ribotipos determinada dentro de cada amostra.

2.2.1.5 Sequenciamento e análise do gene 16S rRNA

Os isolados representativos de cada ribotipo foram seqüenciados no Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo para identificar as espécies bacterianas mais freqüentes em cada tratamento. Para tanto, os produtos de PCR gerados pelos iniciadores P027F e 1387R foram purificados com polietilenoglicol (PEG 8000 20%; NaCl 2,5 mM) e submetidos ao seqüenciamento parcial do 16S rDNA. As seqüências obtidas foram comparadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997) contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology information website*).

2.2.1.6 Extração de DNA total a partir de amostras do rizoplano e das raízes

O DNA presente nas amostras do rizoplano e das raízes foram extraídos a partir das mesmas suspensões bacterianas obtidas quando do processamento das amostras para isolamento das respectivas comunidades bacterianas. Dessa forma, 0,5 ml de cada suspensão bacteriana foram utilizadas para extração de DNA, realizada com o *MoBio UltraClean™ Soil DNA* kit (*MoBio Laboratories, EUA*) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a execução do protocolo a qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em géis de agarose 1% (p/v) corados com brometo de etídio e observados sobre luz ultravioleta.

2.2.1.7 Amplificação e análise por DGGE

Inicialmente foi realizada uma PCR específica para o gene 16S rRNA de bactérias utilizando iniciadores seletivos para evitar a amplificação de DNA de cloroplastos. Os iniciadores utilizados foram o 799F (5'-AACMGGATTAGATACCKG-3') (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACT-3'). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 1 µL do DNA total extraído (5-10 ng), 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxiribonucleotídeo trifosfato, 0,4 µM de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X, 0,2mg de BSA. A PCR foi realizada em um termociclador PTC – 200 (MJ Research, USA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 20 seg, 53 °C por 40 seg e 72 °C por 40 seg. Uma extensão final de 72 °C por 7 min.

Posteriormente, foram realizadas as reações de amplificação do gene 16S rRNA para análise de DGGE. Os iniciadores utilizados foram o U968GC (5'-Grampo de CG-AACGCGAAGAACCTTAC-3') e R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'). As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 1 µL do produto de amplificação da reação acima mencionada (20 ng), 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxiribonucleotídeo trifosfato, 0,4 µM de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X, 1% de formamida. A PCR foi realizada em um termociclador PTC – 200 (MJ Research, USA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, e 72°C por 1 min. Uma extensão final de 72°C por 10 min.

Após a execução do protocolo a verificação de eficiência de amplificação foi realizada por eletroforese em géis de agarose 1,2% (p/v) corados com brometo de etídio e observados sobre luz ultravioleta.

O DGGE foi realizado como descrito anteriormente (HEUER et al., 1997) com equipamento *phorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda). Os produtos de PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% (p/v) com um gradiente desnaturante de uréia/formamida (45-65%), onde 100% de desnaturação contém 7 M de uréia e 40% de formamida. A corrente elétrica aplicada foi de 100 volts por 16 horas à temperatura constante de 60°C. Após a eletroforese, o gel foi corado com SYBR Green (Invitrogen®) e fotodocumentado sobre luz ultravioleta.

Para análise dos dados gerados foi feita a normalização das imagens no programa *GelCompar II*, onde os perfis foram também convertidos em matrizes de presença/ausência de bandas. A seleção das bandas foi feita pelo programa e posteriormente avaliada manualmente, onde bandas provenientes de dímeros de *primers* foram removidas das análises. Uma tabela contendo a posição das bandas foi exportada para análise. Nesse mesmo programa também foi gerado um dendrograma baseado nas curvas densitométricas de cada perfil, agrupadas pelo método de UPGMA. As análises de componentes principais (PCA) a partir dos perfis de DGGE foram realizadas no programa *Canoco 4.5* (ter BRAAK; SMILAUER, 2002), usando as matrizes de bandas como o perfil de espécies componentes de cada uma das comunidades avaliadas

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Isolamento e caracterização molecular da comunidade bacteriana do rizoplano

Foi avaliada a densidade de bactérias presentes na comunidade do rizoplano de raízes de *Eucalyptus* com diferentes níveis de ataque pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*. A metodologia utilizada possibilitou a obtenção de isolados bacterianos de diferentes grupos morfológicos, dos quatro tratamentos estudados (*i*, *ii*, *iii* e *iv*). A densidade de colonização bacteriana nos tratamentos variou de 12,78 a 20,66 x 10⁴ UFC.cm⁻² de raiz. Foi observada diferença significativa (F=47,62 e p<0,0001) entre os diferentes tratamentos (Tabela 2.1). O número médio de UFCs isoladas foi significativamente maior no tratamento *i* do que nos

tratamentos *ii*, *iii* e *iv*, sendo que estes três últimos tratamentos não diferiram estatisticamente (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Densidade bacteriana (média de n= 5) no rizoplano de *Eucalyptus* sp. com diferentes níveis de infestação pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

Tratamentos *	Média de Bactérias do Rizoplano (10 ⁴ UFC.cm ² ⁻¹ de raiz) **
<i>i</i> ***	20,66 a
<i>ii</i>	14,19 b
<i>iii</i>	12,78 b
<i>iv</i>	17,00 b

* Amostras de 40 π cm² de raiz de *Eucalyptus*. ** Médias obtidas de cinco isolamentos. *** *i*) Plantas saudas, sem sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; sem manchas escuras (fungo) no interior do caule e sem manchas escuras nas raízes; *ii*) Plantas saudas, sem sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; sem manchas escuras no interior do caule; porém com manchas escuras nas raízes; *iii*) Plantas doentes, com sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; com manchas escuras interior do caule; porém sem manchas escuras nas raízes; *iv*) Plantas doentes, com sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; manchas escuras interior do caule e com raízes com manchas escuras.

A amplificação do 16S rDNA direto de colônias bacterianas sem extração prévia do DNA foi eficiente para todos os isolados bacterianos estudados (rizoplano e endofíticos de raiz). A análise da diversidade bacteriana do rizoplano por meio da técnica de ARDRA foi realizada com aproximadamente 160 isolados, sendo aproximadamente 40 de cada tratamento (*i*, *ii*, *iii* e *iv*), permitindo agrupar os isolados em 13 ribotipos os quais foram, após identificação, distribuídos em pelo menos 12 famílias de 3 filos. Os ribotipos A, B, E e T foram observados nos quatro tratamentos avaliados enquanto que os demais ribotipos foram observados de maneira diferencial entre os tratamentos (Tabela 2.2).

Um total de 41 isolados com perfis de ARDRA representativos dos ribotipos observados foi identificado por meio do sequenciamento parcial do 16S rDNA (Tabela 2.3). Essa identificação permitiu acessar a diversidade de bactérias cultiváveis do rizoplano de *Eucalyptus* nas diferentes condições avaliadas. Os ribotipos obtidos com maior frequência nos quatro tratamentos, B e E, foram identificados como pertencentes ao Filo Firmicutes (**B** - Bacillaceae e **E** - Bacillaceae e Paenibacillaceae). Os demais ribotipos foram identificados como pertencentes aos Filos Actinobacteria (**G** - Micrococcaceae, **O** - Microbacteriaceae, **T** - Microbacteriaceae e **Z**

Tabela 2.2 - Distribuição e frequência dos ribotipos obtidos por ARDRA, dentro de cada um dos tratamentos (*i*, *ii*, *iii* e *iv*) para amostras da comunidade do rizoplane de raízes de *Eucalyptus* sp. com diferentes níveis de infestação pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*

Ribotipos	Identificação Família	Porcentagem dentro de cada tratamento				Porcentagem Total
		<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>iii</i>	<i>iv</i>	
A	Xanthomonadaceae	2,3	3,8	4,5	8,7	4,7
B	Bacillaceae	36,5	23,2	52,3	40,0	39,6
C	Microbacteriaceae	4,5	NO*	2,3	5,8	3,4
E	Bacillaceae e Paenibacillaceae	22,8	34,7	36,3	31,5	30,8
F	Rhizobiaceae	9,0	11,5	NO	2,8	5,4
G	Micrococcaceae	9,0	3,8	NO	2,8	4,0
H	Pseudomonadaceae	NO	3,8	NO	2,8	1,3
J	Comamonadaceae e Burkholderiaceae	6,9	NO	2,3	NO	2,7
O	Microbacteriaceae	4,5	NO	NO	2,8	2,0
R	Enterobacteriaceae	NO	7,7	NO	NO	1,3
T	Microbacteriaceae	2,3	7,7	2,3	2,8	3,4
Z	Nocardiaceae	2,3	NO	NO	NO	0,7
W	Pseudomonadaceae	NO	3,8	NO	NO	0,7

*Não observado.

