**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Interações entre bactérias endofíticas e do rizoplane com fungos
causadores da murcha e cancro de *Eucalyptus***

Anderson Ferreira

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2010**

Anderson Ferreira
Ciências Biológicas – Ênfase em Biotecnologia

**Interações entre bactérias endofíticas e do rizoplane com fungos causadores da
murcha e cancro de *Eucalyptus***

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Ferreira, Anderson

Interações entre bactérias endofíticas e do rizoplane com fungos causadores da murcha e cancro de *Eucalyptus* / Anderson Ferreira. - - Piracicaba, 2010.
130 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bactérias 2. Cancro (Doença de planta) 3. DNA 4. Ecologia microbiana 5. Eucalipto (Doença de planta) 6. Fitopatógenos 7. Microrganismos endofíticos 8. Microscopia 9. Murcha (Doença de planta) I. Título

CDD 634.9734
F383i

"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 e a Profa. Dra. Cláudia Barros Monteiro Vitorello 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, Cristiane Fasanella, 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, Viviane Colombari pela alegria, amizade e discussões.

Aos colegas Armando Dias, Danice Luvizotto e Francisco Andreote pela amizade, companheirismo e muita ajuda; tanto no trabalho quanto nos momentos de descontração.

Ao NAP/MEPA (Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura) pelas facilidades quando do uso dos microscópios e estrutura em geral;

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;

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. “Ele” sabe que, se chegar ao final da jornada num paraíso vazio, sua luta não terá valido a pena. (Paulo Coelho).

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Revisão bibliográfica	19
1.1.1 Microrganismos endofíticos	19
1.1.2 Microrganismos endofíticos em sementes	22
1.1.3 Cancro e murcha de <i>Eucalyptus</i>	24
1.1.4 Biologia molecular no estudo de ecologia microbiana	26
1.1.5 Transformação genética de fungos via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
Referências	30
2 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM SEMENTES DE <i>Eucalyptus</i> spp.	43
Resumo	43
Abstract	43
2.1 Introdução	44
2.2 Material e Métodos.....	46
2.2.1 Material vegetal de <i>Eucalyptus</i>	46
2.2.2 Isolamento de bactérias endofíticas das sementes	47
2.2.3 Procedimentos de germinação e coleta de sementes	47
2.2.4 Identificação molecular das bactérias endofíticas	47
2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
2.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	49
2.2.7 Extração de DNA total de sementes	49
2.2.8 Análise por DGGE (Gradiente Desnaturante em Gel de Eletroforese)	50
2.2.9 Análise estatística	51
2.3 Resultados	51

2.3.1 Isolamento e caracterização molecular de bactérias endofíticas de sementes.....	51
2.3.2 Análise por MEV.....	56
2.3.3 Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	60
2.3.4 Análise por DGGE	64
2.4 Discussão.....	65
Referências.....	69
3 EFEITOS DOS EXSUDADOS DE SEMENTES DE <i>Eucalyptus</i> SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Ceratocystis. Fimbriata</i> E <i>Bipolaris</i> sp.	75
Resumo.....	75
Abstract.....	75
3.1 Introdução.....	76
3.2 Material e Métodos.....	78
3.2.1 Isolados fúngicos	78
3.2.2 Isolamento de fungos a partir de plantas com sintomas	79
3.2.3 Identificação molecular dos isolados fúngicos	79
3.2.3.1 Extração de DNA	79
3.2.3.2 Amplificação das regiões ITS dos isolados fúngicos	79
3.2.3.3 Seqüenciamento e análise das regiões ITS dos isolados fúngicos	80
3.2.4 Atratividade química de sementes de <i>Eucalyptus</i> a CfSz e Agn7	80
3.2.5 Efeito de CfSz e Agn 7 sobre mudas de <i>Eucalyptus</i>	82
3.2.6 Transformação genética de fungos.....	82
3.2.6.1 Teste de sensibilidade a higromicina B	82
3.2.6.2 Linhagem de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e vetor de transformação.....	83
3.2.6.3 Otimização do protocolo de transformação.....	84
3.2.6.4 Análise da estabilidade dos transformantes.....	86
3.2.6.5 Purificação e estocagem dos fungos.....	86
3.2.6.6 Análise dos transformantes por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	86

3.2.6.7 Análise dos transformantes por microscopia óptica de fluorescência (MOF)	87
3.3 Resultados	88
3.3.1 Isolamento de fungos de plantas com sintomas.....	88
3.3.2 Identificação dos isolados fúngicos e análise da região ITS	89
3.3.3 Atratividade química de sementes de <i>Eucalyptus</i> a CfSz e Agn7 ...	90
3.3.4 Efeito de CfSz e Agn 7 sobre mudas de <i>Eucalyptus</i>	93
3.3.5 Transformação genética de CfSz <i>Bipolaris</i> sp.	95
3.3.5.1 Teste de sensibilidade do isolado CfSz de <i>Bipolaris</i> sp. a higromicina B	95
3.3.5.2 Otimização do protocolo de transformação.....	95
3.3.5.3 Análise da estabilidade mitótica.....	96
3.3.5.4 Análise dos transformantes por PCR e por microscopia óptica de fluorescência (MOF)	96
3.4 Discussão.....	98
Referências.....	102
4 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E DO RIZOPLANO DE <i>Eucalyptus</i> COM POTENCIAL NO CONTROLE BIOLÓGICO DE MURCHA E CANCRO.....	111
Resumo.....	111
Abstract.....	111
4.1 Introdução.....	112
4.2 Material e Métodos.....	114
4.2.1 Isolados Bacterianos	114
4.2.2 Seleção de isolados com ação antifúngica	115
4.2.3 Identificação molecular das bactérias	115
4.3 Resultados	116
4.3.1 Bactérias com ação antifúngica e identificação molecular	116
4.4 Discussão	120
Referências	122
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	129

RESUMO

Interações entre bactérias endofíticas e do rizoplane com fungos causadores da murcha e cancro de *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 planta-microrganismo 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, como o controle biológico de doenças. As doenças com sintomas de murcha e cancro são consideradas emergentes no setor florestal. O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de *Eucalyptus* 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 e do rizoplane têm sido descritos como potenciais controladores biológicos de doenças. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a interação da comunidade bacteriana associada a *Eucalyptus* sp. com fungos causadores de murcha e cancro. Foi também estudada a diversidade e colonização desses endófitos em sementes e o efeito da germinação nessa interação. Adicionalmente, foi realizada uma busca por bactérias associadas a *Eucalyptus* sp. com capacidade de controlar fungos causadores de murcha e cancro. Foi observado que a densidade bacteriana endofítica não difere entre as espécies de *Eucalyptus citriodora*, *E. urophylla* e *E. globulus* x *E. grandis* avaliadas e que esta comunidade cultivada é composta por bactérias pertencentes às classes *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Com uso de diferentes ferramentas de estudo foi observado que a quantidade de bactérias endofíticas nas sementes aumenta proporcionalmente ao tempo de germinação. Foi observado também que os sintomas de murcha e cancro causados, principalmente, por *Ceratocystis fimbriata* podem ser causados por outros fungos patogênicos. Foram identificados 41 isolados bacterianos endofíticos e do rizoplane com capacidade de controlar fungos patogênicos causadores de murcha e cancro em *Eucalyptus* sp. Adicionalmente ao potencial para uso no controle biológico do cancro e da murcha de *Eucalyptus*, as bactérias de sementes aqui relatadas, podem ter papel importante de proteção das plantas no campo. Futuros estudos devem ser direcionados para identificação de genes associados a essa inibição, bem com análise dos fatores responsáveis por este controle biológico no campo.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; 16S DNAr; Interações planta-microrganismo; DGGE; Microscopia

ABSTRACT

Interactions among endophytic and rhizoplane bacteria with fungi that cause wilt and canker in *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 plant-microorganism is specific to certain species of plants and/or bacteria. In the last few years studies of endophytic microorganisms have been carried out for several plant hosts, which are focused mainly to diversity and biotechnological potential, such as biological control of disease. Brazil is one of the largest world *Eucalyptus* producers and the increasing of the *Eucalyptus* production associated to clonally reproduction has allowed an increasing incidence of some pathogens. These new disease demands on studies related to causal agent and biotic and abiotic factors associated to the diseases. The canker of *Eucalyptus* is considered an emerging disease by several reforestation companies. In that way, the rhizoplane and endophytic microorganisms has been described as potential diseases biological control agents. In this context, the aims of the present work were to assess the bacterial community associated to *Eucalyptus* sp. plants and seeds, besides the interaction with the wilt and canker pathogenic fungi. We also assessed the diversity and colonization effect of seed germination on bacterial community. Additionally, was carried out a screening of the *Eucalyptus* sp. associated bacteria against pathogenic fungi that cause wilt and canker. We observed that endophytic bacterial density doesn't differ among the species of *Eucalyptus citriodora*, *E. urophylla* and *E. globulus* x *E. grandis* and that this cultivated community is composed by follow bacterial classes *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Firmicutes*. Using different study approaches was observed that the amount of endophytic bacteria in the seeds increases proportionally at the germination time. We also observed that the symptoms of wilt and canker caused, mainly, by *Ceratocystis fimbriata* may be caused by other pathogenic fungi too. Additionally, were identified 41 endophytic and rhizoplane bacterial isolates able to control pathogenic fungi that cause *Eucalyptus* wilt and canker. Besides to the wilt and canker biological control potential of that bacteria, the seed endophyte identified in the present work can have important function on plant protection in the field. New studies should be addressed for identification of genes related to antagonism, besides of factors responsible for biological control occurrence in the field.

Keywords: Microbial ecology; 16S rDNA; Plant microbe interactions; DGGE; 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 4 milhões de hectares plantados, representando aproximadamente 60% da área coberta por florestas exóticas no país. O setor de papel e celulose, uma das atividades ligadas a eucaliptocultura, foi responsável por 16% da balança comercial do Brasil no ano de 2009 e movimentou cerca de 5,8 bilhões de dólares em exportações. Somente esse setor é responsável por 114 mil empregos diretos no país.

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 clones de *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.

Muitos microrganismos patogênicos podem colonizar as plantas e permanecer em estado de latência ou assintomático, ou seja, sem causar sintomas de doença. Em *Eucalyptus* sp. isso também pode ocorrer, onde diferentes fungos patogênicos estão presentes em plantas sadias e somente causam sintomas de doença quando a planta é submetida a estresses bióticos e abióticos. Exemplo desses estresses bióticos e abióticos pode ser o ataque por outros patógenos mais agressivos e variações nas condições climáticas e nutritivas, respectivamente. Isso demonstra a complexidade das interações entre plantas e patógenos e dificulta ainda mais as estratégias de controle.

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 realizados em 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. No entanto, outros fungos patogênicos de *Eucalyptus* sp. tem sido relatados em plantas sadias e

assintomáticas e também manifestando sintomas de murcha e cancro após a planta ser submetida a estresses, como os acima mencionados. Essa similaridade de sintomas entre diferentes patógenos pode induzir pesquisadores a eventuais erros de identificação dos agentes causadores de uma determinada doença no campo. Dessa forma, os sintomas observados em diferentes regiões de plantio podem ser causados por diferentes agentes patogênicos. Isso dificulta as estratégias de controle das doenças, já que, ao se controlar uma espécie de patógeno específico outros patógenos em latência na planta poderiam vir a causar sintomas indesejáveis.

Uma alternativa para o controle desses patógenos é o controle biológico, o qual pode ser realizado com uso de microrganismos capazes de combater diferentes patógenos por meio de competição ou produção de compostos antagônicos. O controle biológico pode ser direcionado a um patógeno específico ou a grupos de patógenos possibilitando maior proteção das plantas. Microrganismos de comunidades do rizoplane e endofítica são descritos na literatura como benéficos às plantas hospedeiras, inclusive como potenciais agentes de controle biológico de fitopatógenos. Dentre esses microrganismos, destacam-se os endófitos, os quais 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 tem 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 tem 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 sensibilidade a diversidade microbiana, e dessa forma avaliar o efeito de diferentes variáveis nesta diversidade. Juntamente com as técnicas moleculares, os diferentes tipos de microscopia, como a eletrônica de

varredura, eletrônica de transmissão e óptica de fluorescência, tem possibilitado estudos importantes de interação de microrganismos e plantas *in situ* e independentes de cultivo desses microrganismos.

Além dos estudos de diversidade microbiana, outras áreas que utilizam a biologia molecular, também, tem sido amplamente utilizadas na identificação de genes de importância agrícola. A busca por esses genes podem ter diferentes finalidades, como por exemplo, no entendimento das interações entre endófitos e patógenos e o possível controle dos mesmos.

Atualmente, há pouca informação sobre a interação entre bactérias endofíticas, *Eucalyptus* e fitopatógenos. Porém, quando se busca de alternativas de controle biológico de uma doença emergente, como a murcha e cancro, há a necessidade de se entender melhor a interação planta-endófito-patógeno, bem como de genes que regulam essa interação.

1.1 Revisão bibliográfica

“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, Hallmann et al. (1997) definem bactérias endofíticas como aquelas que podem ser 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 ; 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; KOLSLOW; CLAY, 2004; MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004; JORDAAN; TAYLOR; ROSSENKHAN, 2006; RUDGERS; CLAY, 2007; FERREIRA et al., 2008).

O melhor entendimento dos mecanismos de transmissão, 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 em 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; KLOPPER, 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; TREVORS; Van ELSAS, 2004), por indução de resistência sistêmica (VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2002; KAVINO et

al., 2007) e/ou por competição (MARI; GUIZZARDI; PRATELLA, 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 da GFP (Proteína verde fluorescente) (KOZDRÓJ; TREVORS; Van ELSAS, 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; SHOLBERG; SAYLER, 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 geneticamente modificada 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 (FAHEY et al., 1991; TOMASINO et al., 1995).

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 desse efeito no ambiente é importante para manutenção do equilíbrio nos vários nichos ecológicos envolvidos quanto ao uso da tecnologia do DNA recombinante.

1.1.2 Microrganismos endofíticos em sementes

A interação, extremamente complexa, entre microrganismos e plantas é intrínseca a determinadas espécies de plantas e/ou microrganismos. Essa complexidade tem direcionado os estudos com endófitos não só para os focos tradicionais, como controle biológico de pragas e doenças, fixação de nitrogênio e promoção de crescimento vegetal, como, principalmente, para a investigação de padrões de colonização, forma de penetração e transferência desses microrganismos nas plantas (FERREIRA et al., 2008). Além das vias principais de penetração e colonização dos hospedeiros o fato de alguns autores terem relatado a presença de endófitos em sementes permite inferir que esses também podem ser transferidos verticalmente pela semente (RUDGERS; KOSLOW; CLAY, 2004; MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004; OKUNISHI et al., 2005; JORDAAN; TAYLOR; ROSSENKHAN, 2006; RUDGERS; CLAY, 2007; FERREIRA et al., 2008).

A maioria dos estudos que visam entender a presença e perfil de colonização de microrganismos endofíticos em sementes está sendo realizada com as comunidades fúngicas, e conseqüentemente poucos trabalhos tem investigado a colonização bacteriana (GAO; MENDGEN, 2006; JORDAAN; TAYLOR; ROSSENKHAN, 2006; BENNETT; WHIPPS, 2007). Em geral os microrganismos observados em sementes têm sido avaliados quanto ao seu potencial no controle biológico (RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007); fixação de nitrogênio (STROH et al., 2004; GAULKE; HENRRY; BROWN, 2006); produção de hormônio de crescimento vegetal (LAMBRECHT et al., 2000; MADHAIYAN et al., 2004; TSAVKELOVA et al., 2007) e como indutores de resistência sistêmica em plantas (MADHAIYAN et al., 2004). Adicionalmente, algumas espécies de microrganismos também podem estimular ou induzir o processo de germinação de sementes e promover o crescimento das raízes e alterar sua morfologia (HOLLAND, 1997; FREYERMUTH; LONG; MATHUR, 1996).

A distribuição dos endófitos nas sementes é aleatória e a quantidade por grama de sementes pode variar de acordo com a espécie vegetal ou anatomia e fisiologia da semente. Estudos realizados em diferentes estádios de maturação de sementes

demonstram que a diversidade e quantidade de microrganismos endofíticos presentes decresce de acordo com a fase de maturação das mesmas (OKUNISHI et al., 2005). Os microrganismos que possuem capacidade de entrar em estado de latência permanecem na semente durante a maturação e os demais tendem a migrar para outros tecidos da planta (TURNBULL et al., 2001). Esse fato pode ser um dos motivos para diminuição de diversidade de microrganismos endofíticos em sementes maduras em relação às que se são observadas em estádios iniciais de maturação (OKUNISHI et al., 2005). Esse fato associado ao tempo de armazenagem e/ou dormência das sementes pode ocasionar um decréscimo nas quantidades de endófitos, proporcional ao tempo de estocagem (MUNDT; HINKLE, 1976; BACON; HINTON, 1996; CANKAR et al., 2005). Essa diminuição resulta em menor diversidade e quantidade de microrganismos endofíticos em sementes maduras do que nos tecidos vegetativos das plantas de uma dada espécie, como por exemplo, em *Eucalyptus* (PROCÓPIO, 2004; FERREIRA et al., 2008).

As espécies normalmente isoladas e identificadas como endofíticas em sementes já foram descritas como endófitos em outros estudos, como é o caso dos gêneros *Bacillus* e *Methylobacterium* (HOLLAND, 1997; FREYERMUTH; LONG; MATHUR, 1996; RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007), sugerindo que isolados endofíticos possam colonizar o sistema reprodutor da planta hospedeira e serem transmitidos verticalmente via sementes. Majewska-Sawka e Nakashima (2004) estudaram a presença de microrganismos endofíticos em flores de *Lolium perenne* L.. Os autores observaram que as hifas de *Neotyphodium lolii* crescem sobre tecidos específicos das flores e sementes em desenvolvimento, sugerindo que a colonização da planta é um preciso, coordenado e ainda desconhecido mecanismo que define a parte da flor que pode ou não ser colonizada pelo endófito. A maioria dos estudos não traz informações e/ou discussões sobre a presença ou persistência desses microrganismos nas plantas durante e após o processo de germinação. No entanto, Ferreira et al. (2008) estudaram endófitos em sementes de *Eucalyptus* e a persistência desses nas plântulas após a germinação. Os autores observaram pelo menos seis gêneros bacterianos em sementes e plântulas, sendo que quatro foram observados nas sementes e nas plântulas, mostrando que podem ser transmitidos via semente. Já,

alguns endófitos, embora tenham sido observados em plântulas, não estavam presentes nas sementes, sugerindo que ou se encontravam em baixa quantidade nas mesmas, impossibilitando a detecção por isolamento, ou estavam em estado de latência (TURNBULL et al., 2001; FERREIRA et al., 2008).

Os microrganismos endofíticos de sementes podem ser importantes ferramentas na proteção contra o fungos patogênicos, já que algumas espécies de *Eucalyptus* podem atrair fitopatogenos durante a germinação das sementes (MENTEN; BUENO, 1987; BASKIN; BASKIN, 2001). Dessa forma, sementes com endófitos aptos a controlar patógenos poderiam ter mais sucesso no desenvolvimento em detrimento a sementes desprovidas dessa característica.

1.1.3 Cancro e murcha de *Eucalyptus*

O cancro e murcha tem sido estudo em *Eucalyptus*, e estudos mostram que o agente causal mais importante é *Ceratocystis fimbriata* Ellis e Halsted, o qual 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; REX; SCHREIBER, 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) cancos; 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).

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; MAFFIA; FERREIRA, 2005).

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 no campo podem ser causados também por *Botryosphaeria* e *Cytospora*, além das semelhanças na morfologia de colônias e estruturas reprodutivas utilizadas para caracterizações morfológicas (AUER; KRUGNER, 1994; MYBURG et al., 2004; BAKER; HARRINGTON, 2004; ALONSO et al., 2009; PEGG et al., 2010). *C. fimbriata* é considerado o principal patógeno causador de cancro e murcha de *Eucalyptus*, já *Botryosphaeria* e *Cytospora* são considerados patógenos secundários (OLD et al., 1986, 1990). Esses patógenos dito secundários normalmente vivem associados as

plantas de *Eucalyptus* sem causar sintomas de doença, porém atacam as plantas em situações de estresses biótico e/ou abióticos (AUER; KRUGNER, 1994; YUAN et al., 1997, YUAN; MOHAMMED, 1999). Em estudo realizado por Yuan et al. (1997) os autores observaram que *Cytospora eucalypticola* está entre fungos mais freqüentes em plantas de *Eucalyptus* apresentando sintomas de cancro.

Com a ocorrência de fungos causadores de sintomas semelhantes no campo aumentam as dificuldades de diagnósticos de agentes causais. Nesse contexto, podem ocorrer identificações imprecisas de patógenos causadores de um mesmo sintoma em plantas de *Eucalyptus*. Atualmente não estão sendo realizados estudos de interação *C. fimbriata* com outros fungos patogênicos, principalmente de ocorrência conjunta causando determinados sintomas no campo. Outros estudos importantes são os de interação desses patógenos de *Eucalyptus* com microrganismos benéficos associados às plantas. Esses estudos de ecologia microbiana e biologia molecular podem ser de grande importância na busca por inimigos naturais desses fungos (potenciais agentes de controle biológico) e também na busca por genes relacionados ao controle dos mesmos.

1.1.4 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; RADEMAKER; BRUIJN, 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 gene 16S DNAr depois de amplificado e seqüenciado, pode ser analisado em diferentes bases de dados, permitindo a identificação dos isolados.

Das metodologias baseadas no gene 16S DNAr 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; DEWAAL; UITLERLINDEN, 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 gene 16S DNAr (HEUER et al., 1997), quanto para estudar grupos bacterianos específicos como alfa e beta proteobacteria e actinomicetos (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001). Outra possibilidade é o uso do DGGE para estudos de genes específicos como, por exemplo, o gene *rpoB* (PEIXOTO et al., 2002) e também alguns genes funcionais como o gene *nifH* e *amoA* (ROSADO et al., 1998; CHU et al., 2007; INNEREBNER et al., 2006). 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; FRIEDRICH; CONRAD, 1999; YANG; CROWLEY, 2000), para estudar a comunidade microbiana associada a plantas (KUKLINSKY-SOBRAAL 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.

1.1.5 Transformação genética de fungos via *Agrobacterium tumefaciens*

Os sistemas de transformação genética têm sido empregados com diversos objetivos, mas principalmente para estudos da interação fungo-planta e interrupção gênica para estudo de diferentes genes, principalmente relacionados à patogenicidade (MULLINS; KANG, 2001). A metodologia de transformação genética mediada por *Agrobacterium* tem sido utilizada com grande sucesso para transformação de células vegetais (TZFIRA; CITOVSKEY, 2006; SHARMA et al., 2009; CHAUDHRY; RASHID, 2010), de leveduras (BUNDOCK et al., 1995; SOLTANI; VAN HEUSDEN; HOOYKAAS, 2009), fungos filamentosos (De GROOT et al., 1998; BAUMGARTNER et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2010; RODRIGUES, 2010; WANG et al., 2010) e humanas (KUNIK et al., 2001). Ao infectar as plantas, *Agrobacterium* têm a capacidade de causar uma doença denominada galha-da-coroa, caracterizada pela proliferação descontrolada das

células próximas à região do colo da planta, resultando na formação de um tumor (SAVKA et al., 1996; AGRIOS, 2004). Essa espécie bacteriana possui um plasmídeo de alto peso molecular (200Kb), denominado plasmídeo Ti (“tumor inducing”), o qual está associado a capacidade da infecção. O plasmídeo Ti contém vários genes responsáveis pela transferência do T-DNA (DNA de transferência) os quais estão localizados em uma região denominada “região *vir*”. A região *vir* tem cerca de 30kb e contém pelo menos 10 genes (*vir A* – *vir J*), cujos produtos são vitais para o processamento e transferência do T-DNA à planta (WEI et al., 2005). Adicionalmente, são fortemente induzidos pelo composto denominado acetoseringona (AS) (KADO, 1991). Uma das vantagens de se utilizar o método baseado em *Agrobacterium* para transformar fungos filamentosos está relacionada à eficiência de transformação. Alguns trabalhos compararam a eficiência de transformação obtida por esse método com aquela obtida por protoplasto PEG e/ou Biobalística, e demonstraram que o sistema *Agrobacterium* permite a obtenção de um maior número de transformantes (AMEY et al., 2002; CAMPOY et al., 2003; FITZGERALD et al., 2003; RODRÍGUEZ-TOVAR et al., 2005). É crescente o número de trabalhos que utilizam essa metodologia, sendo que vários fungos tais como Ascomicetos, Basidiomicetos, Zigomicetos e Glomeromicetos, além de Oomicetos já foram transformados (MICHIELSE et al., 2005; LACROIX et al., 2006; FÁVARO, 2009, RODRIGUES, 2010).

Uma das finalidades do uso da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido a inserção de genes repórteres responsáveis pela emissão de fluorescência. Atualmente existem diferentes tipos de proteínas emissoras de fluorescência (BRANDL; MANDRELL, 2002; FERREIRA et al., 2008). A *Green Fluorescent Protein* (gfp) é uma proteína que emite fluorescência verde e é uma das mais utilizadas atualmente em estudos de transformação genética de fungos (BAUMGARTNER et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2010; RODRIGUES, 2010; WANG, et al, 2010). Os fungos transformados com *gfp* via *Agrobacterium* são estudados quanto aos seus perfis de colonização e interação com a planta hospedeira com auxílio de Microscopia Óptica de Fluorescência (MOF) ou epifluorescência (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005; NADEAU et al., 2008; FÁVARO, 2009; PALLU, 2010;

RODRIGUES, 2010; ROMÃO, 2010). Nesses estudos a microscopia possibilita a visualização dos microrganismos nos tecidos internos do hospedeiro.

Esses estudos de colonização e interação com hospedeiro podem auxiliar também em estudos fitopatológicos BAUMGARTNER et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2010; RODRIGUES, 2010; WANG et al., 2010). Nesses casos, fungos agentes causais de doenças em plantas são transformados com objetivo de facilitar o entendimento dos mecanismos de ataque aos hospedeiros. Isso permite um monitoramento do desenvolvimento dessa interação durante os estágios de colonização do tecido hospedeiro, revelando detalhes da relação entre esses organismos (BAUMGARTNER et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2010; RODRIGUES, 2010; WANG et al., 2010). Pode, ainda, contribuir nos estudos de mutagênese insercional e caracterização de transformantes, auxiliando na descoberta de novos genes envolvidos na patogenicidade e com isso fornecer informações necessárias para um controle mais eficiente de doenças.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**, San Diego: Elsevier, 2004. 922 p.

ALONSO, R.; TISCORNIA, S.; ALFENAS, A.C.; BETTUCCI, L. Fungi associated to bark lesions of *Eucalyptus globulus* stems in plantations from Uruguay. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, p. 591-597, 2009.

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.

AMEY, R.C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P.R.; BAILEY, A.; FOSTER, G.D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 4-11, 2002.

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

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.; LAÇAVA, 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.

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.

AUER, C. G.; KRUGNER, T.L. Cancros de *Eucalyptus grandis* em três locais do estado de São Paulo. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 28/29, p. 3-10, jan./dez. 1994.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **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, 2000. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info>> Acesso em: 03 dez. 2010.

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.

BAUMGARTNER, K.; FUJIYOSHI, P.; FOSTER, G.D.; BAILEY, A.M. *Agrobacterium*-mediated transformation for investigation of somatic 1 recombination in the fungal pathogen *Armillaria mellea*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, 2010, In press.

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.

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.

BARNES, I.; NAKABONGE, G.; ROUX, J.; WINGFIELD, 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.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds**. San Diego: Apress, 2001. 520 p.

BENNETT, A.J.; WHIPPS, J.M. Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 83-89, 2007.

BRANDL, M. T.; MANDRELL, R. E. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the Cilantro phyllosphere **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3614-3621, 2002.

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.

BUNDOCK, P.; DENDULKRAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P.J.J. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 14, p. 3206-3214, 1995.

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. (Ed.). **Microorganisms in plant conservation & biodiversity**. Kluwer: Academic Publishers, 2002. p. 285-306.

CAMPOY, S.; PEREZ, F.; MARTIN, J.F.; GUTIERREZ, S.; LIRAS, P. Stable transformants of the azophilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 447-452, 2003.

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, p. 341-345, 2005.

CARROLL, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. Van den (Ed.). **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.

CHAUDHRY, Z.; RASHID, H. An improved *Agrobacterium* mediated transformation in tomato using hygromycin as a selective agent. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, p. 1882-1891, 2010.

CHU, H. Y.; FUJII, T.; MORIMOTO, S.; LIN, X.G.; YAGI, K.; HU, J. L.; ZHANG, J.B. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 485-491, 2007.

DE GROOT, M.J. de, BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.; BEIJERSBERGEN, A.G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, London, v. 16, p. 839-842, 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: VERLAG, P. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer, 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.

FÁVARO, L.C. DE L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2009. 291 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 287, p. 8-14, 2008.

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

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

FIGUEIREDO, J.G.; GOULIN, E.H.; TANAKA, F.; STRINGARI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.V.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A.; GLIENKE, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 80, p. 143–147, 2010.

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.

FITZGERALD, A.M.; MUDGE, A.M.; GLEAVE, A.P.; PLUMMER, K.M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 803-810, 2003.

FREYERMUTH, S.K.; LONG, R.L.G.; MATHUR, S. Metabolic aspects of plant interaction with commensal methylotrophs. In: LIDSTROM, M.E.; TABITA, F.R. (Ed.). **Microbial growth on C1 compounds**. Amsterdam: Klumer, 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.

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.

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.

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.

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.

INNEREBNER, G.; KNAPP, VASARA, B.; ROMANTSCHUK, T.M.; INSAM, H. Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost-treated soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1092-1100, 2006.

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, 2006.

KADO, C.I. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. **Critical Review in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 10, p. 1-32, 1991.

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.; 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.

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.

KUNIK, T.; TZAFIRA, T.; KAPULNIK, Y.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVISKY, V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Stanford, v. 98, p. 1871-1876, 2001.

LACAVA, P.T.; LI, W.B.; ARAÚJO, 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.

LACROIX, B.; TZAFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVISKY, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 22, p. 29-37, 2006.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, p. 298-300, 2000.

LICHTMAN, J.W.; CONCHELLO, J.A. Fluorescence microscopy. **Nature Methods**, New York, v. 2, p. 910-919, 2005.

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.

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**, Taipei, 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.

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.

MENTEN, J.O.M.; BUENO, J.T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: SOAVE, J.; SILVA, I.V. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Corgill, 1987.

MICHIELSE, C.; HOOYKAAS, P.; VAN DEN HONDEL, C.; RAM, A. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 1-17, 2005.

MULLINS, E.D.; KANG, F.N. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, p. 2043-2052, 2001.

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

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.

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.

MYBURG, H.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, B.D.; STIPES R.J.; WINGFIELD, M.J. Phylogenetic relationships of *Cryphonectria* and *Endothia* species, based on DNA sequence data and morphology. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 990-1001, 2004.

NADEAU, J.L.; PERREAULT, N.N.; NIEDERBERGER, T.D.; WHYTE, L.G.; SUN, H.J.; LEON, R. Fluorescence microscopy as a tool for *in situ* life detection. **Astrobiology**, New York, v. 8, p. 859-874, 2008.

OKUNISHI, S.; SAKO, K.; MANO, H.; IAMAMURA, A.; MORISAKI, H. Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). **Microbes and Environments**, Beijing, v. 20, p. 168-177, 2005.

OLD, K.M.; GIBBS, R.; CRAIG, I.; MYERS, B.J.; YUAN, Z.Q. Effect of drought and defoliation on the susceptibility of eucalypts to cankers caused by *Endothia gyrosa* and *Botryosphaeria ribis*. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 38, p. 571-581, 1990.

OLD, K.M.; MURRAY, D.I.L.; KILE, G.A.; SIMPSON, J.; MALAFANT, K.W.J. The pathology of fungi isolated from eucalypt cankers in south east Australia. **Australian Forest Research**, New Jersey, v. 16, p. 21-36, 1986.

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

PALLU, A.P.S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010. 129 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PEGG, G.S.; GRYZENHOUT, M.; O'DWYER, C.; DRENTH, A.; WINGFIELD, M.J. The Eucalyptus canker pathogen *Chrysosporium cubensis* discovered in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, London, v. 39, p. 343–349, 2010.

PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.D.; RUMJANEK, N.G.; MAGRAE, A.; ROSADO, A.S. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, p. 316-320, 2002.

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

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

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.

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

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.

RODRIGUES, M.B.C. **Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa***. 2010. 124 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RODRÍGUEZ-TOVAR, A.V.; RUIZ-MEDRAN, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUERO, B.E.; HIDALGO-LARA, M.E.; REYES-MÁRQUEZ, B.E.; CABRERA-PONCE, J.L.; VALDÉS, M.; XOCONOSTLE-CÁZARESA, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 63, p. 45-54, 2005.

ROMÃO, A.S. **Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* – planta hospedeira**. 2010. 268 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2770-2779, 1998.

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.

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**, Berlin, v. 30, p. 175-184, 1999.

RUDGERS, J.A.; CLAY, K. Endophyte symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems? **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 107-124, 2007.

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.

SHARMA, M.K.; SOLANKE, A.U.; JANI, D.; SINGH, Y.; SHARMA, A.K. A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 34, p. 423-433, 2009.

SAVKA, M.A.; BLACK, R.C.; BINNS, A.N.; FARRAND, S.K. Translocation and exudation of tumor metabolites in crown galled plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 9, p. 310-313, 1996.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

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.

SOLTANI, J.; VAN HEUSDEN, G.P.H.; HOOYKAAS, P.J.J. Deletion of host histone acetyltransferases and deacetylases strongly affects *Agrobacterium*-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 298, p. 228–233, 2009.

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.

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.

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.

TURNBULL, G.A.; MORGAN, J.A.W.; WHIPPS, J.M.; SAUNDERS, J.R. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and the attachment and colonization of wheat roots. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 36, p. 21-31, 2001.

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

TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 17, p. 147-154, 2006.

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.

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.

WANG, Y.; GUISTINI, S.D.; WANG, T.T.; BOHLMANN, J.; BREUI, C. *Agrobacterium*-mediated gene disruption using split-marker in *Grosmannia clavigera*, a mountain pine beetle associated pathogen. **Current Genetics**, Heidelberg, v. 56, p. 297-307, 2010.

WEI, X.; ZHU, C.; ZHU, B. An efficient and stable method for the transformation of heterogeneous genes into *Cephalosporium acremonium* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 15, p. 683-688, 2005.

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.

YUAN, Z.Q.; OLD, K.M.; MIDGLEY, S.J.; SOLOMON, D. Mycoflora and pathogenicity of fungi present on stored seeds from provenances of *Eucalyptus pellita*. **Australasian Plant Pathology**, London, v. 26, p. 195-202, 1997.