- Nocardiaceae) e Proteobacteria, o qual foi representado pelas Classes Alphaproteobacteria (F - Rhizobiaceae), Betaproteobacteria (J - Comamonadaceae e Burkholderiaceae) e Gamaproteobacteria (A - Xanthomonadaceae, C - Microbacteriaceae, H e W, - Pseudomonadaceae R - Enterobacteriaceae) (Tabela 2.3). Os ribotipos H, W e R foram observados somente nos tratamentos *ii* e *iv*, onde o fungo estava presente nas raízes. O ribotipo J, identificado como pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Variovorax* foram observados somente nos tratamentos *i* e *iii*, onde o fungo estava ausente nas raízes.

Foi possível observar que a comunidade bacteriana associada ao rizoplane de *Eucalyptus* é constituída por *Arthrobacter*; *Bacillus*; *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*; *Dyella*; *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*; *Nocardia*, *Pseudomonas*; *Rahnella*, *Rhizobium*, *Rhodanobacter*, *Stenotrophomonas* e *Variovorax* (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Identificação de bactérias do rizoplane, representativas dos ribotipos de ARDRA, isoladas de raízes de *Eucalyptus* com diferentes níveis de infestação pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*. A identificação molecular das espécies foi realizada por sequenciamento parcial do 16S rDNA e análises de comparação no BLASTn (*National Center for Biotechnology information website*)

Ribotipo	Classe	Espécie (Blast-NCBI)	% *	Referência no GenBank
B	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	100%	EU104731.1
E		<i>Bacillus fusiformis</i>	96%	AB271743.1
E		<i>Brevibacillus brevis</i>	98%	EF173465.1
E		<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	96%	EF690426.1
G	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	100%	EU034524.1
O		<i>Leifsonia xyli</i>	97%	DQ232616.2
T		<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	100%	DQ365561.1
T		<i>Microbacterium oxydans</i>	98%	EU249583.1
C		<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	81%	EU102272.1
Z		<i>Nocardia terpenica</i>	92%	AB201298.2
F	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobium tropici</i>	99%	EU074181.1
J	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia kururiensis</i>	99%	AJ300686.1
J		<i>Variovorax paradoxus</i>	95%	EU169184.1
A	Gamaproteobacteria	<i>Dyella koreensis</i>	91%	AB272381.1
A		<i>Luteibacter rhizovicius</i>	97%	EU022023.1
A		<i>Rhodanobacter thiooxydans</i>	98%	AB286179.1
A		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%	EU221397.1
H		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%	EF552157.1
W		<i>Pseudomonas veronii</i>	99%	AB334768.1
R		<i>Rahnella aquatilis</i>	86%	X79939.1

*Similaridade com a linhagem de referência.

2.2.2.2 Isolamento e caracterização molecular da comunidade bacteriana endofítica de raiz

Foi avaliada a densidade de bactérias presentes na comunidade endofítica de raiz de *Eucalyptus* com diferentes níveis de ataque pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*. A metodologia utilizada foi eficiente para obtenção de uma amostragem da diversidade bacteriana no interior das plantas dos 4 tratamentos estudados (*i*, *ii*, *iii* e *iv*). Não foram observadas colônias bacterianas nas placas controle da desinfestação superficial. A densidade total de bactérias nas plantas amostradas variou de 9,20 a 25,13 x 10⁴ UFC.g⁻¹ de raiz. A análise de variância (ANOVA) mostrou que houve diferença significativa entre as médias (F=44,44 e p<0,0001). O número médio de UFCs isoladas foi significativamente maior no tratamento *iv* do que nos

tratamentos *i*, *ii* e *iii*, sendo que estes três últimos tratamentos não diferiram estatisticamente (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Densidade bacteriana (média de n= 5) endofíticas em raízes de *Eucalyptus* sp. com diferentes níveis de infestação pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tratamentos *	Média de Bactérias do Endofíticas (10 ⁴ UFC.g ⁻¹ de raiz) **
<i>i</i> ***	19,60 b
<i>ii</i>	9,20 b
<i>iii</i>	15,73 b
<i>iv</i>	25,13 a

* Amostras de 1 g de raiz de *Eucalyptus*. ** Médias obtidas de cinco isolamentos. *** *i*) Plantas saudas, sem sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; sem manchas escuras (fungo) no interior do caule e sem manchas escuras nas raízes; *ii*) Plantas saudas, sem sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; sem manchas escuras no interior do caule; porém com manchas escuras nas raízes; *iii*) Plantas doentes, com sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; com manchas escuras interior do caule; porém sem manchas escuras nas raízes; *iv*) Plantas doentes, com sintomas externos da presença de *C. fimbriata*; manchas escuras interior do caule e com raízes com manchas escuras.

A análise de ARDRA das amostras da comunidade endofítica de raiz também foi realizada para 40 isolados de cada um dos tratamentos (*i*, *ii*, *iii* e *iv*), permitindo agrupar os isolados em diferentes ribotipos os quais estavam distribuídos nas plantas provenientes dos 4 tratamentos avaliados (Tabela 2.5). Foram observados 8 ribotipos, os quais após identificação de isolados representativos por meio do sequenciamento parcial do 16S rDNA, mostrou que esta comunidade endofítica das raízes de *Eucalyptus* é constituída por *Psychrobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Rhizobium tropici*, *Rahnella aquatilis*, *Erwinia persicina*, *Stenotrophomonas maltophilia* (Tabela 2.6).

Os ribotipos B (*Bacillus cereus*), E (*Lysinibacillus sphaericus*) e F (*Rhizobium tropici*) foram observados em todos os tratamentos avaliados, enquanto o ribotipo R (*Rahnella aquatilis*) foi observado apenas no tratamento *ii* (Tabela 2.6). Os ribotipos D (*B. pumilus*) e P (*Psychrobacter* sp.) foram observados apenas nos tratamentos *ii* e *iii* e o ribotipo X (*Erwinia persicina*) foi observado nos tratamentos *ii*, *iii* e *iv*. (Tabela 2.6).

Tabela 2.5 - Distribuição e frequência dos ribotipos obtidos por ARDRA, dentro de cada um dos tratamentos (*i*, *ii*, *iii* e *iv*) para amostras da comunidade endofítica de raízes de *Eucalyptus* sp. com diferentes níveis de infestação pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*

Ribotipos	Identificação Família	Porcentagem dentro de cada tratamento				Porcentagem total
		<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>iii</i>	<i>iv</i>	
A	Xanthomonadaceae	NO**	3,1	2,2	2,4	2,2
B	Bacillaceae	60,0	43,8	39,0	71,0	52,9
D	Bacillaceae	NO	18,7	15,2	NO	9,4
E	Bacillaceae	15,0	3,1	8,8	14,5	10,1
F	Rhizobiaceae	20,0	3,1	6,5	4,8	7,3
P	Moraxellaceae	NO*	9,4	24,0	NO	10,1
R	Enterobacteriaceae	NO	12,5	NO	NO	2,9
X	Enterobacteriaceae	NO	6,3	4,4	7,3	5,1

*Não observado.

Tabela 2.6 – Identificação de bactérias endofíticas, representativas dos ribotipos de ARDRA, isoladas de raízes de *Eucalyptus* sp. com diferentes níveis de infestação pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*. A identificação molecular das espécies foi realizada por sequenciamento parcial do 16S rDNA e análises de comparação no BLASTn (*National Center for Biotechnology Information website*)

Ribotipo	Classe	Espécie (Blast-NCBI)	%*	Linhagem de referência
P	Firmicutes	<i>Psychrobacter</i> sp.	97%	EU075122.1
B		<i>Bacillus cereus</i>	100%	EU104731.1
D		<i>Bacillus pumilus</i>	94%	AB244297.1
E		<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	96%	EF563985.1
F	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobium tropici</i>	99%	EU074181.1
R	Gamaproteobacteria	<i>Rahnella aquatilis</i>	97%	DQ862543.1
X		<i>Erwinia persicina</i>	97%	AM294946.1
A		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%	AJ293467.1

*Similaridade com a linhagem de referência.

2.2.2.3 Análise da diversidade bacteriana por DGGE

A diversidade bacteriana presente no rizoplane e endofiticamente em raízes de *Eucalyptus* sp., nos quatro tratamentos (*i*, *ii*, *iii* e *iv*) foi acessada de maneira independente de cultivo, por meio do uso da técnica de DGGE (Figuras 2.1 e 2.2). Os perfis de DGGE com *primers* universais

foram bastante complexos, formados por um grande número de bandas, as quais permitiram a análise por PCA (Figuras 2.3 e 2.4). Nas amostras da comunidade do rizoplano os tratamentos mostraram-se distintos e agruparam-se em diferentes quadrantes no gráfico (Figura 2.3). No eixo x , que explica 16,9% da variância, as amostras dos tratamentos i e iv foram separadas das amostras dos tratamentos ii e iii . Já, no eixo y do gráfico onde 13,5 % da variância são explicadas, os tratamentos i e iii foram separados dos tratamentos ii e iv (Figura 2.3). Embora variações tenham ocorrido, nesse eixo é possível sugerir a separação de amostras pela presença do fungo *Ceratocystis fimbriata* nas raízes (manchas escuras), daquelas que não apresentam este sintoma.

Considerando as amostras da comunidade endofítica de raiz, as amostras mostraram-se bastante semelhantes entre os tratamentos, exceto para o tratamento iv , com presença do fungo em toda planta, que foi separado dos demais no eixo y do gráfico, onde 11,8 % da variância são explicadas (Figura 2.4). No eixo x do gráfico, onde 20,3 % da variância são explicadas, não ocorreu separação dos tratamentos (Figura 2.4).

Figura 2.1 - Gel de DGGE obtido com uso de *primers* universais para o 16S rDNA a partir de cinco amostras da comunidade do rizoplano de raízes de *Eucalyptus* para cada um dos tratamentos. Coloração com Syber Green® (Invitrogen) e fotodocumentado sobre luz ultravioleta. (M) – Marcador; (i, ii, iii e iv) – Tratamentos

Figura 2.2 - Gel de DGGE obtido com uso de *primers* universais para o 16S rDNA a partir de cinco amostras da comunidade endofítica de raízes de *Eucalyptus* para cada um dos tratamentos. Coloração realizada com Syber Green® (Invitrogen) e fotodocumentado sobre luz ultravioleta. (M) – Marcador; (i, ii, iii e iv) – Tratamentos

Figura 2.3 - Gráfico da análise de PCA (Análise de componentes principais) baseada nos perfis de PCR-DGGE. Os perfis foram obtidos com *primers* universais para o 16S rDNA a partir de cinco amostras da comunidade do rizoplano de raízes de *Eucalyptus* para cada um dos quatro tratamentos. Os valores nos eixos mostram a porcentagem da variância explicada

Figura 2.4 - Gráfico da análise de PCA (Análise de Componentes Principais) baseada nos perfis de PCR-DGGE. Os perfis foram obtidos com *primers* universais para o 16S rDNA a partir de cinco amostras da comunidade endofítica de raízes de *Eucalyptus* para cada um dos quatro tratamentos. Os valores nos eixos mostram a porcentagem da variância explicada

2.2.3 Discussão

A colonização das plantas por microrganismos ocorre de forma piramidal, ou seja, maior diversidade e densidade no rizoplane seguido pelas raízes, caule e folhas (ELVIRA-RECUENCO; van VUURDE, 2000; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; MENDES et al., 2007). Resultado semelhante foi observado no presente trabalho, visto que uma maior diversidade e densidade bacterianas foram observadas no rizoplane do que no interior das raízes de *Eucalyptus*. As amostras avaliadas foram coletadas de plantas cultivadas em uma área da Cia Suzano de Papel e Celulose intensamente atacada pelo fungo patogênico *C. fimbriata*. Foi observado que a comunidade bacteriana associada à *Eucalyptus* (rizoplane e endofítica) é composta por *Arthrobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus brevis*, *Burkholderia kururiensis*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Dyella koreensis*, *Erwinia persicina*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Leifsonia xyli*, *Luteibacter rhizovicinus*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Microbacterium oxydans*, *Nocardia terpenica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas veronii*, *Psychrobacter* sp., *Rahnella aquatilis*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium tropici*, *Rhodanobacter thiooxydans*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Variovorax paradoxus*. Dentre estas pode ser observada a presença de gêneros importantes associados à proteção da planta hospedeira, como *Pseudomonas* responsáveis pela produção de compostos antagonistas e tem sido amplamente utilizada no controle biológico de fungos causadores de doenças, como por exemplo, *Rhizoctonia solani* (NAGARAJKUMAR et al, 2004), *Botrytis mali* (MIKANI et al, 2007) e *Microdochium nivale* (AMEIN et al, 2007). *Rhanella* também foi um gênero observado no presente trabalho e também tem sido utilizado no controle biológico de fungos fitopatogênicos, como por exemplo, *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* (CALVO et al, 2007) e *Fusarium oxysporum* (HASSNI et al, 2007). Outros gêneros bacterianos observados são descritos na literatura como portadores de características benéficas como: *Bacillus*, e *Stenotrophomonas* produtores de ácido indol acético (AIA) (PARK et al, 2005); *Stenotrophomonas* como biodegradadores de contaminantes (QURESHI et al, 2007); *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Microbacterium* promotores de crescimento (TSAVKELOVA et al., 2007; KARLIDAG et al., 2007); *Bacillus* com potencial no controle biológico (RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR et al., 2007). A ocorrência dessas espécies bacterianas com diferentes

características benéficas pode estar relacionada com a sobrevivência de plantas sob diferentes condições ambientais.

Das 8 espécies bacterianas encontradas endofiticamente, 5 também foram observadas no rizoplano (Tabela 2.3 e 2.5), sugerindo que deve existir migração entre as comunidades do rizoplano e endofítica. Entretanto, tendo em vista que foram observadas 18 espécies no rizoplano e destas somente 5 estavam no interior da planta, parece que nem todas as bactérias desta região são capazes de penetrar no interior na raiz. Outro fato interessante é que *B. pumilus* e *E. persicina* foram observadas apenas no interior das raízes, sugerindo que ou são transmitidas por sementes ou penetram na planta por outra região, visto que não estão presentes no rizoplano.

As bactérias associadas às plantas podem atuar como indicador de alterações no ambiente, uma vez que esta comunidade está presente durante todo o ciclo de desenvolvimento da planta, e responde diretamente às variações bióticas e abióticas deste ambiente. Dessa forma, variações decorrentes da introdução de microrganismos (ANDREOTE et al., 2004; ANDREOTE et al., 2006) e presença de patógenos (ARAÚJO et al, 2002) podem resultar no efeito direto sobre esta comunidade. *Pseudomonas veronii* (W) e *Rahnella aquatilis* (R) foram observadas exclusivamente no rizoplano de raízes não infectadas por *C. fimbriata* (tabela 2.2), poderiam estar associadas à proteção da planta. Além disso, *R. aquatilis* (R) também foi isolada do interior do sistema radicular (endofítica) somente de plantas do tratamento *ii* (plantas saudas e sem sintomas externos). Trabalhos recentes mostraram que estas espécies podem atuar no controle biológico de fungos (CALVO et al, 2007; MIKANI et al, 2007). Por outro lado, parece que as plantas do tratamento *ii* estão protegidas da colonização por microrganismos, visto que somente 3 espécies, *B. cereus*, *L. sphaericus* e *R. tropici*, foram observados nestas plantas. Enquanto que as plantas do tratamento *ii* parecem apresentar uma maior abundância de espécies no seu interior. Segundo Sturz et al. (1999), os microrganismos podem formar barreiras nas superfícies das raízes, diminuindo a possibilidade da infecção por patógeno. No presente trabalho, pode ser sugerido que *P. veronii* e *R. aquatilis* estão associados ao controle de *C. fimbriata*, atuando no rizoplano e endofiticamente (somente *R. aquatilis*), para a proteção da planta hospedeira. Entretanto, os mecanismos de atuação devem ser estudados para um melhor conhecimento e confirmação desta interação.

Na análise independente de cultivo realizada neste capítulo, por meio da aplicação da técnica de PCR-DGGE algumas diferenças entre os tratamentos puderam ser observadas. A

análise de componentes principais com base nos perfis de PCR-DGGE mostrou que a presença do fungo nas raízes de *Eucalyptus* interfere na diversidade bacteriana das comunidades do rizoplano e endofítica de raiz. Nas amostras de rizoplano pode ser sugerido que a diferenciação entre os tratamentos onde o fungo estava presente ou ausente nas raízes. Estes dados sugerem que quando a planta começa a ser infectada pelo patógeno, o sistema de defesa é ativado e pode alterar a comunidade bacteriana do rizoplano, por exemplo, secretando compostos com ação antibiótica. No entanto, quando a planta já está colonizada pelo patógeno, o ambiente caracterizado pelo rizoplano se comporta de maneira similar a uma planta sadia, ou seja, sem ativação do sistema de defesa da planta hospedeira. Outros estudos mostram o efeito dos compostos exsudados pelas raízes das plantas na seleção de comunidades bacterianas, como por exemplo, a função destes compostos na composição da comunidade de *Pseudomonas* em diversas plantas (COSTA et al., 2006).