YUAN, Z.Q.; MOHAMMED, C. Pathogenicity of fungi associated with stem cankers of eucalypts in Tasmania, Australia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 1063-1069, 1999.

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

2 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM SEMENTES DE *Eucalyptus* spp.

Resumo

Nas últimas décadas a análise da diversidade de microrganismos endofíticos tem sido realizada em diversas espécies vegetais, principalmente visando o conhecimento da diversidade e do potencial biotecnológico desta comunidade. Nesta interação, tanto a planta hospedeira como os endófitos podem se beneficiar por meio de trocas de nutrientes e proteção. Porém, são poucas as informações sobre a diversidade bacteriana associada às sementes, e de que forma a germinação afeta esta comunidade endofítica. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar as bactérias endofíticas em sementes de *Eucalyptus* e avaliar os efeitos da germinação na colonização e na diversidade bacteriana. Para isso, a comunidade bacteriana endofítica de sementes de *Eucalyptus citriodora*, *E. urophylla* e o híbrido *E. globulus* x *E. grandis* foi estudada por isolamento e por DGGE. Adicionalmente, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) de sementes em diferentes tempos de germinação. Os resultados mostraram que a densidade bacteriana endofítica não difere entre as espécies de *Eucalyptus* avaliadas e que esta comunidade cultivada é composta por bactérias pertencentes às classes *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Foi observado que *Bacillus megaterium* e *Williamsia* sp. são as espécies bacterianas mais freqüentes na comunidade bacteriana cultivada e estavam presentes somente em sementes de *E. citriodora* e *E. globulus* x *E. grandis*. Foram observadas também bactérias que não puderam ser identificadas pelos métodos empregados, sugerindo que pertencem a grupos ainda não caracterizados e justificando a necessidade de mais estudos de diversidade bacteriana em sementes. Os resultados de análise da germinação mostraram que a quantidade de bactérias endofíticas nas sementes aumenta proporcionalmente ao tempo de germinação. Adicionalmente, com as análises por MEV foi possível verificar a colonização de sementes durante a germinação. As análises por MET possibilitaram visualizar as paredes celulares e membranas sem presença de poros durante a germinação. As análises de DGGE mostraram que o tempo de germinação interfere na quantidade de espécies detectadas, sugerindo que a germinação pode ativar os microrganismos que colonizam a semente. Os resultados obtidos neste trabalho, sugerem que a comunidade bacteriana das sementes responde à germinação da semente se multiplicando nos tecidos vegetais, fato este que poderia estar associado à proteção das plântulas no ambiente.

Palavras-chave: Interação planta-microrganismo; Microscopia; Germinação

Abstract

In the last few years the analysis of endophytic microbial diversity has been performed in many plant species, mainly aimed at understanding the diversity and biotechnological potential of this community. In this interaction, both the host plant and endophytes may benefit through the exchange of nutrients and protection. However, there is little information about the bacterial diversity associated to the seeds, and how the germination affects the endophytic community. Thus, in the present work, we evaluated the endophytic bacterial community inside *Eucalyptus* seeds and the effects

of germination on this diversity. For this, the endophytic bacterial community of *Eucalyptus citriodora*, *E. urophylla* and the hybrid *E. globulus* x *E. grandis* was studied by isolation and DGGE techniques. Additionally, analysis was performed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) at different times of seed germination. The results showed that the endophytic bacterial density was stable among *Eucalyptus* species, being this bacterial community composed by Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes. Also, *Bacillus megaterium* and *Williams* sp. were the most frequent bacteria in seeds of *E. citriodora* and *E. globulus* X *E. grandis*. The density of bacterial community increased during germination time, which was confirmed by SEM analysis. The analysis by TEM allowed visualizes the cell walls and membranes without pores during germination. The DGGE analysis showed that the germination time interferes with the amount of species detected, suggesting that germination can activate the microorganisms that colonize the seed. The present results suggest that the bacterial community is activate by seed germination allowing the settling inside the seedlings, suggesting that these bacteria could be associated to plants protection during environmental establishment.

Keywords: Plant-microbe interactions; Microscopy; Germination

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. Algumas espécies são utilizadas em áreas de reflorestamento para produção de madeira. Neste aspecto, estas 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 4 milhões de hectares cultivados, os quais representam aproximadamente 60% da área plantada com florestas exóticas no país (SBS, 2008). Neste contexto, trabalhos recentes têm demonstrado a presença de inúmeras espécies microbianas em associação com estas plantas, onde podem atuar como patógenos ou mutualistas (FERREIRA et al., 2008; PEEG et al., 2010; SHEN et al., 2008).

Dentre os microrganismos observados em associação com *Eucalyptus* podem ser citados os endófitos, os quais são 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). Esses microrganismos 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; FERREIRA et al., 2008) e, ocasionalmente, pode ocorrer colonização intracelular (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996; MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004). Algumas características benéficas podem ser conferidas à planta hospedeira durante a interação com os microrganismos. Dentre essas, destacam-se a maior resistência em ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos ou abióticos como temperatura, umidade, luz, contaminantes (SAIKKONEN et al., 1998; CLAY; SCHARDL, 2002; DERAM et al., 2008). Também, em alguns casos a interação possibilita resistência contra patógenos (HALLMANN et al., 1997; RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007), aumento do crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; TSAVKELOVA et al., 2007) e estímulo e indução de germinação das sementes (HOLLAND, 1997; FREYERMUTH; LONG; MATHUR, 1996).

Diferentes microorganismos têm sido isolados de sementes após desinfestação superficial, inclusive endófitos e patógenos (GRANÉR et al., 2003; RUDGERS; KOSLOW; CLAY, 2004; MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004; JORDAAN; TAYLOR; ROSSENKHAN, 2006; RUDGERS; CLAY, 2007; FERREIRA et al., 2008), 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; FERREIRA et al., 2008). O uso de sementes, juntamente com técnicas de micropropagação, são as principais estratégias utilizadas para o plantio de *Eucalyptus*. Em algumas espécies vegetais o plantio de sementes pode permitir a transferência vertical de microrganismos endofíticos (MAJEWSKA-SAWKA; NAKASHIMA, 2004; GAO; MENDGEN, 2006). Recentemente, a transferência vertical de endófitos via semente foi demonstrada em *Eucalyptus*, onde as bactérias presentes em sementes colonizam as plântulas após a germinação (FERREIRA et al., 2008). Esses autores observaram que bactérias endofíticas podem ser transmitidas verticalmente e que alguns endófitos podem permanecer em latência nas sementes, sendo observados em baixa densidade.

Nos estudos de endófitos em baixa densidade o uso de diferentes estratégias de detecção permite melhor avaliação das comunidades microbianas. O isolamento em meios de cultivo está entre as principais técnicas utilizadas para avaliar a comunidade endofítica de plantas, mas não permite a análise global das comunidades. Com intuito de reduzir esse problema as análises do 16S rDNA tem sido amplamente utilizadas, principalmente para o estudo de microrganismos no ambiente (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJN, 1999; ANDREOTE et al., 2006; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2005; LAMBAIS et al., 2006; DINI-ANDREOTE et al., 2010). Dentre as metodologias baseadas no 16S rDNA para o estudo de populações microbianas pode ser citado o DGGE (Gradiente Desnaturante em Gel de Eletroforese) (MUYZER; DEWAAL; UTTERLINDEN, 1993; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005; DINI-ANDREOTE et al., 2010).

No presente trabalho foram utilizadas análises dependentes de cultivo bacteriano, como isolamento seguido de seqüenciamento, e análises independentes de cultivo, realizadas por meio de DGGE e microscopia. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram: *i*) estudar as bactérias endofíticas, cultivadas e não cultivadas, em sementes de *Eucalyptus*; *ii*) estudar os efeitos do processo de germinação nos perfis de colonização dessas sementes e possíveis efeitos na diversidade de bactérias. Esta combinação de métodos de detecção e estudo permitiu entender a dinâmica da comunidade bacteriana associada às sementes de *Eucalyptus*, bem como as interações durante a germinação.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material vegetal de *Eucalyptus*

Nesse trabalho foram utilizadas sementes de *Eucalyptus citriodora*, *E. urophylla* e do híbrido *E. globulus* x *E. grandis* da Cia. Suzano Papel e Celulose (Itapetininga, SP, Brazil), nas quais em trabalho anterior foi observado uma alta densidade bacteriana em seu interior (FERREIRA et al., 2008).

2.2.2 Isolamento de bactérias endofíticas das sementes

Para isolamento das bactérias endofíticas, as sementes foram desinfestadas superficialmente por meio de 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 as sementes foram trituradas em tampão fosfato (PBS, contendo $[g\ L^{-1}]$ 1,44 Na_2HPO_4 ; 0,24 KH_2PO_4 ; 0,20 KCl; 8,00 NaCl; pH 7,4) esterilizado e incubadas sob agitação (150 r.p.m.) por uma 1 h. Posteriormente, diluições (10^{-1} e 10^{-2}) foram semeadas sobre meio de cultura TSA 10% (Tryptona Soja Agar – Merk, pH 7,3) suplementado com $50\ \mu g\ mL^{-1}$ do fungicida benomyl para evitar o crescimento de fungos. As culturas foram incubadas a $28^\circ C$ por 20 dias e o número de UFCs (Unidade Formadora de Colônia) foi quantificado para estimar as respectivas densidades populacionais. A eficiência do processo de desinfestação superficial foi testada por meio da semeadura da água utilizada na última lavagem sobre meio TSA 10% e incubadas a $28^\circ C$ por até 20 dias. Após a quantificação e purificação os isolados bacterianos foram armazenados em solução de glicerol 20% a $-70^\circ C$.

2.2.3 Procedimentos de germinação e coleta de sementes

As sementes foram mantidas em câmara úmida e avaliadas em diferentes tempos (0, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 horas), os quais foram determinados previamente.

2.2.4 Identificação molecular das bactérias endofíticas

A amplificação do 16S rDNA foi realizada por PCR direto de colônias bacterianas sem extração de DNA. Para isso, as bactérias 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 μ L contendo 1 μ L da suspensão bacteriana, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 3,75 mM de $MgCl_2$, 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 todas as reações de amplificação. A PCR foi realizada em 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. e uma extensão final de 72°C por 7 min. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) e posteriormente corado com brometo de etídio e o fragmento de tamanho esperado (1400 pb) observado sobre luz ultravioleta. Para identificação, os produtos de PCR gerados pelos iniciadores P027F e 1387R foram purificados com polietilenoglicol (polietilenoglicol 8000 20%; NaCl 2,5 mM) e parcialmente seqüenciados (Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo) utilizando o iniciador 1387R. As seqüências obtidas foram comparadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) contra a base de dados do GenBank. Após a comparação com a base de dados as seqüências foram utilizadas para alinhamento e análise filogenética no programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007).

2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As sementes foram fixadas em solução Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5%; em tampão cacodilato de sódio 0,05M - pH 7,2; e cloreto de cálcio 0,001M - 24 horas), pós fixadas com tetróxido de ósmio 1% (tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0,05M - 90 min), e desidratadas em acetona (30, 50, 70, 90 e 100% - 30 min cada). Após a desidratação, as amostras foram secadas em ponto crítico (CPD 050 - Balzers), metalizadas com ouro (MED 010 – Balzers) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DMS 940A).

2.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Foram coletadas e utilizadas sementes com tempo zero até 8 horas de germinação. O protocolo para preparo das amostras de sementes para MET foi adaptado a partir do protocolo padrão utilizado no laboratório NAP/MEPA (Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura). As sementes foram fixadas em solução Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5%; em tampão cacodilato de sódio 0,05M - pH 7,2; e cloreto de cálcio 0,001M - 24 horas), pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0,05M - 90 min). Após a pós-fixação com ósmio as sementes foram submetidas a um contraste em solução de acetato de uranila 0,5% (12h), posteriormente desidratadas em acetona (30, 50, 70, 90 e 100% - 30 min cada) e infiltradas em concentrações crescentes de resina epóxi spurr's/acetona (30; 50; 70; e 100% - 24h cada) (SPURR, 1969).

Os espécimes em resina spurr's pura foram colocados em moldes de silicone e submetidos à polimerização a 65°C por 48 horas para obtenção de blocos. Os cortes ultrafinos foram realizados em micrótomo (Leica Ultracut UC2) equipado com uma lâmina de vidro. Os cortes ultrafinos foram coletados em telas de cobre de (100 mesh), contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo Reynold e analisado em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900).

2.2.7 Extração de DNA total de sementes

Antes da extração de DNA as sementes foram submetidas a germinação. O DNA presente nas amostras de sementes foi extraído a partir das mesmas suspensões bacterianas obtidas quando do processamento das amostras para isolamento da comunidade bacteriana. Dessa forma, 0,5 mL de cada suspensão bacteriana foram utilizados 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.

2.2.8 Análise por DGGE (Gradiente Desnaturante em Gel de Eletroforese)

Foram avaliadas sementes do híbrido *E. globulus* x *E. grandis* coletadas em 3 tempos de germinação com 3 repetições. Inicialmente foi realizada uma PCR específica para o gene 16S rRNA de bactérias com os iniciadores 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCCKG-3') (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3'), os quais são seletivos para evitar a amplificação de DNA de cloroplastos. 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 com 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. 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 por 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 Nitrato de Prata e fotodocumentado sobre luz branca.

Para análise dos dados gerados foi feita a normalização das imagens e seleção das bandas foram realizadas pelo programa *GelCompar II* e posteriormente avaliada manualmente. As bandas provenientes de dímeros de *primers* foram removidas das análises. Uma tabela contendo a posição das bandas foi exportada para contagem manual de bandas.

2.2.9 Análise estatística

A normalidade dos dados foi aferida pelo teste de Shapiro wilk e a análise de variância ($P < 0.05$) foram realizadas com o programa Software R (versão 2.7.1). O teste de Tukey foi usado para comparação de médias. Análises de regressão linear foram realizadas no software Sigma Plot (versão 11.0).

2.3 Resultados

2.3.1 Isolamento e caracterização molecular de bactérias endofíticas de sementes

Foi avaliada a densidade bacteriana endofítica em sementes de *Eucalyptus citriodora*, *E. urophylla* e do híbrido *E. globulus* x *E. grandis*. A análise de variância (ANOVA) mostrou que não há diferença significativa ($F = 4,357$ e $p = 0,098$) entre as diferentes espécies avaliadas (Tabela 2.1). Não foram observadas colônias bacterianas nas placas controle da desinfestação superficial.

Tabela 2.1 - Quantidade média de bactérias endofíticas $\pm$ erro padrão da média em sementes de *Eucalyptus*

Espécies de <i>Eucalyptus</i>*	Média de Bactérias Endofíticas (10^2 UFC.g⁻¹ de semente)**
<i>E. citriodora</i>	0,55 ^{ns} $\pm$ 0,33
<i>E. urophylla</i>	0,61 $\pm$ 0,52
<i>E. globulus</i> x <i>E. grandis</i>	1,33 $\pm$ 0,66

^{ns}Médias não diferem entre si pelo teste F a 5% de significância. *Amostras de 0,1 g de sementes de *Eucalyptus*. **Médias obtidas de três isolamentos com 9 repetições cada

Foi possível verificar que a comunidade bacteriana cultivada associada às sementes de *Eucalyptus citriodora*, *E. globulus* x *E. grandis* e *E. urophylla* é constituída por *Bacillus flexus*, *B. megaterium*, *B. simplex*, *B. subtilis*, *Brevibacillus agri*, *Delftia acidovorans*, *Gordonia* sp., *Kocuria rhizophila*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Massilia* sp., *Micromonospora* sp., *Phycococcus ochangensis*, *Rhizobium* sp., *Williamsia* sp. e *W. marianensis* (Tabela 2.2). Adicionalmente, foram observadas bactérias classificadas como não cultivadas e pertencentes às classes *Actinobacteria*, *Alfaproteobacteria* e *Firmicutes* (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Identificação de bactérias endofíticas isoladas de sementes de *Eucalyptus citriodora*, *E. urophylla* e do híbrido *E. globulos* x *E. grandis*. 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*)

<i>Eucalyptus</i>	Isolado	Classe	Espécie (Blast-NCBI)	%*	Linhagem de referência
<i>E. citriodora</i>	cit 1	Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	HQ166114.1
<i>E. citriodora</i>	cit 2	Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	HQ166114.1
<i>E. citriodora</i>	cit 3	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ149694.1
<i>E. citriodora</i>	cit 4	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ149694.1
<i>E. citriodora</i>	cit 5	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ222833.1
<i>E. citriodora</i>	cit 6	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ149694.1
<i>E. citriodora</i>	cit 7	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ222833.1
<i>E. citriodora</i>	cit 8	Firmicutes	<i>Bacillus simplex</i>	100%	HQ009883.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 1	Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	HQ166114.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 2	Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	HQ166114.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 3	Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	HQ162492.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 4	Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	HQ166114.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 5	Firmicutes	<i>Bacillus flexus</i>	100%	HQ166108.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 6	Firmicutes	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100%	GU125639.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 7	Firmicutes	N.I.**	100%	HM172651.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 8	Firmicutes	N.I.	98%	GQ041622.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 9	Actinobacteria	<i>Micromonospora</i> sp.	100%	FN297811.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 10	Actinobacteria	<i>Micromonospora</i> sp.	99%	FN297789.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 11	Actinobacteria	<i>Phycococcus ochangensis</i>	98%	GQ344407.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 12	Actinobacteria	<i>Phycococcus ochangensis</i>	98%	GQ344407.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 13	Actinobacteria	<i>Gordonia</i> sp.	99%	GU991528.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 14	Actinobacteria	<i>Gordonia</i> sp.	99%	FJ851360.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 15	Actinobacteria	<i>Gordonia</i> sp.	99%	GU991528.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 16	Actinobacteria	<i>Gordonia</i> sp.	100%	GU991528.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 17	Actinobacteria	<i>Williamsia</i> sp.	99%	EU073114.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 18	Actinobacteria	<i>Williamsia marianensis</i>	100%	AY894336.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 19	Actinobacteria	<i>Williamsia</i> sp.	99%	EU073114.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 20	Actinobacteria	<i>Williamsia</i> sp.	99%	EU073114.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 21	Actinobacteria	<i>Williamsia</i> sp.	99%	EU073114.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 22	Actinobacteria	<i>Williamsia</i> sp.	99%	EU073114.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 23	Actinobacteria	N.I.	99%	HM813169.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 24	Actinobacteria	N.I.	99%	HM813169.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 25	Alfaproteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp.	98%	HQ231958.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 26	Alfaproteobacteria	N.I.	97%	DQ129610.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 27	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i> sp.	99%	EU626407.1
<i>E. globulos</i> x <i>grandis</i>	gxg 28	Betaproteobacteria	<i>Delftia acidovorans</i>	100%	HQ113205.1
<i>E. urophylla</i>	ur 1	Actinobacteria	<i>Kocuria rhizophila</i>	100%	HM854258.1
<i>E. urophylla</i>	ur 2	Actinobacteria	<i>Kocuria rhizophila</i>	99%	HM854258.1
<i>E. urophylla</i>	ur 3	Actinobacteria	<i>Kocuria rhizophila</i>	100%	HM854258.1
<i>E. urophylla</i>	ur 4	Firmicutes	<i>Brevibacillus agri</i>	99%	HQ166189.1

* Similaridade com a linhagem de referência

** Não identificada

As seqüências parciais do 16S rRNA apresentadas na tabela 2.2 foram utilizadas para construção de uma árvore filogenética (Figura 2.1). A árvore formou pelo menos 3 grupos distintos, os quais são compostos por isolados bacterianos pertencentes a *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Baseado nessa filogenia o grupo formado por *Firmicutes* consiste de isolados obtidos de sementes das três espécies de *Eucalyptus* estudadas. O grupo formado por *Actinobacteria* consiste de isolados provenientes de sementes de *Eucalyptus urophylla* e do híbrido *E. globulus* x *E. grandis*. Já, o grupo formado por *Proteobacteria* consistiu somente de isolados bacterianos obtidos do híbrido *E. globulus* x *E. grandis* (Figura 2.1).