No entanto, quando os efeitos da infecção das plantas pelo patógeno sobre a diversidade da comunidade bacteriana endofítica é avaliado fica evidenciada a diferenças entre as plantas altamente afetadas pelo fungo das demais. Considerando a ecologia de endófitos, pode ser sugerido que a ativação do sistema de defesa das plantas não deve interferir nestas comunidades, que já apresentam colonização dos tecidos internos das plantas. Adicionalmente a isso, pode ser explorado o fato dos endófitos serem capazes de driblar os sistemas de defesa da planta para conseguir colonizar de maneira efetiva seus tecidos internos. Com isto a análise mostrou que não existe distinção entre a comunidade endofítica de raiz presentes em plantas saudias ou com nível médio de infestação pelo patógeno. No entanto quando a planta está altamente infectada, esta comunidade é diretamente afetada, sendo então possível que bactérias, que em condições de sanidade da planta, não seriam capazes de colonizar a planta, penetrem no interior das raízes infectadas por *C. fimbriata*. Resultado semelhante foi observado por Araújo et al. (2002), onde a comunidade bacteriana endofítica de plantas de citros infectado por *Xylella fastidiosa* é significativamente diferente daquela observada em plantas saudias. Em outro caso, Araújo et al. (2001) observaram que a presença do fungo *Guignardia citricarpa* pode apresentar um efeito sinérgico sobre a bactéria endofítica de citros *Pantoea agglomerans* e inibitório sobre *B. pumilus*.

O presente trabalho mostrou que pode ocorrer interação entre *C. fimbriata* e a comunidade bacteriana do rizoplano e endofítica das raízes de *Eucalyptus*, sugerindo que a presença de *P.*

veronii e *R. aquatilis* poderia estar associada à limitação da presença deste fungo patogênico na planta hospedeira. Além disso, foi observado que após penetração na planta hospedeira, *C. fimbriata* está associado a uma mudança na comunidade endofítica das raízes, a qual poderia de forma direta ou indireta beneficiar o processo de patogênese causado por este fungo. Futuros estudos devem focar na seleção de espécies que inibem a ocorrência do patógeno e possibilitem a aplicação como indutores de resistência sistêmica na planta. Além disso, os mecanismos de interação devem ser mais bem entendidos para que possa de fato permitir a sua utilização.

Referências

ALTINDAG, M.; SAHIN, M.; ESITKEN, A.; ERCISLI, S.; GULERYUZ, M.; DONMEZ, M.F.; SAHIN, F. Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholdria*, and *Pseudomonas* application under *in vitro* and *in vivo* conditions. **Biological control**, Orlando, v. 38, p. 369–372, 2006.

AMEIN, T.; OMER, Z.; WELCH, C. Application and evaluation of *Pseudomonas* strains for biocontrol of wheat seedling blight. **Crop Protection**, Guildford, 2007. In Press.

ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S. VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada as plantas**. 2007. 201p. (Tese de Doutorado, Genética e melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W. JR.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; 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**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plant. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Eds.) **Fungi: Multifaceted Microbes**, New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. chap. 6, p. 189-207.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W. JR.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB - Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, 2000.

BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C.; KRAUSS, U.; ALFENAS, A.C. Genetic variability and host specialization in the Latin America clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 1274-1284, 2003.

BARNES, I.; NAKABONGE, G.; ROUX, J.; WINGFIELDAND, B.D.; WINGFIELD, M.J. Comparison of populations of the wilt pathogen *Ceratocystis Albifundus* in South Africa and Uganda. **Plant Pathology**, London, v. 54, p. 189–195, 2005.

BARNES, I.; ROUX, J.; WINGFIELD, B.D.; O'NEIL, M.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. **Australasian Plant Pathology**, London, v. 32, p. 361-366, 2003.

BRACELPA. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra/index.html>> acesso em: 11 nov. 2006.

BRIM, H.; HEUER, H.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; MERGEAY, M.; SMALLA, K. Characterization of bacterial community of a zinc-polluted soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 326-338, 1999.

BURGESS, T.; WINGFIELD, M.J. Impact of fungal pathogens in natural forest ecosystems: a focus on *eucalyptus*. In: SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K.W.; BARRETT, R.L.(Eds). **Microorganisms in Plant Conservation & Biodiversity**. Kluwer: Academic Publishers, p. 285-306, 2002.

CALVO, J.; CALVENTE, V.; ORELLANO, M.E. DE; BENUZZI, D.; TOSETTI, M.I.S. de. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 251–257, 2007.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 252-263, 2001.

COSTA, R.; GOMES, N.C.M.; PEIXOTO, R.S.; RUMJANEK, N.; BERG, G.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S.; SMALLA, K. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 2434-2447, 2006.

Embrapa. Disponível em:
<http://www.21.sede.embrapa.br/linhas_de_acao/temas_basicos/florestas/index_html> acesso em:
28 maio 2006.

ELVIRA-RECUENCO, M.; van VUURDE, J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 1036-1041, 2000.

ENGELBRECHT, C.J.B.; HARRINGTON, T.C.; STEIMEL, J. CAPRETTI, P. Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 2995-3005, 2004.

FANTROUSSI, S.E.L; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP E. M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 982-988, 1999.

FERREIRA, F.A.; DEMUNER, A.M.; DEMUNER, N.L.; PIGATTO, S. Murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto no Brasil (Abstr.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 24, p. 284, 1999.

FERREIRA, F.A.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.A. Detecção rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infetado de eucalipto, mangueira e outros hospedeiros lenhosos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 30, p. 543-545, 2005.

GERMAINE, K.; KEOGH, E.; GARCIA-CABELLOS, G.; BORREMANS, B.; van DER LELIE, D.; BARAC, T.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J.; MOORE, F.P.; MOORE, E.R.B.; CAMPBELL, C.D.; RYAN, D.; DOWLING, D.N. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 109-118, 2004.

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

HENCKEL, T.; FRIEDRICH, M.; CONRAD, R. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1980-1990, 1999.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

KARLIDAG, H.; ESITKEN, A.; TURAN, M.; SAHIN, F. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 114, p. 6–20, 2007.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; DAMODARAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; SAMIYAPPAN, R. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1087-1098, 2007.

KOZDROJ, J.; van ELSAS, J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1405-1417, 2000.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, The Hague, v. 273, p. 91-99, 2005.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; NAKASHIMA, H. Endophyte transmission via seeds of *Lolium perenne* L.: immunodetection of fungal antigens. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 534-541, 2004.

MARI, M.; GUIZZARDI, M.; PRATELLA, G. C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v.7, p. 30-37, 1996.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, AEM.01222-07, 2007. In Press.

MIKANI, A.; ETEBARIAN, H.R.; SHOLBERG, P.L.; O'GORMAN, D.T.; STOKES, S.; ALIZADEH, A. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, 2007. In Press.

NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 159, p. 73-81, 2004.

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-Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 145, p. 479-486, 1997.

PARK, M.; KIM, C.; YANG, J.; LEE, H.; SHIN, W.; KIM, S.; SA, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, p. 127-133, 2005.

PROCÓPIO, R. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 101 p. (Tese de Doutorado, Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

QUADTHALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

QURESHI, A.; VERMA, V.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H.J. Degradation of 4-nitroaniline by *Stenotrophomonas* strain HPC 135. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, 2007. In Press.

RIBEIRO, I.J.A.; ITO, M.F.; FILHO, O.P.; DECASTRO, J.P. Gomose da *Acacia*-negra causada por *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **Bragantia**, Campinas, v. 47, p. 71-74, 1988.

ROUX, J.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, E.D.; BOUILLETT, J.P.; ALFENAS, A.C. A serious new disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis frimbriata* in Central Africa. **Forest Pathology**, Berlim, v. 30, p. 175-184, 1999.

ROUX, J.; COUTINHO, T.A.; MUJUNI BYABASHAIJA, D.; WINGFIELD, M.J. Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 97, p. 16-18, 2001.

ROUX, J.; WYK, M. VAN; HATTING, H.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. **Plant Pathology**, London, v. 53, p. 414-421, 2004.

RYU, C.M.; KIM, J.; CHOI, O.; KIM, S.H.; PARK, C.S. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 282-289, 2006.

SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 25-29, 2007.

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

TER BRAAK, C.J.F.; ŠMILAUER, P. Canoco reference manual and canodraw for windows user's guide: Software for canonical community ordination (version 4.5).500. 2002.

TSAVKELOVA, E.A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; BOTINA, S.G.; NETRSOV, A.I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 162, p. 69-76, 2007.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 1-10, 2002.

WITTHUHN, R.C.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.; HARRINGTON, T.C. PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocytis sensu stricto*. **Mycological Research**, Oxford, v. 100, p. 743-749, 1999.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 345-351, 2000.

ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C.; HARRINGTON, T.C.; MIZUBUTI, E.S.; SILVA, J.F. Resistance to *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis frimbiata*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 758-760, 2004.

3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE *Eucalyptus* sp. E A COLONIZAÇÃO DE PLÂNTULAS POR *Pantoea agglomerans* 33.1:gfp

Resumo

Os microrganismos endofíticos têm sido estudados em diversas plantas hospedeiras, sendo esses estudos direcionados principalmente na diversidade e potencial aplicação na produção vegetal. Porém, são poucas as informações sobre a ocorrência natural de endófitos em sementes e sua possível transmissão vertical. Bactérias endofíticas foram isoladas de sementes e plântulas de dez espécies e híbridos de *Eucalyptus*. Além disso, a bactéria endofítica *P. agglomerans* contendo o gene da *gfp* foi inoculada em sementes de *Eucalyptus* e posteriormente avaliada quanto ao perfil de colonização nas plântulas. A densidade bacteriana endofítica de sementes variou de 0,33 a $1,83 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, para as espécies *E. camandulensis* e *E. urophylla*, respectivamente. Entretanto, para *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. robusta* e *E. saligna*, nenhuma bactéria foi isolada de sementes, mostrando que pode existir especificidade nesta interação. A densidade bacteriana endofítica nas plântulas variou de $0,27 \times 10^2$ a $0,87 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, para *E. citriodora* e o híbrido *E. robusta* x *E. grandis*, respectivamente, enquanto que nenhuma bactéria foi isolada de *E. camandulensis*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. robusta* e *E. saligna*. A comunidade bacteriana endofítica é composta por bactérias pertencentes às classes *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria* e *Actinobacteria*. *P. agglomerans* inoculada nas sementes foi capaz de colonizar as plântulas após a germinação da semente, indicando que esta pode ser uma das formas de colonizar e se estabelecer na planta hospedeira. Os resultados mostraram que *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp., *Enterococcus mundtii*, *Paenibacillus humicus*, *Paenibacillus* sp., *Methylobacterium gregens*, *Methylobacterium* sp. e *Methylobacterium variabile* podem ser transmitidas por sementes, já que os mesmos foram observados endofiticamente em sementes e plântulas germinadas a partir das mesmas. Este foi o primeiro relato da presença de bactérias endofíticas em sementes de *Eucalyptus* e sua persistência nas plântulas após a germinação, sugerindo que esta deve ser uma estratégia da planta para manter espécies bacterianas que aumentem o *fitness* do hospedeiro. Além disso, esta estratégia poderia ser utilizada para a produção de mudas contendo bactérias de interesse previamente inoculadas em sementes.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; 16S rDNA; Microscopia de Fluorescência; Interações planta-bactéria.

DIVERSITY OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM *Eucalyptus* sp. SEEDS AND SEEDLINGS AND COLONIZATION OF SEEDLINGS BY *Pantoea agglomerans* 33.1:gfp

Abstract

The endophytic microorganisms have been studied in several host plants, being these studies focused mainly in the diversity and potential application for plant production. However, information about naturally seed associated endophytes and vertical transmission is limited. In the present study, endophytic bacteria were isolated from seeds and seedlings of ten *Eucalyptus* species and hybrids. Also, an endophytic bacterium *P. agglomerans* tagged with *gfp* gene was inoculated into *Eucalyptus* seeds and the presence of this bacterium inside seedlings was evaluated. The density of endophytic bacteria inside seeds ranged from 0.33 to 1.83×10^2 CFU.g⁻¹ for *E. camandulensis* and *E. urophylla*, respectively. However, bacteria were not isolated from *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. robusta* and *E. saligna* seeds and seedlings, showing that specificity may exist in this interaction. The bacterial density inside seedlings ranged from 0.27×10^2 to 0.87×10^2 CFU.g⁻¹ for *E. citriodora* and hybrids *E. robusta* x *E. grandis*, respectively. The endophytic bacterial community is composed by *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria* class. *P. agglomerans* inoculated in seeds was able to endophytically colonize seedlings, indicating that this may be the way to microorganisms to establish in the plant population. The results showed that *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp., *Enterococcus mundtii*, *Paenibacillus humicus*, *Paenibacillus* sp., *Methylobacterium gregens*, *Methylobacterium* sp. and *Methylobacterium variabile* may be transmitted by seeds, since these were observed in surface disinfected seeds and seedlings. This was the first report that describes the endophytic bacterial community inside *Eucalyptus* seeds and further colonization of seedlings, suggesting that this strategy of the plant to maintain bacterial species could be a result of co-evolution process to keep inside the host plant the beneficial population. Besides, this strategy could be used for the production of seedlings containing interesting bacteria inoculated previously in seeds.

Key-words: Microbial ecology; 16S rDNA; Fluorescence microscopy; Plant-bacteria interaction.

3.1 Introdução

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae* e é composto por mais de 700 espécies distribuídas, predominantemente, em regiões tropicais e subtropicais. A área cultivada com *Eucalyptus* tem aumentado nas últimas décadas e possui importante posição na economia mundial. Os maiores produtores mundiais são Brasil, Índia, África do Sul, Portugal, Angola, Espanha e China (POKE et al., 2005). O Brasil ocupa a décima primeira posição mundial na produção de celulose e a sétima na produção de papel (BRACELPA, 2006). O país possui mais de 3 milhões de hectares cultivados, os quais representam aproximadamente 50% da área plantada com florestas exóticas (EMBRAPA, 2006).

Bactérias endofíticas colonizam o interior de tecidos vegetais sem causar danos aparentes às plantas hospedeiras e podem ser isoladas após desinfestação superficial (HALLMANN et al., 1997). Segundo Azevedo e Araújo (2007) endófitos é todo microrganismo, cultivado ou não, que coloniza o interior de plantas hospedeiras sem causar danos aparentes e sem formar estruturas externas visíveis. As implicações práticas do estudo de endófitos estão direcionadas principalmente no potencial uso dos mesmos no controle biológico de insetos e doenças, além da promoção de crescimento (AZEVEDO et al., 2000; KOZDRÓJ et al., 2004; KAVINO et al., 2007).

Diferentes microorganismos têm sido isolados de sementes após desinfestação superficial, inclusive endófitos e patógenos (GRANÉR et al., 2003; RUDGERS et al., 2004; MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004; JORDAAN et al., 2006; RUDGERS; CLAY, 2007), no entanto, são poucas as informações sobre a ocorrência natural de bactérias endofíticas associadas a sementes de plantas arbóreas (MUNDT; HINKLE, 1976; CANKAR et al., 2005; VEGA et al., 2005). O uso de sementes, juntamente com técnicas de micropropagação, é a principal estratégia utilizada para o plantio de *Eucalyptus*. Em algumas espécies o plantio de sementes pode permitir a transferência vertical de microrganismos endofíticos (MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004; GAO; MENDGEN, 2006). Algumas bactérias endofíticas que possuem características benéficas podem ser inoculadas em sementes previamente à germinação destas. No entanto, o perfil e as estratégias naturais de colonização e permanência na interior da planta hospedeira são ainda pouco conhecidos (HALLMANN et al., 1997).

A bactéria endofítica *Pantoea agglomerans* tem sido descrita como sendo uma espécie efetiva no controle de doenças de plantas (COSTA et al., 2002; HSIEH et al., 2005), na produção de antibióticos (WRIGHT et al., 2001) e na promoção de crescimento (PROCÓPIO, 2004; FENG et al., 2006). *Pantoea* sp. também é descrita como fitopatógeno para algumas espécies de *Eucalyptus* na África do sul (COUTINHO et al., 2002; MEDRANO; BELL 2007). O isolado 33.1 de *P. agglomerans* foi isolado endofiticamente em *Eucalyptus* sp. e após testes de patogenicidade foi observado que não apresenta patogênese à *Eucalyptus* (PROCÓPIO, 2004). Este autor também mostrou que o isolado 33.1 tem outras características benéficas como promoção de crescimento vegetal.

Dessa forma, no presente trabalho foi avaliada a presença de bactérias endofíticas cultivadas presentes em sementes de *Eucalyptus* sp., bem como perfil de colonização e distribuição de *P. agglomerans* no interior de plântulas obtidas de sementes previamente inoculadas com esta bactéria endofítica. A inoculação de sementes com bactérias endofíticas benéficas ao desempenho e adaptação das plantas pode ser uma boa estratégia para proteção de plântulas. Assim, os objetivos deste estudo foram: (i) detectar e identificar bactérias endofíticas em sementes e plântulas de diferentes espécies de *Eucalyptus* utilizando análises de isolamento, ARDRA e sequenciamento do 16S rDNA; (ii) estudar a padrão de colonização de plântulas de *Eucalyptus* sp. pela bactéria endofítica geneticamente modificada *Pantoea agglomerans* utilizando análises de isolamento e microscopia de fluorescência.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Plantas e microrganismos utilizados

As espécies de *Eucalyptus* utilizadas neste estudo foram *E. grandis*, *E. dunni*, *E. robusta*, *E. camandulensis*, *E. citriodora*, *E. urophylla*, *E. brassiana* e *E. saligna*, além dos híbridos *E. grandis* x *E. globulosos* e *E. robusta* x *E. grandis*. As sementes foram gentilmente cedidas pela Cia. Suzano de Papel e Celulose (Itapenininga, SP, Brasil). A linhagem endofítica 33.1 *Pantoea agglomerans* utilizada nesse trabalho foi isolada de *Eucalyptus* sp. sem apresentar sintomas

fitopatogênicos em plantas de *Eucalyptus* (PROCÓPIO, 2004). Esta linhagem foi geneticamente modificada Eng^a. Agrônoma Maria Carolina Quecine que inseriu um gene repórter responsável pela produção de *gfp* (Proteína verde fluorescente), gerando o clone 33.1:*gfp*.