Sementes do híbrido *E. globulus* x *E. grandis* foram escolhidas para os estudos posteriores da interação de bactérias endofíticas e sementes de *Eucalyptus*. A densidade bacteriana no interior de sementes do híbrido *E. globulus* x *E. grandis* aumentou proporcionalmente ao tempo de germinação variando de 0,0 a $2,25 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ nos tempos 0 hora e 128 horas, respectivamente (Figura 2.2). Dessa forma, os tempos de germinação zero, 64 e 128 horas foram selecionados para uso nos estudos de diversidade realizados utilizando DGGE e biblioteca de 16S rDNA.

Figura 2.1 - Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining com seqüências do gene 16S rRNA obtidas utilizando o iniciador 1387R. As seqüências foram obtidas de bactérias isoladas de sementes de *Eucalyptus citriodora* (cit), *E. urophylla* (ur) e o híbrido *E. globulus* x *E. grandis* (gxx). Os valores de *bootstrap* superiores a 50 são mostrados nos internódios (n= 1000 replicatas). As barras indicam a divergência das seqüências

Figura 2.2 - Número médio de bactérias (UFC) obtidas da espécie *E. globulus* x *E. grandis* em diferentes tempos de germinação. Regressão linear mostrando aumento no número de UFC em relação ao tempo de germinação em água. Médias obtidas a partir de 6 repetições em cada tempo de germinação

2.3.2 Análise por MEV

A análise das sementes por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada nos mesmos tempos de germinação utilizada para a análise da diversidade bacteriana do híbrido *E. globulus* x *E. grandis*. Foi observado que a superfície externa da semente (tegumento) não apresentou células bacterianas (Figuras 2.3A e 2.3B). Após a germinação e emergência da raiz, o tegumento foi removido para possibilitar as análises da superfície interna (Figuras 2.3C e 2.3D), permitindo visualizar os cotilédones, uma parte maior da raiz (Figuras 2.3E e 2.3F), bem como colônias bacterianas, com células na forma de cocos (Figura 2.4). Os espaços entre a raiz e os

Figura 2.3 - Fotos de microscopia de varredura (MEV) obtidas de sementes de *Eucalyptus*. A e B - Fotos mostrando a parte externa das sementes de *Eucalyptus* (tegumento) sem a presença de bactérias. C e D - Fotos mostrando a parte externa das sementes de *Eucalyptus* com o tegumento rompido após a germinação; setas indicam o tegumento; (*) raiz emergindo. E e F - Fotos mostrando sementes de *Eucalyptus* sem a presença do tegumento (removido mecanicamente); (c) cotilédones; (*) raiz

Figura 2.4 - Fotos de microscopia de varredura (MEV) obtidas de sementes de *Eucalyptus*. A - Foto mostrando sementes de *Eucalyptus* sem a presença do tegumento (removido mecanicamente); (c) cotilédones; (*) raiz. B e C - Fotos mostrando células bacterianas cocóides (setas) colonizando a superfície do cotilédone e da raiz de *Eucalyptus*; (*) raiz; (c) cotilédone. a parte externa das sementes de *Eucalyptus* (tegumento) sem a presença de bactérias. D, E e F - Fotos mostrando detalhes de células bacterianas cocóides (setas) colonizando a superfície raiz de *Eucalyptus*; (*) raiz

cotilédones também apresentaram grande quantidade de células formando um biofilme bacteriano (Figuras 2.5A e 2.5B). Adicionalmente, foi possível observar muitas células em processos de divisão e multiplicação celular (Figuras 2.5C e 2.5D).

Figura 2.5 - Fotos de microscopia de varredura (MEV) obtidas de sementes de *Eucalyptus*. A e B - Fotos mostrando células bacterianas cocóides (setas) colonizando o espaço entre o cotilédone e a raiz (ec), superfície do cotilédone e da raiz de *Eucalyptus*. C e D - Fotos mostrando células bacterianas cocóides (setas) dividindo-se e colonizando a superfície da raiz de *Eucalyptus*; (ec) espaço superfície do cotilédone e da raiz; (*) raiz

2.3.3 Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Sementes do híbrido *E. globulus* x *E. grandis* foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) após diferentes tempos de germinação (0 a 8 horas). Foram selecionados tempos mais curtos quando comparados com os utilizados na análise por MEV, pois o objetivo principal desta análise foi avaliar a existência de alterações na estrutura das paredes, membranas e espaços intercelulares durante a germinação das sementes. Nas sementes ainda desidratadas as paredes celulares estavam aparentemente intactas e sem rupturas ou poros aparentes (Figura 2.6). Além disso, não foi possível observar a presença de lamela média nas células vegetais dessas sementes (Figuras 2.6 e 2.7), mas muitas vesículas circulares foram observadas, as quais devem conter substâncias de reserva a serem utilizadas durante a germinação (Figuras 2.6A, 2.6B e 2.6D). Os espaços intercelulares foram de 1 a 2 μM , sendo maiores na região da junção entre mais de duas células vegetais (Figuras 2.6C, 2.6E e 2.6F). Foi observado que as membranas celulares estavam aparentemente intactas sem sinais aparentes de desorganização estrutural (Figuras 2.7A, 2.7B e 2.7C), permanecendo assim até 8 horas após o início da germinação (Figura 2.8A, 2.8B e 2.8C).

Após 8 horas de germinação foi observada a presença da lamela média, a qual não havia sido visualizada em sementes desidratadas (Figura 2.8A, 2.8B e 2.8C). Além disso, ocorreu um sensível aumento dos espaços intercelulares, bem como de conteúdo extracelular quando comparados com tecidos desidratados (Figuras 2.8D, 2.8E e 2.8F). Nos estudos por MET não foi possível observar a presença de células bacterianas presentes nas amostras avaliadas, provavelmente devido à baixa densidade bacteriana no início da germinação das sementes.

Figura 2.6 - Eletromicrografias de transmissão (MET) de cortes obtidos de sementes de *Eucalyptus*. A, B e D - Fotos mostrando a organização celular em tecidos de sementes sem contato com água; setas indicando vesículas de reserva; (a) espaço intercelular; (p) parede celular; (*) citoplasma. C, E e F - Fotos mostrando o detalhe dos espaços entre células sem a presença de bactérias; (a) espaço intercelular; (p) parede celular; (*) citoplasma

Figura 2.7 - Eletromicrografias de transmissão (MET) de cortes obtidos de sementes de *Eucalyptus*. A, B e C - Fotos mostrando a organização celular em tecidos de sementes sem contato com água; setas indicando a membrana plasmática intacta em sua organização; (a) espaço intercelular; (p) parede celular; (*) citoplasma

Figura 2.8 - Eletromicrografias de transmissão (MET) de cortes obtidos de sementes de *Eucalyptus*. A, B e C - Fotos mostrando a organização celular em tecidos de sementes após 8 horas de contato com água (germinação); setas indicando a lamela média; (a) espaço intercelular; (p) parede celular; (*) citoplasma. D, E e F - Fotos mostrando a organização celular em tecidos de sementes após 8 horas de contato com água (germinação); setas indicando a membrana plasmática; (a) espaço intercelular; (p) parede celular; (*) citoplasma

2.3.4 Análise por DGGE

Os tempos de germinação zero, 64 e 128 horas foram utilizados nos estudos utilizando DGGE. A análise dos perfis de DGGE (Figura 2.9) analisados a partir de uma matriz de presença e ausência de bandas mostrou que o número de bandas geradas com uso de *primers* universais foi diferente entre os tratamentos, tendo aumentado gradualmente de acordo com o tempo de germinação. Nos tratamentos 0, 64 e 128 horas foram observadas em média 8, 10 e 11 bandas, respectivamente.

Figura 2.9 - Gel de DGGE obtido com uso de *primers* universais para o 16S rDNA a partir de três amostras da comunidade de bactérias endofíticas de sementes de *Eucalyptus*. Corado com Nitrato de Prata e fotodocumentado sobre luz branca. (M) – Marcador; (i, ii e iii) – Tratamentos. (i) zero hora de germinação; (ii) 64 horas de germinação; e (iii) 128 horas de germinação

2.4 Discussão

A presença de microrganismos em sementes e flores tem sido amplamente estudada em diversas espécies de plantas hospedeiras, inclusive *Eucalyptus* (GRANÉR et al., 2003; OKUNISHI et al., 2005 ; RUDGERS; CLAY, 2007; FERREIRA et al., 2008). No entanto o foco destes estudos está direcionado especialmente para diversidade microbiana presente nas sementes e muito pouco para a funcionalidade e interação desses microrganismos com a semente, principalmente, durante o processo germinativo.

A presença de bactérias em sementes de *Eucalyptus* foi relatada primeiramente em estudos realizados por Ferreira et al. (2008). Esses autores também observaram a transferência vertical das bactérias presentes nas sementes para as plântulas após a germinação e crescimento das mesmas. No presente trabalho, parte dos materiais vegetais utilizados por Ferreira et al. (2008), foram reavaliados quanto a presença de bactérias endofíticas após dois anos de armazenamento. As comparações de resultados permitiram observar uma redução na densidade bacteriana nas sementes após armazenagem. De forma semelhante, estudos realizados com sementes de outras espécies também têm mostrado um decréscimo na densidade de microrganismos proporcional ao tempo de estocagem das mesmas (MUNDT; HINKLE, 1976; BACON; HINTON, 1996; CANKAR et al., 2005). Fato importante é que a porcentagem de redução nas quantidades de bactérias ocorreu de forma espécie específica, ou seja, as reduções proporcionais variaram de 20% a 60% de uma espécie para outra após os dois anos.

Em geral o perfil de colonização das plantas por endófitos é determinado por tipo de tecido colonizado, estágio de desenvolvimento da planta, entre outros, sendo composto por maior concentração bacteriana ocorrendo no rizoplane seguido de raízes e caules (FISHER; PETRINA; SCOOT, 1992; ELVIRA-RECUENCO; Van VUURDE, 2000; MENDES et al., 2007). Nesse contexto, no presente trabalho também foi observado que durante o processo germinativo os diferentes estádios fenológicos da semente estão diretamente correlacionados com o aumento no número de células bacterianas. Adicionalmente, o número de espécies bacterianas detectadas por DGGE também aumentou ao longo do processo germinativo, possibilitando inferir que algumas

espécies de bactérias, embora presentes no início da germinação, estão em pequeno número impossibilitando a detecção. Assim, durante o processo germinativo essas células bacterianas se multiplicam, aumentando em número, até atingirem um nível mínimo de detecção pela técnica de DGGE.

Essas observações podem ser justificadas se for considerado que na fase final da maturação das sementes os endófitos tendem a entrar em latência ou produzirem estruturas de reprodução como endósporos (TURNBULL et al., 2001). Esse fato permite inferir que a germinação pode estar diretamente relacionada com a reativação metabólica dessas bactérias, as quais necessitariam de sinalização para iniciar a colonização da plântula. Assim, no início da germinação muitas dessas bactérias receberiam estímulos químicos para retomar suas atividades metabólicas. A água pode ser uma das formas de indução química para o endófito, porém a indução pode ser muito mais completa e complexa (MARCOS FILHO, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006). No início da germinação, quando inicia a turgescência da semente, ocorre carregamento de nutrientes e outros componentes químicos das células; esses componentes químicos são levados para diferentes compartimentos na semente, como apoplasto (local onde geralmente os endófitos ficam alocados), ou até chegam ao solo (CROCKER; BARTON, 1957; BASKIN; BASKIN, 2001; KERBAUY, 2004; MARCOS FILHO, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006). Dessa forma, esses componentes químicos, em sua maioria fontes de energia, podem ser os principais sinalizadores químicos para os endófitos retomarem seu metabolismo.

As análises por microscopia de transmissão possibilitaram uma avaliação mais criteriosa a respeito das estruturas de membranas e parede celular nas sementes durante a germinação. Pois, como proposto por autores como Baskin e Baskin (2001) e Taiz e Zeiger (2006) as membranas poderiam estar desorganizadas em sementes desidratadas e possibilitar saída de nutrientes para o meio no início da germinação. No presente estudo foram observadas pequenas alterações nas membranas, porém sem a presença de poros que pudessem ser diretamente correlacionados com liberação de conteúdo celular para o apoplasto. Nas análises realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram observadas bactérias de diferentes tipos morfológicos como, por exemplo, cocos. Nos estádios finais da germinação muitas dessas células

bacterianas estavam em processo de divisão celular, possivelmente pela disponibilidade de nutrientes provenientes da interação com a semente durante a germinação.

Foi observado que a diversidade bacteriana cultivada de *Eucalyptus citriodora*, *E. globulus* x *grandis* e *E. urophylla* (endofítica de semente) é composta por *Bacillus megaterium*, *B. flexus*, *B. simplex*, *B. subtilis*, *Brevibacillus agri*, *Delftia acidovorans*, *Gordonia* sp., *Kocuria rhizophila*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Massilia* sp., *Micromonospora* sp., *Phycococcus ochangensis*, *Rhizobium* sp., *Williamsia marianensis*, *Williamsia* sp.. Dentre estas pode ser observada a presença de espécies bacterianas amplamente descritas como importantes para proteção de plantas. *B. megaterium* e *B. subtilis*, por exemplo, são responsáveis pela produção de diferentes compostos antagônicos a fitopatógenos e tem sido utilizado no controle biológico de *Rhizoctonia solani*, *Pythium irregulare*, *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium* sp., *Ralstonia solanacearum* (KIM; COOK; WELLER, 1997; SCHISLER et al., 2004; JI et al., 2008; NIHORIMBERE, et al., 2010). Inclusive, alguns produtos a base de *Bacillus* tem sido comercializados para uso no controle biológicos em lavouras, como é o caso do *Serenade* (AgraQuest - Davis, USA), *Kodiak* (Gustafson - Texas, USA) e *BioYield* (Gustafson – Texas, USA) (SCHISLER et al., 2004). *Micromonospora* sp. também foi observada como endofítica em sementes de *Eucalyptus* e é descrita como produtora de compostos antagônicos contra patógenos (LOQMAN et al., 2009). Adicionalmente à proteção de plantas, algumas espécies observadas apresentam relatos de produção de hormônios de crescimento vegetal como é o caso de *Bacillus* (TSAVKELOVA et al., 2007) e *Rhizobium* (FRAVEL, 2005). Além disso, *Rhizobium* faz parte do grupo de microrganismos definidos como PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) que pode conferir efeitos benéficos as plantas por mecanismos indiretos de interação (FRAVEL, 2005; NIHORIMBERE, et al., 2010)

O número de estudos de bactérias endofíticas em sementes é bastante reduzido quando comparado com outros tecidos das plantas (GAO; MENDGEN, 2006; BENNETT; WHIPPS, 2007). Reflexo disso é que no presente trabalho foi observada a presença de bactérias das classes *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* isoladas em meios de cultura, que não apresentam similaridade com espécies cultivadas. Isso

reforça a importância de estudos com sementes por meio da aplicação de diferentes técnicas.