3.2.1.2 Germinação das sementes e obtenção das plântulas

A germinação das sementes foi realizada após a desinfestação superficial (etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio (2% Cl ativo) por 2 min, etanol 70% por 1 min e duas lavagens com água destilada esterilizada) em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) a 25°C com 12 h de fotoperíodo. Trinta dias após a germinação as plântulas foram usadas para o isolamento de bactérias endofíticas.

3.2.1.3 Isolamento de bactérias endofíticas das sementes e das plântulas

O isolamento de bactérias endofíticas foi realizado após a desinfestação superficial das sementes e das plântulas com os seguintes passos: lavagens em etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio (2% Cl ativo) por 2 min, etanol 70% por 1 min e duas lavagens em água destilada esterilizada. Após a desinfestação superficial as sementes foram trituradas em tampão fosfato (PBS, contendo [g L⁻¹] 1,44 Na₂HPO₄; 0,24 KH₂PO₄; 0,20 KCl; 8,00 NaCl; pH 7,4) esterilizado e incubadas sob agitação (150 r.p.m.) por uma 1 h. Após , foram realizadas e inoculadas diluições apropriadas em meio de cultura TSA 10% (Tryptona Soja Agar – Merk, pH 7,3) suplementado com 50 µg mL⁻¹ do fungicida benomyl para evitar o crescimento de fungos. As placas foram incubadas a 28°C por 20 dias e o número de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) foi quantificado para estimar as respectivas densidades populacionais. A eficiência do processo de desinfestação superficial foi testada com o plaqueamento de alíquotas da água esterilizada, utilizada na última lavagem do referido processo, em meio TSA 10%. A incubação foi realizada nas mesmas condições supra mencionada. Após a quantificação e purificação os isolados bacterianos foram dissolvidos em solução de glicerol 20% e estocados a -70°C.

3.2.1.4 Amplificação do gene 16S rRNA de colônias bacterianas

A amplificação do 16S rDNA foi realizada por PCR direto de colônias bacterianas sem extração de DNA. As colônias de interesse foram crescidas em meio de cultura TSA 10% e transferidas para um tubo contendo 200 µl de água deionizada ultra-pura esterilizada. A quantidade de 1 µL dessa suspensão bacteriana foi utilizada como fonte de DNA para realização da PCR. Os iniciadores ou *primers* utilizados foram o PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1387R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'). As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 1 µL da suspensão bacteriana, 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxiribonucleotídeos trifosfato, 200 mM de cada iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Um controle negativo (reação de PCR sem suspensão bacteriana) foi incluído em todos os eventos de amplificação. A PCR foi realizada em um termociclador PTC – 200 (MJ Research, USA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 62,5 °C por 1 min e 72 °C por 1 min. Uma extensão final de 72 °C por 7 min. A confirmação da amplificação do fragmento de DNA alvo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), coloração com brometo de etídio e observação do fragmento de tamanho esperado (1400 pb) sobre luz ultravioleta.

3.2.1.5 Análise da diversidade por ARDRA (*Amplified rDNA restriction analysis*)

A análise de restrição dos fragmentos amplificados a partir dos isolados foi realizada por digestão de 1 µg dos produtos de PCR utilizando 2 U da enzima de restrição HhaI (Fermentas Life Sciences, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. A avaliação dos perfis de restrição foi realizada por eletroforese em géis de agarose 2,5% (p/v) corados com brometo de etídio e observados sobre luz ultravioleta. Os perfis de clivagem foram comparados e a ocorrência de cada um dos ribotipos determinada dentro de cada amostra.

3.2.1.6 Sequenciamento e análise do gene 16S rRNA

Os isolados representativos de cada ribotipo foram seqüenciados no Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo para identificar as espécies bacterianas mais freqüentes. Para tanto, os produtos de PCR gerados pelos iniciadores P027F e 1387R foram purificados com polietilenoglicol (polietilenoglicol 8000 20%; NaCl 2,5 mM) e submetidos ao sequenciamento parcial do 16S rDNA. As seqüências obtidas foram comparadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997) contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology information website*).

3.2.1.7 Inoculação das sementes e reisolamento de *Pantoea agglomerans* 33.1:gfp

Inicialmente as sementes foram desinfestadas superficialmente seguindo o procedimento descrito anteriormente. Após isso, *P. agglomerans* foi inoculada nas sementes das espécies *E. grandis* e *E. urophyla* e do híbrido *E. grandis* x *E. globulosos*. As sementes foram mantidas por 1h em uma suspensão bacteriana (10^8 UFC. mL⁻¹) do isolado 33.1:gfp de *P. agglomerans* e posteriormente plantadas em substrato PlantMax[®] (Eucatex).

Os reisolamentos de *P. agglomerans* 33.1:gfp foram realizados de plântulas com 15 e 30 dias após a germinação. Cinco plântulas de cada espécie foram utilizadas em cada avaliação da colonização do rizoplane e do interior da planta (endófitos). Para os reisolamentos da linhagem 33.1:gfp do rizoplane foram colocadas as raízes em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 25 g de pérolas de vidro (0,1 cm de diâmetro) e 50 mL de PBS esterilizado. Os frascos foram mantidos sob agitação (150 r.p.m.) a 28°C por 1 h. Após isso, foram realizadas e semeadas diluições apropriadas em meio LB (10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl, 1L H₂O). Nos reisolamentos de 33.1:gfp do interior de folhas, caules e raízes, os tecidos foram desinfestados superficialmente e macerados em tampão PBS esterilizado. Posteriormente, diluições apropriadas desta suspensão foram semeadas sobre meio LB. Nos reisolamentos do rizoplane e endofíticos o meio de cultura foi suplementado com 50 µg mL⁻¹ do antibiótico canamicina e as placas foram incubadas a 28°C por até 72 horas, quando as respectivas densidades populacionais foram estimadas.

3.2.1.8 Microscopia de fluorescência

As plântulas foram retiradas dos vasos 15 dias após a germinação das sementes e lavadas em água corrente. As folhas, caules e raízes foram cortados em pequenos pedaços (fatias) e montados sobre lâminas de microscópio contendo uma solução de glicerol 10 %. As análises no microscópio de fluorescência foram realizadas em um microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) com filtro apropriado. As células de 33.1:*gfp* foram excitadas com um filtro de 490 nm. As imagens foram captadas com auxílio de uma câmera de vídeo e do programa ISIS (Meta Systems, Germany).

3.2.1.9 Análises estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas usando o pacote do programa SAS [Copyright (c) 1989–96 by SAS Institute, Cary, NC USA]. Os valores de contagem bacteriana foram transformados usando $\log_{10}$ of $X+1$ antes das análises de variância ($P < 0.05$). O teste de Tukey foi usado para comparação de médias.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Isolamento e identificação das bactérias endofíticas nativas

Foi possível isolar de forma consistente bactérias endofíticas de sementes de 6 das 10 espécies e híbridos de *Eucalyptus* estudados (Tabela 3.1). Foi observada diferença significativa ($P \leq 0.05$) entre as plantas avaliadas quanto à densidade de bactérias endofíticas de sementes, onde essas densidades variaram entre 0,33 a $1,83 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, para as espécies *E. camandulensis* e *E. urophylla*, respectivamente. Entretanto, para *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. robusta* e *E. saligna*, nenhuma bactéria foi isolada de sementes após desinfecção superficial (Tabela 3.1).

A densidade bacteriana de plântulas de *Eucalyptus* sp. foi significativamente ($P \leq 0.05$) diferentes entre as espécies de *Eucalyptus* (Tabela 3.1), variando entre $0,27 \times 10^2$ a $0,87 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, para *E. citriodora* e para o híbrido *E. robusta* x *E. grandis*, respectivamente. Entretanto, nenhuma bactéria foi isolada de plântulas obtidas de sementes após desinfecção superficial de *E.*

Tabela 3.1 – Densidade de bactérias endofíticas isoladas de sementes e plântulas das diferentes espécies de *Eucalyptus* estudadas. Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$)

Espécies de <i>Eucalyptus</i>	Densidade bacteriana (UFC.g ⁻¹ tecido)			
	Sementes*		Plântulas**	
<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>	0,66 x 10 ²	a	0,87 x 10 ²	a
<i>E. brassiana</i>	1,33 x 10 ²	a	0,83 x 10 ²	a
<i>E. globulus</i> x <i>E. grandis</i>	1,66 x 10 ²	a	0,58 x 10 ²	ab
<i>E. citriodora</i>	1,00 x 10 ²	a	0,27 x 10 ²	ab
<i>E. urophylla</i>	1,83 x 10 ²	a	0,41 x 10 ²	b
<i>E. camandulensis</i>	0,33 x 10 ²	b	NO***	c
<i>E. dunnii</i>	NO	c	NO	c
<i>E. grandis</i>	NO	c	NO	c
<i>E. robusta</i>	NO	c	NO	c
<i>E. saligna</i>	NO	c	NO	c

*Valores médios de três replicatas em dois isolamentos independentes a partir de 1g de sementes por espécie. ** Valores médios de três replicatas em dois isolamentos independentes a partir de dez plântulas por espécie. *** Não observado.

camandulensis, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. robusta* e *E. saligna*, (Tabela 3.1). Dessa forma, embora tenha sido isolado bactérias de sementes *E. camandulensis*, nenhuma bactéria foi obtida das plântulas germinadas a partir destas sementes.