A ocorrência dessas espécies bacterianas com diferentes características benéficas, principalmente relacionadas à proteção e melhora no desenvolvimento das plantas, pode estar relacionada com o sucesso reprodutivo de *Eucalyptus*. Pois, após a germinação os endófitos presentes nas sementes podem colonizar a plântula em desenvolvimento (FERREIRA et al., 2008), e possibilitar a sobrevivência de plântulas sob diferentes condições ambientais. Dentre os possíveis benefícios para as sementes (plântulas) da presença de um endófito em seu interior podem ser sugeridas duas hipóteses principais: i) proteção contra fitopatógenos, onde os componentes químicos carregados do interior das células podem atrair e sinalizar quimicamente para fitopatógenos também. Os fitopatógenos podem atacar a semente no solo ao serem atraídos no momento que os componentes químicos são carregados de dentro das células (MENTEN; BUENO, 1987; BASKIN; BASKIN, 2001). A presença de endófitos na semente pode inibir o ataque de fitopatógenos conferindo proteção e aumentando a chance de sobrevivência. As duas formas principais que os endófitos podem inibir ação dos fitopatógenos são produção de compostos antagônicos e/ou por competição; ii) produção de hormônios vegetais, os quais são os ativadores da germinação, atuando principalmente na ativação e desativação de genes que controlam diretamente a transcrição (regulador) (BASKIN; BASKIN, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2006). Geralmente os hormônios necessários são armazenados na semente, porém no início da germinação a semente não está com sua maquinaria metabólica ativa e nesse ponto o auxílio dos endófitos poderia ser importante.

No presente trabalho foi descrito pela primeira vez a interação entre a comunidade endofítica e sementes de *Eucalyptus* durante a germinação.

Ainda, este trabalho pode direcionar estudos para culturas onde a semente é a principal forma de plantio no sentido de restringir o uso de sementes com reduzido tempo de estocagem. Pois se os microrganismos presentes nas sementes conferem características benéficas e reduzem com o tempo de estocagem as sementes poderiam perder essa proteção e/ou outros benefícios conferidos pelos endófitos associados.

Referências

- ANDREOTE, F.D.; LAÇAVA, 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.
- 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.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **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.
- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds**. San Diego: Apress, 2001. 520 p.
- BENNETT, A.J.; WHIPPS, J.M. Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 83-89, 2007.
- BRACELPA. Disponível in: <<http://www.bracelpa.org.br/bra/index.html>>. Acesso em: 01 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, p. 341-345, 2005.
- 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.
- CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, The Hague, v. 160, p. 99-127, 2002.
- CROCKER, W.; BARTON, L.V. **Physiology of seeds**. Waltham: Chronica Botanica Company, 1957. 267 p.
- DERAM, A.; LANGUEREAU-LEMANB, F.; HOWSAMC, M.; PETITD, D.; VAN HALUWYNB, C. Seasonal patterns of cadmium accumulation in *Arrhenatherum elatius* (Poaceae): Influence of mycorrhizal and endophytic fungal colonization. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 845-848, 2008.

DINI-ANDREOTE, F.; DINI ANDREOTE, F. D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; VAN ELSAS, J.D.; ARAÚJO, W.L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **American Naturalist**, The Hague, v. 336, p. 337–349, 2010.

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.

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 287, p. 8-14, 2008.

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.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 337-359, 2005.

FREYERMUTH, S.K.; LONG, R.L.G.; MATHUR, S. Metabolic aspects of plant interaction with commensal methylophs. In: LIDSTROM, M.E.; TABITA, F.R. (Ed.). **Microbial growth on C1 compounds**. Amsterdam: Klumer, 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.

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. Colonization 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.

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**, Baltimore, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

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

JI, X.; LU, G.; GAI, Y.; ZHENG, C.; MU, Z. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 565-573, 2008.

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, 2006.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KIM, D.; COOK, J.; WELLER, D. M. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. **Biological Control**, Orlando, v. 87, p. 551-558, 1997.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, 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.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D. E.; CURY, J.C.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917, 2006.

LOQMAN, S.; BARKA, E.A.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p. 81-91, 2009.

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.

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.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

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.

- MENTEN, J.O.M.; BUENO, J.T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: SOAVE, J.; SILVA, I.V. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Corgill, 1987.
- MUNDT, J.O.; HINKLE, F.N. Bacteria with ovules and seeds. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 32, p. 694-698, 1976.
- 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**, Baltimore, v. 59, p. 695-700, 1993.
- NIHORIMBERE, V.; ONGENA, M.; CAWOY, H.; BROSTAUX, Y.; KAKANA, P.; JOURDAN, E.; THONART, P. Beneficial effects of *Bacillus subtilis* on field-grown tomato in Burundi: Reduction of local *Fusarium* disease and growth promotion. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 4, p. 1135-1142, 2010.
- OKUNISHI, S.; SAKO, K.; MANO, H.; IAMAMURA, A.; MORISAKI, H. Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). **Microbes and Environments**, Beijing, v. 20, p. 168-177, 2005.
- PEGG, G.S.; GRYZENHOUT, M.; O'DWYER, C.; DRENTH, A.; WINGFIELD, M.J. The *Eucalyptus* canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* discovered in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, London, v. 39, p. 343-349, 2010.
- 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.
- 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.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for (2008). Disponível em: < www.r-project.org >. Acesso em 06/2010.
- RUDGERS, J.A.; CLAY, K. Endophyte symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems? **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 107-124, 2007.
- 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.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.L.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 319–343, 1998.

SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte–plant. **Trends in Plant Science**, Klidlington, v. 9, p. 275-280, 2004.

SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BEHLE, R.W.; JACKSON, M.A. Formulation of *Bacillus* spp. for Biological Control of Plant Diseases. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 94, p. 1267-1271, 2004.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

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.

SHEN, J.P.; ZHANG, L.M.; ZHU, Y.G.; ZHANG, J.B.; HE, J.Z., Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 1601–1611, 2008.

SIGMAPLOT. 2008. For windows, version 11.0. Systat Software, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Disponível em:
<<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010.

SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resinembedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, New York, v. 26, p. 31, 1969.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. 764 p.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

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.

TURNBULL, G.A.; MORGAN, J.A.W.; WHIPPS, J.M. SAUNDERS, J.R. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and the attachment and colonization of wheat roots. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 36, p. 21-31, 2001.

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.

3 EFEITOS DOS EXSUDADOS DE SEMENTES DE *Eucalyptus* SOBRE O CRESCIMENTO DE *Ceratocystis fimbriata* E *Bipolaris* sp.

Resumo

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae* e é composto por mais de 700 espécies, sendo muitas delas utilizadas em plantio comercial, onde tem tido um destaque na economia mundial. Na eucaliptocultura o uso crescente de clones tem gerado a implantação de monoculturas contribuindo para maior incidência de fitopatógenos. 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 principalmente pelo fungo *Ceratocystis fimbriata*, mas estes sintomas podem ser induzidos por outros fungos, levando a erros na interpretação dos resultados. Dessa forma, isolados fúngicos obtidos de plantas com cancro e murcha foram identificados por seqüenciamento parcial da região RNAr. Foi também verificada a atratividade química de plântulas de *Eucalyptus* a estes fungos e adicionalmente um isolado obtido de cancro foi marcado com o gene da *gfp*. Os isolados fúngicos foram identificados como pertencentes às espécies *Ceratocystis fimbriata*, *Cytospora eucalypticola* e *Bipolaris* sp., demonstrando a ocorrência de mais de uma espécie associada a ocorrência de sintomas cancro e murcha de *Eucalyptus*. As análises de atratividade química mostraram que *Bipolaris* sp. e *Ceratocystis fimbriata* são atraídos quimicamente por exsudatos de sementes e plântulas durante a germinação. Foi observado também que *Bipolaris* sp. causa doença em mudas de *Eucalyptus* com sintomas de murcha. O uso da agrotransformação possibilitou a obtenção de 11 transformantes de *Bipolaris* sp. expressando o gene *gfp*. Esses resultados sugerem que, embora *C. fimbriata* seja a principal causada de cancro e murcha em *Eucalyptus*, há outras espécies fúngicas causando sintomas semelhantes em florestas brasileiras. Esse é o primeiro relato de *Bipolaris* sp. causando doença em *Eucalyptus*. No entanto, a continuidade dos estudos de patogenicidade e aumento amostral de plantas sintomáticas permitirão ampliar as informações acerca desse que pode ser um novo patógeno de *Eucalyptus*.

Palavras-chave: Cancro; Murcha; Germinação; Fitopatógeno; *gfp*; Agrotransformation

Abstract

The genus *Eucalyptus* belongs to the *Myrtaceae* family and is composed by more than 700 species, many of which are used in commercial crops with significant importance for some countries. In this commercial eucalypt plots, the using of clones has contributed to higher incidence of fungal pathogens. Among the diseases considered to be emerging in the forest area, some authors consider the cancer and / or wilted one of the most serious threats to forests worldwide. This disease is mainly caused by the fungus *Ceratocystis fimbriata*, but these symptoms can be induced by other fungi, leading to significant errors in characterization and epidemiological analysis. Therefore, fungal isolates, obtained from plants with canker and wilt, were first identified by partial sequencing of rRNA region and secondly evaluated how the seed exudates may affect the fungal growth. The fungal isolates from *Eucalyptus* canker were identified

as *C. fimbriata*, *Cytospora eucalypticola* and *Bipolaris* sp., suggesting that more than one species are associated to occurrence of cancer symptoms and wilt in Eucalyptus tree. Also, the seed exudates show significant attractiveness to *C. fimbriata* and *Bipolaris* sp. during germination. Although, *Bipolaris* sp. was not described as *Eucalyptus* pathogen, in our analysis, this fungus was able to induce *Eucalyptus* wilt. These results suggest that although *C. fimbriata* seems to be mainly causal agent of *Eucalyptus* cancer and wilt, fungi, such as *C. eucalypticola* and *Bipolaris* sp., may be also associated to similar symptoms in Brazilian forests. This is the first report of *Bipolaris* sp. causing disease in Eucalyptus, but epidemiological studies should be carried on to understand the importance of this fungus in field conditions.

Keywords: Canker; Wilt; Germination; Phytopathogen; gfp; Agrotransformation

3.1 Introdução

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae* e é composto por mais de 700 espécies, sendo muitas delas utilizadas em plantio comercial, onde tem tido um destaque na economia mundial. As principais espécies utilizadas na eucaliptocultura apresentam uma série de doenças bacterianas e fúngicas que podem reduzir de forma significativa a produtividade. Dentre as doenças consideradas emergentes na área florestal, alguns autores consideram o cancro e/ou murcha, causada principalmente pelo fungo ascomiceto peritecial *Ceratocystis fimbriata* Ellis; Halsted (ROUX et al., 2004; ZAUZA et al., 2004). No entanto, é preciso alguns cuidados, já que, sintomas semelhantes no campo podem ser causados também por *Botryosphaeria* e *Cytospora*, além das semelhanças na morfologia de colônias e estruturas reprodutivas utilizadas para caracterizações morfológicas (AUER; KRUGNER, 1994; MYBURG et al., 2004; BAKER; HARRINGTON, 2004; ALONSO et al., 2009; PEGG et al., 2010). Os primeiros relatos de cancro em *Eucalyptus* foram realizados em 1988 (FERREIRA et al., 1999; ROUX et al., 1999). 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 (WITTHUHN et al., 1999; BURGESS; WINGFIELD, 2002; BAKER et al., 2003; ENGELBRECHT et al., 2004; ZAUZA et al., 2004; BARNES et al., 2005; POUSSIO et al., 2010; FERREIRA et al., 2010).

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. Além dos estudos de sintomas externos que envolvem as interações dos fitopatógenos com o hospedeiro, a determinação de patogenicidade e estudos histopatológicos são de extrema importância (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Nesses estudos podem ser citados a microscopia como ferramenta fundamental para visualização de microrganismos nos tecidos internos do hospedeiro (FERREIRA; MAFFIA; FERREIRA, 2005). Dentre os tipos de microscopia, podemos destacar a Microscopia Óptica de Fluorescência (MOF) ou epifluorescência como uma das mais utilizadas atualmente (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005; FERREIRA et al., 2008; NADEAU et al., 2008; RODRIGUES, 2010; ROMÃO 2010). Para a análise por meio da MOF, o espécime a ser analisado necessariamente precisa emitir fluorescência e para isso recorre-se a clonagem e inserção de genes responsáveis pela produção de componentes celulares (LARRAINZAR; O'GARA; MORRISSEY, 2005; BLOEMBERG, 2007). Dentre as proteínas emissoras de fluorescência mais utilizadas com essa finalidade destaca-se a *Green Fluorescent Protein* (GFP), que emite fluorescência verde (BRANDL; MANDRELL, 2002; FERREIRA et al., 2008). Para a introdução do gene desta proteína no genoma do organismo de interesse podem ser utilizados diferentes métodos de transformação genética, entre eles a agrotransformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

A metodologia de agrotransformação é comumente empregada na transformação genética de plantas (MICHIELSE et al., 2005) e foi adaptada para a transformação de fungos, iniciando com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BUNDOCK et al., 1995) e posteriormente para fungos filamentosos (DE GROOT et al., 1998). Essa metodologia, vem sendo utilizada cada vez mais para fungos filamentosos, visto que é crescente o número fungos, tais como representantes dos filos Ascomycota, Basidiomycota, Zigomicota, Glomeromicota, bem como Oomicetos que já foram transformados por esse método (MICHIELSE et al., 2005; LACROIX et al., 2006; FÁVARO, 2009; RODRIGUES, 2010; PALLU, 2010; ROMÃO, 2010).

No presente trabalho foram utilizadas técnicas clássicas, como o isolamento de fungos fitopatogênicos e testes de patogenicidade *in vitro* e *in situ*, bem como técnicas moleculares para um melhor entendimento das relações entre *Eucalyptus* e o cancro. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram: *i*) isolar fungos de amostras de madeira coletadas de plantas com sintomas aparentes de murcha e cancro; *ii*) identificar por meio do seqüenciamento de regiões ITS esses isolados fúngicos obtidos; *iii*) verificar a atratividade de plântulas de *Eucalyptus* aos fungos associados a murcha e cancro; e *iv*) marcar com o gene da *gfp* um isolado fúngico associado a murcha e cancro, por meio de agrotransformação.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Isolados fúngicos

No presente estudo foram utilizados 10 isolados de fungos obtidos de tecidos de *Eucalyptus* com sintomas de cancro (Tabela 1). Os isolados fúngicos cedidos por outros laboratórios foram previamente identificados e caracterizados como *Ceratocystis fimbriata*. Todos os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA a 28°C e posteriormente armazenados em água ultra pura autoclavada.

Tabela 3.1 - Isolados fungicos obtidos no presente trabalho e também isolados cedidos por colaboradores

Isolado	Origem
Agn 7	LPF UFV*
UFV 101	Cia Suzano Papel e Celulose
CfSz	Cia Suzano Papel e Celulose
PT 15	Cia Suzano Papel e Celulose
SP 791	Cia Suzano Papel e Celulose
CTF 101	Cia Suzano Papel e Celulose
NSS 2.1	Esse trabalho
NSS 2.2	Esse trabalho
NSS 2.3	Esse trabalho

*Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa

3.2.2 Isolamento de fungos a partir de plantas com sintomas

Foi utilizada neste estudo a metodologia descrita por Alfenas et al. (2007) para isolamento de *C. fimbriata*. Essa metodologia é baseada no uso de fragmentos de cenoura como “iscas” para os fungos presentes em fragmentos de madeira. O procedimento consistiu em: cortar fragmentos de caule de aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,5 mm de espessura; cortar discos de cenoura, lavar e secar as mesmas; colocar os fragmentos de madeira em contato com os discos de cenoura; incubar em câmara úmida a 25°C. A observação foi realizada diariamente até o aparecimento de colônias fúngicas.

3.2.3 Identificação molecular dos isolados fúngicos

3.2.3.1 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose (BD) líquido por aproximadamente 15 dias a 28°C, sendo este micélio filtrado em funil com papel de filtro esterilizado com auxílio de bomba de vácuo. O micélio foi triturado em cadinho com auxílio de pistilo (autoclavados) e adição de nitrogênio líquido. Um grama de micélio triturado foi utilizado para extração do DNA total por meio do kit *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega, EUA). O protocolo de extração foi seguido de acordo com as recomendações do fabricante com adição de uma etapa extra de desproteínização com fenol e clorofórmio (1:1), centrifugação e coleta da fase aquosa. Após extração, a qualidade e quantidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) corados com brometo de etídio e observados sobre luz ultravioleta.

3.2.3.2 Amplificação das regiões ITS dos isolados fúngicos

A amplificação das regiões ITS1-5,8S-ITS2 e 18S do rDNA foi realizada por PCR utilizando 3 ng de DNA extraído de acordo com item anterior. Os iniciadores utilizados

foram o ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), que amplificam uma região de aproximadamente 600 pares de bases (WHITE et al., 1990). As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 3 ng de DNA, Tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4)), 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxiribonucleotídeos trifosfato, 0,2 µM de cada iniciador e 0,05U. µ L⁻¹ de Taq DNA polimerase (Sigma) e 0,2 µM de cada iniciador. Um controle negativo (reação de PCR sem DNA) 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 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg. Após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 10 min. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), seguida de coloração com brometo de etídio e observação do fragmento de 600 pb sobre luz ultravioleta.

3.2.3.3 Seqüenciamento e análise das regiões ITS dos isolados fúngicos

Os produtos de PCR (item 3.2.3.2) foram purificados com polietilenoglicol (polietilenoglicol 8000 20%; NaCl 2,5 mM) e seqüenciado (Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo). As seqüências obtidas foram comparadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) contra a base de dados do GenBank. Após a comparação com a base de dados as seqüências foram utilizadas para alinhamento e análise filogenética no programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007).