A análise por ARDRA de 50 isolados endofíticos de sementes e plântulas, mostrou a presença de pelo menos 8 ribotipos (A, B, C, D, E, F, G, H) (Tabela 3.2). Destes, 4 ribotipos (A, B, F, H) foram encontrados tanto em sementes quanto em plântulas de *Eucalyptus*. Enquanto os ribotipos G, E e D foram observados exclusivamente em plântulas e o ribotipo C exclusivamente em sementes (Tabela 3.2). O sequenciamento parcial do 16S rDNA permitiu verificar que a comunidade bacteriana associada às sementes de *Eucalyptus* é constituída por *Bacillus* sp., *B. megaterium*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *M. variabile*, *M. gregens*, *Paracoccus* sp., *Paenibacillus* sp, *P. humicus*, *Sphingomonas phyllosphaerae* e bactérias da família Frankiaceae: Actinobacteria (Tabela 3.2).

3.2.2.2 Colonização das plântulas por *Pantoea agglomerans* 33.1:gfp

Após inoculação via sementes, as densidades totais da linhagem 33.1:gfp presentes no rizoplano e interior das plântulas foram estimadas para todos os tecidos vegetais das espécies e híbridos de *Eucalyptus* analisadas neste experimento. A linhagem 33.1:gfp foi isolado da

Tabela 3.2 - Identificação de bactérias representativas dos ribotipos de ARDRA, isoladas de sementes e plântulas *Eucalyptus*. A identificação molecular das espécies foi realizada por sequenciamento parcial do 16S rDNA e análises de comparação no BLASTn (*National Center for Biotechnology information website*)

Ribotipos	Tecido	Classe	Espécie (Blast-NCBI)	%*	Linhagem referência
A	Sementes e plântulas	Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	EU124555.1
A			<i>Bacillus</i> sp.	100%	EU104731.1
B			<i>Paenibacillus</i> sp.	99%	DQ288677.1
B			<i>Paenibacillus humicus</i>	98%	AM411528.3
H			<i>Enterococcus mundtii</i>	98%	EF428252.2
F	Sementes	Alfaproteobacteria	<i>Methylobacterium</i> sp.	85%	EF116592.1
F	e plântulas		<i>M. variabile</i>	97%	AJ851087.1
G	Plântulas		<i>M. gregens</i>	99%	AB252209.1
E			<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i>	97%	AY563441.1
D			<i>Paracoccus</i> sp.	97%	EF070124.1
C	Sementes	Actinobacteria	<i>Frankiaceae</i>	97%	DQ490442.1

*Similaridade com a linhagem de referência.

superfície de raízes (rizoplano) e do interior de raízes e caules (endofítico) de *E. grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. globulosos*. As maiores e menores densidades de colonização foram observadas nas amostras de rizoplano e caules, respectivamente. O número de UFCs isoladas a partir do rizoplano do híbrido *E. grandis* x *E. globulosos* foram significativamente ($P \leq 0.05$) maiores do que as observadas para espécie *E. grandis*. Nas densidades bacterianas isoladas das raízes e caules (endofiticamente) não foram observadas diferenças significativas. Com auxílio da microscopia de fluorescência foi possível confirmar a colonização endofítica por 33.1:*gfp* nos espaços intercelulares das raízes (Figura 3.1A e 3.1B) e no caule a colonização foi observada nos vasos xilemáticos (Figura 3.1C e 3.1D). As plântulas de *E. urophila* e os tecidos foliares de todas as espécies analisadas não foram colonizados pelo isolado bacteriano inoculado, tanto nos ensaios de reisolamento quanto nas análises de microscopia de fluorescência.

3.2.3 Discussão

A presença de microrganismos em sementes tem sido estudada e relatada para várias espécies (GRANÉR et al., 2003; RUDGERS et al., 2004; MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004; JORDAAN et al., 2006; RUDGERS; CLAY, 2007). MAJEWSKA-SAWKA e NAKASHIMA (2004) também estudaram a presença de microrganismos endofíticos

Fig 3.1 – Visualização de *Pantoea agglomerans* 33.1:*gfp* endofiticamente em plântulas de *Eucalyptus*. A inoculação foi realizada nas sementes. (A, B) colônias de 33.1:*gfp* colonizando os espaços intercelulares das raízes. (C, D) colônias de 33.1:*gfp* colonizando interior dos vasos xilemáticos. Barra de escala = 10 μ M

em flores. A maioria dos estudos que visam entender a presença e perfil de colonização de microrganismos endofíticos em sementes está sendo realizada com as comunidades fungicas, e conseqüentemente poucos trabalhos tem investigado a colonização bacteriana (GAO; MENDGEN, 2006; JORDAAN et al., 2006; BENNETT; WHIPPS, 2007). Além disso, os estudos realizados não trazem informações sobre a presença ou persistência desses microrganismos nas plântulas **ou plântulas** após a germinação dessas sementes.

Estudos realizados com sementes de outras espécies têm mostrado um decréscimo nas densidades de microrganismos proporcional ao tempo de estocagem das mesmas (MUNDT HINKLE, 1976; BACON; HINTON, 1996; CANKAR et al., 2005). No presente trabalho, foi observada a presença de pelo menos 6 gêneros bacterianos em sementes e plântulas de

Eucalyptus, sendo que 4, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterococcus* e *Methylobacterium* foram isolados de sementes e de plântulas, mostrando que podem ser disseminados via sementes. Já *M. gregens* e *S. phyllosphaerae*, embora tenha sido isolada a partir de plântulas, não foram observadas em sementes, sugerindo que ou se encontram em densidade muito baixa nas sementes, impossibilitando o seu isolamento, ou está em estado de dormência nas sementes, fato este que poderia estar associado a estímulos da planta somente durante a germinação.

Os gêneros bacterianos encontrados como endófitos de sementes de *Eucalyptus* já foram previamente descritas como endófitos em sementes de várias espécies vegetais (MUNDT; HINKLE, 1976; BACON; HINTON, 1996; PIRTTILA et al., 2000; GRANÉR et al., 2003; MANO et al., 2007), mas nunca foram observados em sementes de *Eucalyptus*, ou causando doenças na planta hospedeira, sugerindo que poderiam ser utilizados para promoção crescimento e proteção da planta hospedeira. Neste contexto, *Bacillus* spp. tem sido avaliado quanto ao seu potencial no controle biológico (RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR et al., 2007); *Paracoccus* e *Frankia* como fixadores de nitrogênio (STROH et al., 2004; GAULKE et al., 2006); *Bacillus* e *Paracoccus* como produtores de hormônio de crescimento (TSAVKELOVA et al., 2007); e *Methylobacterium* como indutor de resistência sistêmica em plantas (MADHAIYAN et al., 2004). Adicionalmente, *Methylobacterium* também pode estimular ou induzir o processo de germinação de sementes e promover o crescimento das raízes e alterar sua morfologia (HOLLAND, 1997; FREYERMUTH et al., 1996).

Tendo em vista a colonização da plântula pela linhagem 33.1:*gfp*, pode ser sugerido que após germinação das sementes, a bactéria pode colonizar a raiz ou caule, ocupando os espaços intercelulares da planta hospedeira. O perfil de colonização da linhagem endofítica 33.1:*gfp* nas plântulas de *Eucalyptus* foi similar ao perfil observado para endófitos em outras espécies, tais como milho (FISHER et al., 1992) ervilha (ELVIRA-RECUENCO; van VUURDE, 2000) e soja (KUKLINSKY-SOBRAAL et al., 2004; MENDES et al., 2007), onde a maior concentração bacteriana ocorre no rizoplane seguido de raízes e caules. Lacava et al (2007) e Germaine et al (2004) usaram microscopia de fluorescência para estudar o perfil de colonização de microrganismos geneticamente modificados em plantas de *Citrus* e *Populus*, respectivamente. Esses autores descreveram que o método foi eficiente para visualizar a expressão de *gfp* por microrganismos colonizando no interior de raízes e caules.