3.2.4 Atratividade química de sementes de *Eucalyptus* a CfSz e Agn7

Foi estudada a ocorrência, *in vitro*, de interação química entre sementes e plântulas de *Eucalyptus* com os isolados CfSz e Agn7. Foram testadas sementes de 8 espécies e 2 híbridos de *Eucalyptus* (*E. brassiana*, *E. camandulensis*, *E. citriodora*, *E. dunnii*, *E. globulus* x *E. grandis*, *E. grandis*, *E. pelita*, *E. robusta* x *E. grandis*, *E. saligna*, e *E. urophylla*). Os experimentos foram realizados a partir da inoculação e germinação

de sementes de *Eucalyptus* sobre meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) a 25°C com 12 h de fotoperíodo. 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). As sementes foram inoculadas em quatro pontos posicionados de forma eqüidistante nas extremidades das placas de Petri contendo meio de cultura MS (Figura 3.1A). Após a germinação (aproximadamente 128 horas) o isolado fúngico a ser testado foi inoculado no centro das placas sobre o meio de cultura (Figura 3.1B). Adicionalmente, as sementes em um dos quatro pontos foram removidas após a germinação para que fosse avaliada, nesses pontos, somente o efeito dos exsudados liberados durante a germinação (Figura 3.1B). Nos demais pontos da placa as sementes foram mantidas mesmo após a germinação, e a interação química entre *Eucalyptus* e os isolados CfSz e Agn7 foi avaliada. Os experimentos foram repetidos independentemente para cada linhagem fúngica e sempre em duplicata para cada espécie/híbrido de *Eucalyptus* testado. Um tratamento controle foi realizado onde o fungo foi inoculado sobre o meio MS, mas na ausência de sementes, e o seu crescimento monitorado juntamente com os demais tratamentos. As análises foram realizadas por monitoramento visual quanto ao aspecto de crescimento dos fungos e das plântulas por até 60 dias.

Figura 3.1 - Fotos de placas contendo meio de cultura MS onde foram inoculadas sementes de *Eucalyptus* desinfestadas superficialmente. A - foto mostrando a posição como as sementes foram inoculadas sobre o meio de cultura. B - foto mostrando as sementes já germinadas. Seta a direita indica um dos pontos onde as sementes foram removidas logo após a germinação. Seta a esquerda indica o centro da placa onde o fungo foi inoculado

3.2.5 Efeito de CfSz e Agn 7 sobre mudas de *Eucalyptus*

Foram utilizadas plântulas cultivadas sobre substrato Basaplant (Base agro), mantidas em casa de vegetação por 60 dias. Os isolados fúngicos foram inoculados no substrato (inóculo preparado como no item 3.2.5). A variável analisada foi observação visual do aparecimento de sintomas de doença em comparação com plantas controle. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação por 30 dias. O experimento foi fotodocumentado durante o período de avaliação.

3.2.6 Transformação genética de fungos

3.2.6.1 Teste de sensibilidade a higromicina B

A inibição do crescimento por higromicina B (Invitrogen) foi determinada antes dos experimentos de agrotransformação. Para a determinação da CIM (concentração

inibitória mínima) o isolado fúngico foi inoculado em placas de Petri contendo meio BDA com diferentes concentrações de higromicina B (0; 25; 50; 75; 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As análises foram realizadas em triplicata. As culturas foram incubadas a 28°C durante 7 dias e então o crescimento do fungo (cm) foi avaliado. O crescimento da linhagem foi monitorado até o momento em que as colônias da placa controle (sem antibiótico) atingiram a extremidade da placa. A concentração de higromicina B que inibiu totalmente o crescimento micelial foi utilizada para os experimentos de agrotransformação.

3.2.6.2 Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* e vetor de transformação

A linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada na transformação foi a EHA105, a qual foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Labate (Laboratório “Max Feffer” de Genética de Plantas, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil) à Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro (Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana, Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil) que as cedeu gentilmente para a realização desse trabalho. A linhagem EHA105 foi estocada em meio Luria-Bertani (LB) contendo os antibióticos rifampicina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e espectinomicina (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a manutenção do plasmídeo Ti desarmado (FÁVARO, 2009).

O vetor binário de transformação de fungos pFAT-gfp (Figura 3.2) presente na linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* foi gentilmente cedido à Dra. Léia C. de Lima Fávaro pelo Dr. Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália). Esse vetor contém na sua região T-DNA o gene de resistência ao antibiótico higromicina B de *E. coli* (*hph*), controlado pelo promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) de *Glomerella cingulata*; e também o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) (pGreen Lantern, Life Technologies) controlado pelo promotor do gene *gpd* de *Aspergillus nidulans* (FITZGERALD et al., 2003).

Figura 3.2 - Mapa do vetor de transformação de fungos mediada por *A. tumefaciens* pFAT-gfp, desenvolvido por Fitzgerald et al. (2003) e gentilmente cedido por Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália) para realização deste trabalho. (RB) Borda direita do T-DNA. (LB) Borda esquerda do T-DNA. (*hph*) Gene de resistência a higromicina B de *E. coli*. (*trpC* 3') Signal de terminação transcricional do gene *trpC* de *A. nidulans*. (An p-*gpd*) Promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato de *A. nidulans*. (Gc p-*gpd*) Promotor do gene *gpd* de *G. cingulata*. (Gc *gpd* 3') Signal de terminação transcricional do gene *gpd* de *G. cingulata*. (Sp^R) Gene de resistência a espectinomicina. (RK2 *oriV*) Origem de replicação vegetativa RK2. (RK2 *oriT*) Origem de transferência RK2. (322 *ori*) Origem de replicação de pBR322. (*trfA*) Gene de replicação *trfA* de RK2. (*gfp*) Gene da proteína verde fluorescente pGreen Lantern (Life Technologies). Fonte: Fitzgerald et al. (2003)

3.2.6.3 Otimização do protocolo de transformação

Visando aperfeiçoar as condições da transformação genética mediada por *A. tumefaciens* para o fungo de interesse, vários parâmetros foram estudados. A metodologia adotada seguiu basicamente o protocolo descrito por De Groot et al. (1998) para fungos filamentosos, com modificações. Colônias isoladas da linhagem EHA105 de *A. tumefaciens*, crescidas durante três dias em meio de cultura YEP (10 g de extrato de levedura; 10 g de bactopectona; 5 g de NaCl; 15 g de ágar; 1000 mL de água destilada; pH 7,0), foram transferidas para 20 mL de meio de cultura YEP líquido (10 g de extrato de levedura; 10 g de peptona; 5 g de NaCl; 1000 mL de água destilada; pH 7,0), acrescido dos antibióticos espectinomicina e rifampicina (100 µg.mL⁻¹). Os frascos foram incubados a 28°C sob agitação (200 rpm) durante 16 horas. Em seguida, a cultura foi ajustada para densidade óptica de 0,15 (OD₆₆₀) em meio de cultura de

indução (10 mM de K_2HPO_4 ; 10 mM KH_2PO_4 ; 2,5 mM de NaCl; 2,0 mM de $MgSO_4$; 0,7 mM de $CaCl_2$; 9 μM de $FeSO_4$; 4 mM de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% (v/v) de glicerol; 10 mM de glicose e 40 mM de ácido-2[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração; pH 5,3). O meio de indução foi acrescido de 200 μM de acetoseringona (Fluka), dependendo do tratamento. O controle consistiu de meio de indução sem acetoseringona.

As células foram incubadas a 28°C sob agitação (200 rpm), por um tempo adicional até que a cultura alcançasse densidade óptica de 0,6 (OD_{660}). Nas condições utilizadas este tempo de indução de competência foi de aproximadamente 9 horas. No dia anterior (24h antes), pequenas quantidades de micélio (pontos) do fungo com 10 dias de crescimento foram repicadas sobre vários quadrados de 1 cm² de dois diferentes tipos de membrana. Papel filtro (8 μm de porosidade J. Prolab, Brasil) e náilon (0,45 μm de porosidade GE Healthcare), os quais estavam dispostos sobre meio de cultura de indução sólido (10 mM de K_2HPO_4 ; 10 mM KH_2PO_4 ; 2,5 mM de NaCl; 2,0 mM de $MgSO_4$; 0,7 mM de $CaCl_2$; 9 μM de $FeSO_4$; 4 mM de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% (v/v) de glicerol; 10 mM de glicose e 40 mM de ácido-2[N-morfolino]-etanossulfônico, esterilizado por filtração; 20 g de ágar; pH 5,3). Posteriormente, foram inoculados 20 μL da cultura sobre cada ponto de micélio previamente inoculado sobre as membranas. Ao meio de cultura sólido para indução foram testadas as concentrações de 200 μM e 400 μM (tratamentos) ou sem acetoseringona (controle). As culturas foram incubadas a 25°C durante 24 e 48 horas na ausência de luz. Após este período, que é denominado tempo de co-cultivo, as membranas foram transferidas para meio de cultivo BDA suplementado com 200 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B (Invitrogen) e 200 $\mu g.mL^{-1}$ de cefoxitina sódica (Eurofarma) e incubadas a 28°C por 7 e 15 dias. A cefoxitina sódica é usada para eliminar a bactéria, e a higromicina B para selecionar os transformantes. O cultivo foi avaliado diariamente após a transferência das membranas até 60 dias. As colônias resistentes à higromicina B, foram transferidas para meio de cultivo seletivo (BDA suplementado com 200 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B) para posterior purificação e armazenamento. Dessa forma, os parâmetros avaliados foram: concentração do indutor acetoseringona (200 μM e 400 μM), diferentes tipos de membrana (papel filtro 8 μm de porosidade) e náilon (0,45 μm de porosidade) e tempo de co-cultivo (24 ou 48 horas).

Os experimentos foram realizados três vezes independentes com cinco repetições cada e adotando as mesmas condições.

3.2.6.4 Análise da estabilidade dos transformantes

Para a análise da estabilidade mitótica foram avaliados os isolados transformantes obtidos nos experimentos de transformação. Antes de iniciar os testes de estabilidade, colônias jovens dos transformantes foram obtidas por meio de repicagem seguida de crescimento por cinco dias em meio de cultura BDA (Difco), acrescido de higromicina B ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$). Após isso, os transformantes foram repicados sete vezes consecutivas em meio BDA (Difco) sem a adição de higromicina (agente seletivo), utilizando hifas jovens como fonte de inóculo. Após as repicagens sucessivas os transformantes foram novamente repicados para meio de cultura BDA (Difco) suplementado com $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ de higromicina B. A porcentagem de transformantes estáveis foi calculada por regra de três simples. Adicionalmente, os transformantes foram analisados ao microscópio de epifluorescência para verificar se a expressão de *gfp* foi mantida após o teste.

3.2.6.5 Purificação e estocagem dos fungos

A purificação dos transformantes estocados foi realizada por meio de repicagem em série e semeadura em meio de cultura BDA. Para isso, com o auxílio de palitos de madeira previamente esterilizados, fragmentos do micélio dos transformantes foram coletados, semeados sobre meio BDA e incubado a 28°C para o crescimento e obtenção de transformantes purificados. Após confirmação, os transformantes foram armazenados em frascos com água à temperatura ambiente.

3.2.6.6 Análise dos transformantes por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A confirmação da transformação foi realizada por meio da amplificação dos genes da proteína verde fluorescente (*gfp*) presentes na região T-DNA. O DNA genômico dos transformantes foi extraído de acordo com o item 3.2.3.1. A amplificação

do gene *gfp* foi realizada com os iniciadores gIGFP5 (5'-GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC-3') e gIGFP3 (5'-GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'), que amplificam o fragmento da sequência do gene da proteína verde fluorescente do vetor de transformação pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003).

As reações foram preparadas para um volume final de 25 μ L, com 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de $MgCl_2$; Tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4)); 0,05 U. μ L⁻¹ de Taq DNA polimerase (Sigma) e 0,2 μ M de cada iniciador. A PCR foi realizada em um termociclador PTC – 200 (MJ Research, USA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 32 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 7 min. Como controle positivo, 20 ng de DNA plasmidial foram utilizados como molde. A confirmação da amplificação do fragmento de DNA alvo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), coloração com brometo de etídio e observação do fragmento de tamanho esperado (750 pb) sobre luz ultravioleta.

3.2.6.7 Análise dos transformantes por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

Os transformantes obtidos foram analisados quanto à expressão do gene *gfp*, por meio de microscopia de fluorescência (MOF). Para visualização do micélio, foram preparadas placas contendo meio BDA (Difco) suplementado com higromicina B (200 μ g.ml⁻¹) sobre as quais foram colocadas lamínulas de vidro esterilizadas. Nas laterais de cada lamínula e adjacente ao meio de cultura, o transformante proveniente de cultura crescida em meio seletivo foi inoculado e incubado a 28°C por 4-7 dias. As lâminas foram preparadas com água destilada esterilizada, vedadas com esmalte incolor e diretamente analisadas ao microscópio. As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) com o filtro FITC (459 nm a 490 nm), o qual é indicado para análise de *gfp*. As amostras foram excitadas utilizando o referido filtro as imagens foram capturadas com uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio, com auxílio do software ISIS (Meta Systems, Alemanha). A linhagem selvagem CfSz foi utilizada como controle na observação da emissão de fluorescência.

3.3 Resultados

3.3.1 Isolamento de fungos de plantas com sintomas

O método descrito por Alfenas et al. (2007) baseado no uso de iscas de cenoura permitiu o isolamento de vários isolados fúngicos morfológicamente similares à *Ceratocystis fimbriata*. As observações foram realizadas diariamente e após 7 a 10 dias iniciou o aparecimento de colônias fúngicas nas iscas de cenoura (Figura 3.3). Foram selecionados para esse estudo somente os isolados que apresentavam coloração e aspectos morfológicos de colônia semelhantes a *Ceratocystis fimbriata*, ou seja, colorações variando de verde oliva a preta, com micélio jovem de coloração branca. Os demais isolados morfológicamente distintos foram excluídos.

Foram observados isolados fúngicos com as referidas características somente nas amostras de madeira provenientes de plantas que apresentavam sintomas de cancro. Após essa seleção inicial foram obtidos cerca de 6 isolados de interesse dos quais foram selecionados 3 que foram submetidos a identificação por seqüenciamento da região ITS. Os isolados receberam os códigos NSS 2.1, NSS 2.2 e NSS 2.3.

Figura 3.3 - Foto de uma placa de Petri contendo iscas de cenoura e fragmento de madeira coletada de plantas que apresentavam sintomas característicos de *Ceratocystis fimbriata*. A placa foi incubada a 25°C em câmara úmida por 10 dias para estimular o crescimento do fungo e posterior migração para a isca de cenoura

3.3.2 Identificação dos isolados fúngicos e análise da região ITS

Um total de 9 fungos foram identificados por meio de seqüenciamento parcial do ITS rDNA (Tabela 3.1). Essa identificação permitiu acessar as espécies de fungos presentes em amostras de plantas com sintomas de *C. fimbriata* e confirmar as identificações dos fungos que já haviam sido isolados e identificados morfológicamente por outros pesquisadores (Tabela 3.1). As espécies obtidas nas amostras de plantas sintomáticas avaliadas neste estudo foram identificadas como pertencentes a espécie *Cytospora eucalypticola* (Tabela 3.1). Os isolados CfSz, CTF 101 e UFV 101, recebidos de outros laboratórios, e previamente identificados como *C. fimbriata*, foram identificados como *Bipolaris* sp.. (Tabela 3.1). Não foram obtidas seqüências de qualidade a partir do DNA dos isolados NSS 2.3, PT 15 e SP 791 impossibilitando a identificação dos mesmos. *Cytospora* e *Ceratocystis* pertencem a classe *Sordariomycetes* já, *Bipolaris* pertence a classe *Dothideomycetes*, ambas pertencentes ao filo Ascomycota (tabela 3.1). Uma representação gráfica da filogenia dos fungos pode ser visualizada na figura 3.4, onde os isolados formam 2 grupos distintos de acordo as classes as quais pertencem.

Tabela 3.1 - Identificação de isolados fúngicos obtidos no presente trabalho e também de isolados cedidos por colaboradores. A identificação molecular das espécies foi realizada por sequenciamento parcial do ITS rDNA e análises de comparação no BLASTn (*National Center for Biotechnology Information website*)

Isolado	Classe	Espécie (Blast-NCBI)	%	Linhagem de referência
Agn 7	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	98%	AF395687.1
UFV 101	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Bipolaris</i> sp..	98%	DQ123600.1
CfSz	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Bipolaris</i> sp..	98%	DQ123600.1
CTF 101	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Bipolaris</i> sp..	99%	DQ123600.1
NSS 2.1	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Cytospora eucalypticola</i>	99%	EU552120.1
NSS 2.2	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Cytospora eucalypticola</i>	99%	EU552120.1

*Similaridade com a linhagem de referência

Figura 3.4 - Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining com seqüências do ITS rDNA. As seqüências foram obtidas dos isolados fúngicos identificados molecularmente nesse estudo (Agn 7, UFV 101, CfSz, CTF 101, NSS 2.1 e NSS 2.2). Seqüências de referencia do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. Como grupo externo foi utilizado o basidiomiceto *Helicobasidium mompa*. Os valores de *bootstrap* superiores a 50 são mostrados nos internódios (n= 1000 replicatas). As barras indicam a divergência das seqüências.