A presença de bactéria no interior de sementes de *Eucalyptus* pode possibilitar a obtenção de plântulas que vão a campo já inoculadas com bactérias que podem aumentar o desenvolvimento da planta hospedeira, sendo dessa forma uma interessante estratégia de obtenção de plântulas com maior potencial de produção. Este é o primeiro relato da detecção e identificação de comunidades bacterianas em sementes e a persistência desses microrganismos nas plântulas em diferentes espécies de *Eucalyptus*. Os resultados sugerem ainda que possa ocorrer transmissão vertical desses microrganismos endofíticos via sementes, a qual poderia estar associada a processos coevolutivos entre a planta e a sua comunidade bacteriana endofítica, no qual a planta poderia ganhar proteção contra predação e patógenos. Dessa forma, uma planta que já possui uma comunidade microbiana endofítica poderia passar esses microrganismos e as possíveis características intrínsecas aos seus descendentes.

Referências

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W. JR.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, 2000.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plant. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Eds.) **Fungi: Multifaceted Microbes**, New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. chap. 6, p. 189-207.

BACON, C.W.; HINTON, D.M. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, p. 1195-1202, 1996.

BENNETT, A.J.; WHIPPS, J.M. Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, 2007. In Press.

BRACELPA. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra/index.html>> acesso em: 11 nov. 2006.

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

COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; DELGADO, J.; VINÃS, I. Water activity, temperature, and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 1082–1088, 2002.

COUTINHO, T.A.; PREISIG, O.; MERGAERT, J.; KNOCKAERT, M.C.; RIEDE, K.H.; SWINGS, J.; WINGFIELD, M. Bacterial Blight and Dieback of *Eucalyptus* Species, Hybrids, and Clones in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 20-25, 2002.

ELVIRA-RECUENCO, M.; van VUURDE, J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 1036-1041, 2000.

Embrapa. Disponível em:
<http://www.21.sede.embrapa.br/linhas_de_acao/temas_basicos/florestas/index_html> acesso em:
28 maio 2006.

FENG, Y.; SHEN, D.; SONG, W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS 19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 938-945, 2006.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; SCOOT, H.M.L. The Distribution of Some Fungal and Bacterial Endophytes in Maize (*Zea-Mays* L). **New Phytologist**, Oxford, v. 122, p. 299-305, 1992.

FREYERMUTH, S.K.; LONG, R.L.G.; MATHUR, S. Metabolic aspects of plant interaction with commensal methyloprophs. In: LIDSTROM M.E.; TABITA, F.R. (Eds). **Microbial growth on C1 compounds**. Kluwer: The Netherlands, 1996, p. 277-284.

GAO, K.; MENDGEN, K. Seed-transmitted beneficial endophytic *Stagonospora* sp. can penetrate the walls of the root epidermis, but does not proliferate in the cortex, of *Phragmites australis*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 84, p. 981-988, 2006.

GAULKE, L.S.; HENRY, C.L.; BROWN, S.L. Nitrogen fixation and growth response of *Alnus rubra* amended with low and high metal content biosolids. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 351-360, 2006.

GERMAINE, K.; KEOGH, E.; GARCIA-CABELLOS, G.; BORREMANS, B.; van DER LELIE, D.; BARAC, T.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J.; MOORE, F.P.; MOORE, E.R.B.; CAMPBELL, C.D.; RYAN, D.; DOWLING, D.N. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 109-118, 2004.

GRANÉR, G.; PERSSON, P.; MEIJER, J.; ALSTRÖM, S. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 224, p. 269-276, 2003.

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

HOLLAND, M.A. *Methylobacterium* in plants. **Recent Research Development**, Trivandrum, v. 1, p. 207-213, 1997.

HSIEH, T.F.; HUANG, H.C.; ERIKSON, R.S. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 608-614, 2005.

JORDAAN, A.; TAYLOR, J.E.; ROSSENKHAN, R. Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods of *Colophospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 72, p. 245-255, 2006.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; DAMODARAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; SAMIYAPPAN, R. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1087-1098, 2007.

KOZDRÓJ, J.; TREVORS, J.T.; van ELSAS, J.D. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1775–1784, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Evaluation of endophytic colonization of *Citrus sinensis* and *Catharanthus roseus* seedlings by endophytic bacteria. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 45, p. 11-14, 2007.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; RYU, J.; AS, T. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Oxford, v. 45, p. 315-324, 2004.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; NAKASHIMA, H. Endophyte transmission via seeds of *Lolium perenne* L.: immunodetection of fungal antigens. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 534-541, 2004.

MANO, H.; TANAKA, F.; NAKAMURA, C.; KAGA, H.; MORISAKI, H. Culturable Endophytic Bacterial Flora of the Maturing Leaves and Roots of Rice Plants (*Oryza sativa*) Cultivated in a Paddy Field. **Microbes and Environments**, Sendai, v. 22, p. 175-185, 2007.

MEDRANO, E.G.; BELL, A.A. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 134-143, 2007.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, AEM.01222-07, 2007. In Press.

MUNDT, J.O.; HINKLE, F.N. Bacteria with ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 32, p. 694-698, 1976.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473- 497, 1962.

PIRTTILA, A.M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3073-3077, 2000.

POKE, F.S.; VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M.; REID, J.B. Genomic Research in Eucalyptus. **Genetica**, Dordrecht, v. 125, p. 79-101, 2005.

PROCÓPIO, R. **Diversidade bacteriana endoítica de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 101 p. (Tese de Doutorado, Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RUDGERS, J.Á.; CLAY, K. Endophyte symbiosis with tall fescue: How strong are the impacts on communities and ecosystems? **Fungal Biology Reviews**, 2007, In Press.

RUDGERS, J.A.; KOSLOW, M.; CLAY, K. Endophyte fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology letters**, Oxford, v. 7, p. 42-51, 2004.

RYU, C.M.; KIM, J.; CHOI, O.; KIM, S.H.; PARK, C.S. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 282-289, 2006.

SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. Role of Antibiosis in Suppression of Charcoal Rot Disease by Soybean Endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New york, v. 55, p. 25-29, 2007.

STROH, A.; ANDERKA, O.; PFEIFFER, K.; YAGI, T.; FINEL, M.; LUDWIG, B.; SCHÄGGER, H. Assembly of Respiratory Complexes I, III, and IV into NADH Oxidase Supercomplex Stabilizes Complex I in *Paracoccus denitrificans*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 5000-5007, 2004.

TSAVKELOVA, E.A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; BOTINA, S.G.; NETRSOV, A.I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 162, p. 69-76, 2007.

VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J.S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, p. 371-380, 2005.

WRIGHT, S.A.I; ZUMOFF, C.H.; SCHNEIDER, J.; BEER, S.V. *Pantoea agglomerans* Strain EH318 Produces Two Antibiotics That Inhibit *Erwinia amylovora* In Vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 284-292, 2001.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram utilizadas diferentes metodologias, dependentes e independentes do cultivo das bactérias em meio de cultura, com intuito de avaliar as interações entre as bactérias de *Eucalyptus* e o fitopatógeno *Ceratocystis fimbriata*. Adicionalmente, foi avaliado o padrão de colonização de diferentes espécies de *Eucalyptus* sp. e a diversidade de bactérias endofíticas, em sementes de espécies e híbridos desse gênero, bem como a possível transmissão vertical das mesmas.

No capítulo 2, os resultados das análises, dependentes do cultivo, da diversidade das comunidades bacterianas acessada por isolamentos, ARDRA e sequenciamentos mostraram que a presença de *C. fimbriata* induz uma maior densidade e diversidade de bactérias em raízes de *Eucalyptus*. As análises de diversidade bacteriana por DGGE associada à análise por PCA confirmam está hipótese, mostrando que a comunidade bacteriana endofítica de raízes infectada por *C. fimbriata* é significativamente diferente das demais. Foi observado também que *Pseudomonas veronii* e *Rahnella aquatilis* estão presentes apenas em plantas saudáveis, sugerindo que podem estar associadas à sanidade da planta hospedeira.

No capítulo 3, foi observado que bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Methylobacterium* e *Paenibacillus* e podem ser transmitidas por sementes, já que os mesmos foram observados endofiticamente em sementes e plântulas de *Eucalyptus* germinadas a partir de sementes desinfetadas superficialmente. Foi observado também que a linhagem 33.1:gfp de *P. agglomerans* após inoculação via sementes coloniza o rizoplane, e os espaços intercelulares de raízes e caules de *Eucalyptus* sp.

Concluindo, o presente trabalho mostra que a comunidade bacteriana associada às raízes de *Eucalyptus* pode ser influenciada por *C. fimbriata*, bem como a presença desse fungo pode ser modulada pela presença de bactérias do rizoplane e endofíticas. Além disso, foi observado que embora a fonte principal de bactérias que colonizam endofiticamente a planta deve ser o solo, passando pela rizosfera e rizoplane, algumas bactérias podem ser transmitidas verticalmente via sementes, sugerindo uma forma eficiente de obtenção de plântulas previamente inoculadas com bactérias que aumentam o desenvolvimento da planta no campo.