3.3.3 Atratividade química de sementes de *Eucalyptus* a CfSz e Agn7

A análise, *in vitro*, de atratividade química de sementes de *Eucalyptus* aos isolados CfSz (*Bipolaris* sp.) e Agn7 (*C. fimbriata*) mostrou que ambos os fungos são atraídos pelos exsudados das sementes e raízes durante a germinação (Figura 3.5). *Bipolaris* sp. é atraído quimicamente pelos exsudados de um número maior de espécies de *Eucalyptus* do que *C. fimbriata* (Tabela 3.2). Além disso, *Bipolaris* sp. cresce em direção as plântulas e exsudados ocasionando a morte das plântulas após o contato. Já, *C. fimbriata* atacou a maioria das espécies somente após o contato das raízes com micélio do patógeno (Tabela 3.2; Figura 3.6).

Foi observado também que mesmo após remoção das sementes, os exsudados liberados no meio de cultura são detectados pelo fungo *Bipolaris* sp., o qual cresce em

direção ao local onde previamente estavam as sementes (Figura 3.5B e 3.7). O tratamento controle, que consistiu de fungo inoculado em meio de cultura MS na ausência de sementes, apresentou um crescimento circular uniforme em vez de crescimento direcionado como nos casos de atratividade química observados em algumas sementes e exsudados (figura 3.5A).

Figura 3.5 - Fotos de placas contendo meio de cultura MS. A - foto mostrando a placa controle com o fungo *Bipolaris* sp.. inoculado no centro da placa. B - foto mostrando placa onde foram inoculadas sementes de *Eucalyptus citriodora* desinfestadas superficialmente e o fungo *Bipolaris* sp. inoculado no centro da placa exemplificando a atratividade química observada nos experimentos tanto para exsudados de sementes quanto para plântulas. Seta indica o local onde as sementes foram removidas logo após a germinação. As placas foram incubadas a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas

Figura 3.6 - Fotos de placas contendo meio de cultura MS onde foram inoculadas sementes de *Eucalyptus grandis* (*) desinfestadas superficialmente e o fungo *Ceratocystis fimbriata* inoculado no centro da placa (♦). A – foto de placa invertida mostrando que o fungo não cresceu em direção as plântulas. seta indicando um dos locais de contato da raiz com o micélio do fungo. B - foto mostrando placa onde foram inoculadas sementes de *Eucalyptus grandis* exemplificando o ataque do fungo a raiz que cresceu em direção ao micélio. Seta indica locais de contato da raiz com o micélio do fungo. As placas foram incubadas a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas

Tabela 3.2 - Espécies e híbridos de *Eucalyptus* testadas quanto a atratividade química para os fungos *Ceratocystis fimbriata* e *Bipolaris* sp. sobre meio de cultura MS

Espécies de <i>Eucalyptus</i>	Atratividade Química			
	<i>Ceratocystis fimbriata</i>		<i>Bipolaris</i> sp.	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
<i>E. brassiana</i>	-	+	-	-
<i>E. camandulensis</i>	-	+	-	-
<i>E. citriodora</i>	-	-*	+	+
<i>E. dunnii</i>	-	-*	-	+
<i>E. globulus</i> x <i>E. grandis</i>	-	-*	-	-
<i>E. grandis</i>	-	-*	nt	nt
<i>E. pelita</i>	-	-	nt	nt
<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>	-	-*	+	+
<i>E. saligna</i>	-	-	nt	nt
<i>E. urophylla</i>	-	-*	-	+

(+) Com atratividade para o fungo. (-) Sem atratividade para o fungo. (-*) Fungo atacou a plântula devido ao crescimento na direção do micélio. (nt) Não testado

Figura 3.7 - Fotos de placas contendo meio de cultura MS onde foram inoculadas sementes de *Eucalyptus citriodora* desinfestadas superficialmente e o fungo *Bipolaris* sp. inoculado no centro da placa. No detalhe a direita é possível observar o local onde as sementes foram removidas logo após a germinação e o fungo foi atraído para os exsudados liberados no meio de cultura

3.3.4 Efeito de CfSz e Agn 7 sobre mudas de *Eucalyptus*

Foram estudados os efeitos dos isolados CfSz (*Bipolaris* sp.) e Agn 7 (*C. fimbriata*) sobre o desenvolvimento de *Eucalyptus citriodora*, *E. urophylla* e do híbrido *E. grandis* x *E. globulus*. Os resultados mostraram sintomas distintos. No caso de Agn 7 os sintomas foram murcha e posterior morte da planta (Figura 3.8A), tendo a murcha aparecido após 15 a 20 dias, resultando em morte das plantas 1-2 dias após início dos sintomas. Já o isolado CfSz foi menos agressivo e mais direcionado para parte aérea das plantas, principalmente nas regiões meristemáticas (ponteiros) e folhas jovens (Figura 3.8B). Esses sintomas foram do tipo lesões iniciando na extremidade das folhas e migrando em direção aos ramos e posteriormente ao caule (Figura 3.9). Nas inoculações com CfSz foi observado intensa desfolha com atraso de crescimento, no entanto, não foi observada a morte das plantas até 30 dias após a inoculação.

Figura 3.8 - Fotos de plantas de *Eucalyptus* cultivadas em substrato por 60 dias. A - foto mostrando uma planta morta após ser transferida para substrato inoculado o fungo *Ceratocystis fimbriata* Agn 7. B - foto mostrando uma planta com diferentes sintomas após ser transferida para substrato inoculado o fungo *Bipolaris* sp. CfSz C - foto mostrando uma planta controle transferida para substrato sem inóculo

Figura 3.9 - Fotos de plantas de *Eucalyptus* cultivadas em substrato por 60 dias e transferidas para substrato inoculado com o fungo *Bipolaris* sp. CfSz A - foto mostrando sintomas de desfolha acentuada na parte inferior da planta. B - foto mostrando sintoma de murcha e necrose foliar e de parte do ramo. C - foto mostrando sintoma de murcha e necrose do ponteiro da copa da planta (ramos e folhas)

3.3.5 Transformação genética de CfSz *Bipolaris* sp.

3.3.5.1 Teste de sensibilidade do isolado CfSz de *Bipolaris* sp. a higromicina B

O vetor pFAT-gfp carrega além do gene de *gfp* que permite selecionar colônias transformantes por emissão de fluorescência, um gene que confere resistência a higromicina B. Dessa forma, antes do início dos experimentos o isolado CfSz de *Bipolaris* sp. foi testado quanto a sensibilidade a diferentes concentrações de higromicina B, o qual apresentou uma CIM (concentração inibitória mínima) de 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para reduzir a probabilidade de aparecimento de mutantes espontâneos, foi utilizada a concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para condução dos experimentos de agrotransformação.

3.3.5.2 Otimização do protocolo de transformação

O isolado CfSz cresceu normalmente sobre papel de filtro e náilon, sendo possível obter transformantes de *Bipolaris* sp. CfSz com 400 μM de acetoseringona (AS) e 48h de co-cultivo. Isso ocorreu somente após aproximadamente 45 dias de experimento. Foram necessários três eventos independentes de transformação para que, somente no terceiro, finalmente fosse observado o aparecimento de colônias resistentes a higromicina e expressando o gene da *gfp*. Foi obtida uma única colônia resistente e devido ao tempo avançado de cultivo a mesma apresentava alguns setores já na placa do experimento de transformação. Os diferentes setores aparentes da colônia foram repicados sobre meio de cultura contendo higromicina B. Após esse repique não ocorreu mais a formação de setores e cada colônia obtida foi considerada como um transformante. Na ausência de acetoseringona, nenhum transformante foi recuperado. No total foram obtidos 11 transformantes resistentes a higromicina e expressando o gene *gfp*. Os isolados transformantes receberam os códigos NSS3.1 até NSS3.11.

3.3.5.3 Análise da estabilidade mitótica

Análise dos transformantes quanto à estabilidade mitótica e expressão do gene *gfp* foi realizada com intuito de testar se a inserção dos gene de resistência (*hph*) e gene *gfp* estavam presentes no genoma de *Bipolaris* sp. Após os testes foi observado que todos os 11 transformantes continuaram com a capacidade de emitir fluorescência verde (gene *gfp* inserido) e crescer em meio de cultura contendo higromicina B (gene *hph* inserido). Assim, foi calculada e observada a taxa de 100% de estabilidade mitótica para os transformantes obtidos.

3.3.5.4 Análise dos transformantes por PCR e por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

Após a confirmação da estabilidade mitótica dos transformantes de *Bipolaris* sp. os mesmos foram submetidos a confirmação da presença do gene *gfp* do vetor pFAT-*gfp*. Essa confirmação da transformação de *Bipolaris* sp. foi realizada pela amplificação de um fragmento de aproximadamente 700 pb correspondente ao gene *gfp* presente em todos os transformantes (Figura 3.10). O uso dos iniciadores glGFP5 e glGFP3 possibilitou também amplificar o referido fragmento de 700 pb a partir do DNA do vetor pFAT-*gfp* e nenhum produto de amplificação foi obtido para o isolado selvagem CfSz (*Bipolaris* sp.) (Figura 3.10).

Figura 3.10 - Fotos de gel com amplificações utilizando o iniciadores glGFP5 e glGFP3 para confirmação da transformação. Linha 1 representa o fragmento de DNA amplificado a partir do vetor pFAT-gfp; linha 2 representa ausência de amplificação a partir do DNA da do isolado selvagem CfSz de *Bipolaris* sp.; linhas 3-10 representam os fragmentos de DNA de aproximadamente 700 pares de base amplificados a partir do DNA de 8 transformantes escolhidos ao acaso. (M) marcador de peso molecular 1 Kb

Os transformantes foram analisadas por MOF com intuito de confirmar a expressão do gene *gfp* (Figura 3.11A, B e C). A emissão de fluorescência foi observada nas hifas de todos os transformantes de *Bipolaris* sp., mesmo após os testes de estabilidade mitótica (item 3.3.6.3). As hifas do isolado selvagem não apresentaram fluorescência (Figura 3.11D). A emissão de fluorescência foi observada de forma uniforme em toda extensão das hifas analisadas, sem acúmulo em partes específicas das mesmas (Figura 3.11A, B e C).

Figura 3.11 - Visualização em microscópio óptico de fluorescência de *Bipolaris* sp. expressando *gfp*. A, B e C – isolado transformado expressando *gfp*. D – isolado selvagem de *Bipolaris* sp. não expressando *gfp*. filtro utilizado FITC (459 nm a 490 nm)

3.4 Discussão

Nos últimos anos o plantio de *Eucalyptus* vem aumentando em muitos países inclusive no Brasil (SBS, 2008; BRACELPA, 2010). Essa expansão da eucaliptocultura associada ao uso comercial de clones favorece o surgimento de novos patógenos (ANDJIC et al., 2007; FERREIRA et al., 2006; PEGG et al., 2010). Outra consequência desse mono cultivo é o aumento na incidência de patógenos anteriormente considerados menos importantes como, por exemplo, *Quambalaria pitereka* (PEGG et al., 2008). No presente trabalho foi relatada a ocorrência de *Cytospora eucalypticola* em lesões de cancro em plantas *Eucalyptus* cultivadas no estado da Bahia. Esse patógeno foi descrito no Brasil atacando *Eucalyptus globulus* e *E. grandis* em (AUER; KRUGNER;

MARCOS FILHO, 1988; ALFENAS et al., 2000) e foi detectado também no estado de São Paulo causando cancro em caules de *E. grandis* (AUER; KRUGNER, 1994). Esse patógeno é considerado de agressividade intermediária que ocorre principalmente em situações de estresse da planta (KLIEJUNAS et al., 2001; ALONSO et al., 2009). A metodologia utilizada para os isolamentos e que permitiu a detecção de *C. eucalypticola* foi baseada no uso de iscas de cenoura, considerada até então, seletiva para *C. fimbriata* (MOLLER; De VAY, (1968); ALFENAS et al., 2007; BAKER; HARRINGTON, 2004). As plantas utilizadas nesse estudo apresentavam sintomas típicos de *C. fimbriata* no campo, os quais são similares aos causados por outros fungos patogênicos podendo induzir equívocos na identificação (BAKER; HARRINGTON, 2004; FERREIRA et al., 2005, 2006). Nesse contexto, é possível inferir que podem estar ocorrendo diagnósticos imprecisos quanto a ocorrência dos patógenos causadores de cancro e murcha nas florestas de *Eucalyptus* brasileiras, principalmente quando a caracterização molecular dos fungos não é realizada.

Outro exemplo da possibilidade de erros de identificação é o isolado CfSz que foi previamente identificado, por métodos morfológicos, como *C. fimbriata* e obtido de plantas de *Eucalyptus* apresentando sintomas de murcha e cancro, típicas desse fungo. No entanto, após caracterização molecular o isolado CfSz foi identificado como *Bipolaris* sp., o qual é a fase anamórfica de *Cochliobolus* (AGRIOS, 2004). Esse fungo é conhecido como causador de doenças em folhas e raízes em várias espécies vegetais como: trigo, arroz, milho, aveia, sorgo, cana-de-açúcar, entre outras (AGRIOS, 2004; IFTIKHAR et al., 2009), porém não há relatos na literatura de *Bipolaris* sp. causando cancro e murcha em *Eucalyptus*. Em *Eucalyptus* há relatos somente da ocorrência do fungo *Curvularia* (Teleomorfo – *Cochliobolus*) em sementes e plântulas afetando o desenvolvimento (SAXEMA, 1985; KUMAR; NATH, 1988; YUAN et al., 1997). Recentemente Taylor et al. (2009) descreveram *Bipolaris* sp. como endófito em *Eucalyptus*, porém associado a ocorrência de cancro em plantas. No referido estudo os autores detectaram *Bipolaris* sp. em associação com *Botryosphaeria*, causador de cancro em plantas arbóreas em geral, inclusive em *Eucalyptus* (ALVES; CORREIA; PHILLIPS, 2006; PHILLIPS et al., 2006). No presente trabalho foi observado que *Bipolaris* sp. pode causar murcha e desfolha generalizada em *Eucalyptus*. No campo, é

possível que este patógeno ocorra em associação a outros fungos como *C. fimbriata*, *C. eucalypticola* e *Botryosphaeria* sp. levando ao aumento dos sintomas causados por estes fungos. Tendo em vista que estas espécies apresentam similaridade quanto à coloração e morfologia das colônias, erros na identificação podem ocorrer, permitindo que apenas uma espécie, em geral *C. fimbriata*, seja indicada como causadora dos sintomas. Taylor et al. (2009) utilizaram inicialmente características morfológicas de colônia para identificar fungos isolados de *Eucalyptus* atacados por *Botryosphaeria*. No referido estudo os autores detectaram *Bipolaris* sp. o qual foi erroneamente caracterizado morfológicamente como *Botryosphaeria*. Somente após a caracterização molecular foi possível a re-identificação correta. Fato esse que reforça a idéia de que maior atenção deve ser dada ao problema de erros decorrentes de identificações morfológicas de fungos patogênicos, principalmente associados a cancrios e murchas nas florestas de *Eucalyptus*.

O fungo *Bipolaris* sp. apesar de não ter sido descrito ainda como patógeno de *Eucalyptus* e ter apresentado sintomas de murcha, no presente trabalho apresentou forte quimiotaxia para exsudados de sementes e plântulas de algumas espécies. Esse fungo é amplamente descrito como patógeno de sementes em outras espécies, como trigo, milho e cana-de-açúcar, porém ainda não havia sido descrito em sementes de espécies arbóreas (AGRIOS, 2004; MARTINS, 2006; IFTIKHAR et al., 2009). As sementes e raízes naturalmente liberam exsudados durante o processo germinativo e crescimento das plântulas (HOOD; Van DIJK; NELSON, 1998; BASKIN; BASKIN, 2001; NIELSEN et al., 2005; WINDSTAM; NELSON, 2008), os quais são compostos químicos que podem ser reconhecidos no solo por microrganismos benéficos (BARBOUR; HATTERMANN; STACEY, 1991; KOCH et al., 2002; COOMBS; MICHELSEN; FRANCO, 2004; NIELSEN, et al., 2005) ou patogênicos (MENTEN; BUENO, 1987; BASKIN; BASKIN, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2006). Em geral os exsudados de sementes liberados durante a germinação são compostos por açúcares como glicose, frutose, maltose, entre outros (LUGTENBERG; KRAVCHENKO; SIMONS, 1999). Nesse contexto, a atratividade química observada para *Bipolaris* sp. pode ser uma simples percepção nutritiva por parte do fungo ou até uma interação química espécie específica,

já que algumas espécies de *Eucalyptus* apresentaram maior atratividade ao fungo do que outras.

Tendo em vista a descrição de *Bipolaris* sp. como patógeno de *Eucalyptus*, o isolado CfSz foi selecionado para transformação com o gene *gfp*. Devido a ausência de relatos de transformação dessa espécie fúngica na literatura consultada foram testados diferentes parâmetros como: concentração de acetoseringona, tempo de co cultivo e tipo de membrana os quais podem alterar a eficiência dos resultados (VIJN; GOVERS, 2003; ZEILINGER, 2004; LEAL et al., 2004). No presente trabalho foi possível obter transformantes de *Bipolaris* sp. expressando o gene *gfp* somente em membrana de nylon, 48 horas de co cultivo, contrariando resultados obtidos para outros fungos filamentosos onde foi observado transformantes em diferentes parâmetros testados, incluindo papel filtro e menores tempos de co cultivo (ROMÃO, 2010). Foram observadas taxas de 100% de estabilidade mitótica em acordo com as altas taxas que tem sido relatadas em sistemas de transformação mediados por *Agrobacterium* (MARTINO et al., 2007; WANG; LI, 2008; ROMÃO, 2010). A presença do gene *gfp* foi testada por PCR e também por microscopia de fluorescência antes e após os testes de estabilidade mitótica possibilitando a confirmação da transformação. A disponibilização de linhagens transformadas de *Bipolaris* sp. pode auxiliar estudos não só com *Eucalyptus*, mas com outras culturas onde esse fungo causa doenças. Mas o mais importante, será o entendimento da patogênese deste fungo à *Eucalyptus*, visto que ainda não havia sido descrito como patógeno nesta cultura.

O uso da microscopia óptica de fluorescência nos estudos de interação entre fungos e seus hospedeiros tem sido amplamente empregada, principalmente em estudos com microrganismos endofíticos (FERREIRA et al., 2008; FÁVARO, 2009; ROMÃO, 2010; PALLU, 2010). No entanto, para estudos de interação entre fungos patogênicos e seus hospedeiros essa ferramenta é pouco utilizada (RODRIGUES, 2010). Dessa forma, a microscopia de fluorescência e as linhagens transformadas de *Bipolaris* sp. possibilitarão um melhor entendimento dos patossistemas onde este fungo está inserido, principalmente em *Eucalyptus*, onde este fungo foi descrito pela primeira vez.

No presente trabalho foi relatada a ocorrência de três patógenos ocorrendo em lesões de cancro em plantas de *Eucalyptus*. Tendo em vista que *C. fimbriata* é considerado o patógeno causador destes sintomas, essa informação tem impacto econômico direto para empresas do setor florestal, pois alguns clones comerciais com ótimas características industriais estão sendo retirados do mercado por conta da perda de resistência a *C. fimbriata*. Neste caso, a seleção de clones resistentes ao cancro deve ser redirecionada para a análise de diferentes espécies fúngicas, visto que os sintomas inicialmente sugeridos como sendo causados por *C. fimbriata*, podem na prática serem causados por diferentes espécies fúngicas. Outro ponto é a questão do manejo e tratos culturais aplicados corretamente, pois como abordado anteriormente *C. eucalypticola* pode estar presente em plantas de *Eucalyptus* e somente causar doença quando a planta passar por algum tipo de estresse biótico ou abiótico, incluindo déficit nutritivo ou hídrico. Adicionalmente, as medidas de controle são diferentes para as diferentes espécies de fungos e precisam ser devidamente ajustadas.

A correta identificação dos sintomas no campo aliada a um rigoroso trabalho de caracterização molecular dos fungos isolados de plantas sintomáticas possibilitará um melhor manejo dos patógenos associados a ocorrência de murcha e cancro em plantas de *Eucalyptus*, bem como o desenvolvimento de programas de seleção de clones resistentes ao cancro, levando em consideração a diversidade de fungos associados a estes sintomas. Além disso, foi observado que os exsudados liberados pelas sementes/plântulas podem ser fatores importante na atratividade da planta ao patógeno presente no solo, fato este que poderá permitir, caso sejam identificados os metabólitos envolvidos na atratividade, o desenvolvimento de estratégias moleculares para obtenção de clones mais resistentes no campo.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**, San Diego: Elsevier, 2004. 922 p.

ALFENAS, A.C. **Diagnose de doenças de *Eucalyptus* em viveiro e campo da Riocell**. Viçosa: UFV, 2000. 44 p. (Relatório Técnico Científico)

ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFFIA, R.G.; GONÇALVES, R.C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In. ALFENAS, A.C.; MAFIA R.G. **Métodos em fitopatologia**, Viçosa: Editora UFV, 2007. cap. 2, p. 53-90.

ALONSO, R.; TISCORNIA, S.; ALFENAS, A.C.; BETTUCCI, L. Fungi associated to bark lesions of *Eucalyptus globulus* stems in plantations from Uruguay. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, p.591-597, 2009.

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.

ALVES A.; CORREIA A.; PHILLIPS A.J.L. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 23, p. 1-15, 2006.

ANDJIC, V.; BARBER, P.A.; CARNEGIE, A.J.; PEGG, G.S.; HARDY, G.E.St.J., WINGFIELD, M.J.; BURGESS, T.I. *Kirramyces viscidus* sp. Nov., a new eucalypt pathogen from tropical Australia closely related to the serious leaf pathogen, *Kirramyces destructans*. **Australasian Plant Pathology**, London, v. 36, p. 478-487, 2007.

AUER, C.G.; KRUGNER, T.L. Cancros de *Eucalyptus grandis* em três locais do estado de São Paulo. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 28/29, p. 3-10, jan./dez. 1994.

AUER, C.G.; KRUGNER, T.L.; TOMAZELLO FILHO, M. Ocorrência de *Valsa* sp. em talhões de *Eucalyptus grandis* em condições adversas do ambiente. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 14, p. 30, 1988.

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

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.

BARBOUR, W.M.; HATTERMANN, D.R.; STACEY, G. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n.9, p. 2635-2639, 1991.

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.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds**. San Diego: Apress, 2001. 520 p.

BLOEMBERG, G.V. Microscopic analysis of plant–bacterium interactions using auto fluorescent proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.119, p. 301–309, 2007.

BRACELPA, Disponível em: < <http://www.bracelpa.org.br/bra2/index.php>>. Acesso em: 28 nov. 2010.

BRANDL, M.T.; MANDRELL, R.E. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the Cilantro phyllosphere **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3614-3621, 2002.

BUNDOCK, P.; MRÓCZER, K.; WINKLER, A.A.; STEENSMA, H.Y.; HOOYKAAS, P.J. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 261, p. 115-121, 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. (Ed.). **Microorganisms in plant conservation & biodiversity**. Amsterdam: Kluwer Academic, 2002. p. 285-306.

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

DE GROOT, M.J. de, BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.; BEIJERSBERGEN, A.G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, London, v. 16, p. 839-842, 1998.

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.

FÁVARO, L.C.L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2009. 291 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 287, p. 8-14, 2008.

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

FERREIRA, E.M.; HARRINGTON, T.C.; THORPE, D.J.; ALFENAS, A.C. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 59, p. 721–735, 2010.

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**, Brasília, v. 30, p. 543-545, 2005.

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

FERREIRA, F.A.; MAFFIA, L.A.; BARRETO, R.W.; DEMUNER, N.L.; PIGATTO, S. Sintomatologia da Murcha de *Ceratocystis fimbriata* em Eucalipto, **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, p. 155-162, 2006.

FITZGERALD, A.M.; MUDGE, A.M.; GLEAVE, A.P.; PLUMMER, K.M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 803-810, 2003.

HOOD, M.A.; Van DIJK, K.V.; NELSON, E.B. Factors affecting attachment of *Enterobacter cloacae* to germinating cotton seed. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 36, p. 101-110, 1998.

IFTIKHAR, S.; ASAD, S.; MUNIR, A.; SULTAN, A.; AHMAD, I. Hosts of *Bipolaris sorokiniana*, the major pathogen of spot blotch of wheat in Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, p. 1433-1436, 2009.

KLIEJUNAS, J.T.; TKACZ, B.M.; BURDSALL JR, H.H.; DENITTO, G.A.; EGLITIS, A.; **Pest risk assessment of the importation into the United States of unprocessed *Eucalyptus* logs and chips from South America**. Washington: USDA; Forest Service, Forest Products Laboratory, 2001. 134 p. (General Technical Report FLP-GTR-124).

KOCH, B.; NIELSEN, T.H.; SØRENSEN, D.; ANDERSEN, J.B.; CHRISTOPHERSEN, C.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; SØRENSEN, J.; NYBROE, O. Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4509–4516, 2002.

KUMAR, A.; NATH, V. *Fusarium solani* causing wilt of *Eucalyptus*. **Current Science**, Bangalore, v. 57, p. 907- 908, 1988.

LACROIX, B.; TZFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVSky, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 22, p. 29-37, 2006.

LARRAINZAR, E.; O'GARA, F.; MORRISSEY, J.P. Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p.257-277, 2005.

LEAL, C.V.; MONTES, B.A.; MESA, A.C.; RUA, A.L. CORREDOR, M.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, Abingdon, v. 42, p. 391-395, 2004.

LICHTMAN, J.W.; CONCHELLO, J.A. Fluorescence microscopy. **Nature Methods**, New York, v. 2, p. 910-919, 2005.

LUGTENBERG, B.J.J.; KRAVCHENKO, L.V.; SIMONS, M. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. **Environmental Microbiology**, London, v. 1, p. 439-446, 1999.

MARTINO, E.; MURAT, C.; VALLINO, M.; BENA, A.; PEROTTO, S.; SPANU, P. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express EGFP during ericoid endosymbiosis. **Current Genetics**, Berlin, v. 52, p. 65-75, 2007.

MARTINS, T.D. **Fungos associados às sementes de cana-de-açúcar (cariopses) no Brasil: Identificação, patogenicidade e controle**. 2006. 102 p. Dissertação (Mestrado em em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MENTEN, J.O.M.; BUENO, J.T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: SOAVE, J.; SILVA, I.V. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Corgill, 1987.

MICHIELSE, C.; HOOYKAAS, P.; VAN DEN HONDEL, C.; RAM, A. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 1-17, 2005.

MOLLER, W.J.; De VAY, J. Carrot as a species-selective isolation medium for *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 58, p. 123-124, 1968.

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.

MYBURG, H.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, B.D.; STIPES R.J.; WINGFIELD, M.J. Phylogenetic relationships of *Cryphonectria* and *Endothia* species, based on DNA sequence data and morphology. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 990-1001, 2004.

NADEAU, J.L.; PERREAULT, N.N.; NIEDERBERGER, T.D.; WHYTE, L.G.; SUN, H.J.; LEON, R. Fluorescence microscopy as a tool for *in situ* life detection. **Astrobiology**, New York, v. 8, p. 859-874, 2008.

NIELSEN, T.H.; NYBROE, O.; KOCH, B.; HANSEN, M.; SØRENSEN, J. Genes involved in cyclic lipopeptide production are important for seed and straw colonization by *Pseudomonas* sp. strain DSS73. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4112–4116, 2005.

PALLU, A.P.S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010. 129 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PEGG, G.S.; GRYZENHOUT, M.; O'DWYER, C.; DRENTH, A.; WINGFIELD, M.J. The Eucalyptus canker pathogen *Chrysosporium cubensis* discovered in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, London, v. 39, p. 343–349, 2010.

PEGG, G.S.; O'DWYER, C.; CARNEGIE, A.J.; WINGFIELD, M.J.; DRENTH, A. *Quambalaria* species associated with plantation and native eucalypts in Australia. **Plant Pathology**, London, v. 57, p. 702–714, 2008.

PHILLIPS A.J.L.; OUDEMANS P.V.; CORREIA A.; ALVES A. Characterisation and epitypification of *Botryosphaeria corticis*, the cause of blueberry cane canker. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 21, p. 141-155, 2006.

POUSSIO, G.B.; KAZMI, M.R.; AKEM, C.; FATEH, F.S. First record of *Ceratocystis fimbriata* associated with shisham (*Dalbergia sissoo*) decline in Pakistan. **Australasian Plant Disease Notes**, London, v. 5, p. 63-65, 2010.

RODRIGUES, M.B.C. **Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa***. 2010. 124 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ROMÃO, A.S. **Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* – planta hospedeira**. 2010. 268 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 827-837, 2006.

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.

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**, Berlin, v. 30, p. 175-184, 1999.

SAXENA, R.M. Seedling mortality of *Eucalyptus* spp. caused by seed mycoflora. **Indian Phytopathology**, Saint Paul, v.38, p. 151-152, 1985.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Disponível em:
<<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. 764 p.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAYLOR, K.; BARBER, P.A.; HARDY, G.E ST J.; BURGESS, T.I Botryosphaeriaceae from tuart (*Eucalyptus gomphocephala*) woodland, including descriptions of four new species. **Mycological Research**, Oxford, v. 113, p. 337-353, 2009.

VIJN, I.; GOVERS, F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 459-467, 2003.

WANG, J.; LI, H. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium gigitatum*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, Zhejiang, v. 9, p. 823-828, 2008. Abstract.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WINDSTAM, S.; NELSON, E.B. Differential Interference with *Pythium ultimum* Sporangial Activation and Germination by *Enterobacter cloacae* in the Corn and Cucumber Spherospheres. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 4285–4291, 2008.

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

YUAN, Z.Q.; OLD, K.M.; MIDGLEY, S.J.; SOLOMON, D. Mycoflora and pathogenicity of fungi present on stored seeds from provenances of *Eucalyptus pellita*. **Australasian Plant Pathology**, London, v. 26, p. 195-202, 1997.

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

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current Genetics**, Berlin, v. 45, p. 54-60, 2004.

4 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E DO RIZOPLANO DE *Eucalyptus* COM POTENCIAL NO CONTROLE BIOLÓGICO DE MURCHA E CANCRO

Resumo

Em *Eucalyptus* a diversidade e densidade bacteriana associada mudam de acordo com o tecido vegetal estudado e com o estágio fenológico das plantas. Dentre os microrganismos observados em associação com *Eucalyptus* podem ser citados os endófitos que colonizam o interior das plantas e os microrganismos do rizoplane que colonizam a superfície das raízes. Esses microrganismos podem conferir algumas características benéficas às plantas durante a interação, inclusive aumento da resistência contra patógenos. Atualmente um dos principais problemas de *Eucalyptus* é o cancro ou murcha causada por *Ceratocystis fimbriata*. No entanto no capítulo anterior foi demonstrado que *Bipolaris* sp. é um novo patógeno que pode atacar essa cultura. Dessa forma, no presente trabalho foi avaliado a diversidade e o potencial antagonico de bactérias associadas a *Eucalyptus* sp. contra os fungos *C. Fimbriata* (Agn 7) e *Bipolaris* sp. (CfSz). Foram testadas bactérias do rizoplane e endofíticas de sementes e raízes de *Eucalyptus*, as quais foram posteriormente identificadas por seqüenciamento do gene 16S RNAr. Foram identificados 41 isolados bacterianos com capacidade de controlar o isolado Agn7 de *C. fimbriata*, 8,2% do total de isolados testados. Os isolados com potencial antagonico a *Ceratocystis fimbriata* pertencem a *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus* sp., *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia* sp., *Microbacterium azadirachtae*, *Rahnella* sp., *Staphylococcus* sp. e *Stenotrophomonas* sp.. Quando esses isolados foram testados contra *Bipolaris* sp. somente para *Bacillus pumilus* e *Staphylococcus* sp. não foi possível observar capacidade de controlar o patógeno. As demais oito espécies foram capazes de controlar os dois patógenos (*C. fimbriata* e *Bipolaris* sp.). Foi observado também diferenças entre os locais de isolamento, visto que o rizoplane apresentou maior número de isolados (80,5%) capazes de inibir o patógeno seguido por endofíticos de raiz (14,6%) e de sementes (4,9%). Ainda, este estudo mostrou que bactérias associadas as sementes de *Eucalyptus* apresentam capacidade de controlar *C. fimbriata* e *Bipolaris* sp. que apresentam atividade química a exsudatos de plântulas e sementes dessa espécie. Adicionalmente ao potencial para uso no controle biológico do cancro e da murcha de *Eucalyptus* as bactérias de sementes aqui relatadas podem ter papel importante de proteção das plantas no campo. Futuros estudos devem ser direcionados para identificação de genes associados a essa inibição, bem com análise dos fatores responsáveis por este controle biológico no campo.

Palavras-chave: *Ceratocystis fimbriata*; *Bipolaris* sp.; Antagonismo; 16S RNAr

Abstract

In *Eucalyptus* the diversity and density of associated bacteria may change according to plant tissue and plant growth stage. Among the microbial communities associated to *Eucalyptus* tree, the endophytes and rhizoplane microorganisms may present a mutualistic interaction with the host plant, resulting in beneficial effect, such as increased resistance against pathogens and growth promotion. Currently one of the main problems of *Eucalyptus* is cancer or wilt, which may be caused by *Ceratocystis fimbriata* and as previously shown in this study, *Bipolaris* sp. Thus, in the present study

we evaluated the diversity of bacterial community associated to *Eucalyptus* and the ability of these bacteria to inhibit the phytopathogens *C. fimbriata* (Agn 7) and *Bipolaris* sp. (CfSz). We identified and tested 450 rhizoplane and endophytic bacteria from seeds and roots of *Eucalyptus* spp. Forty one isolates (8.2%) were able to inhibit *C. fimbriata* (Agn7). These 41 isolates were identified as *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus* sp., *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia* sp., *Microbacterium azadirachtae*, *Rahnella* sp., *Staphylococcus* sp. and *Stenotrophomonas* sp. Among this 41 isolates, only *B. pumilus* and *Staphylococcus* sp. were not able to inhibit *Bipolaris* sp. We also observed differences between the isolation site, since the rhizoplane showed a larger number of isolates (80.5%) able to inhibit the evaluated fungi, while root (14.6%) and seeds (4.9%) endophytic communities were less effective to inhibit the fungi. Although, the frequency of bacteria to inhibit the pathogenic fungi was low in seed, the improvement of these bacteria could drive a strategy to protect seedling in field condition. Future studies should be directed to identify genes associated to this inhibition, as well as analysis of the environmental factors associated to this biological control in the field conditions.

Keywords: *Ceratocystis fimbriata*; *Bipolaris* sp.; Antagonism; 16S rRNA

4.1 Introdução

A colonização por microrganismos em geral 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). Em *Eucalyptus* a diversidade e densidade bacteriana associada mudam de acordo com o tecido vegetal estudado e com o estágio fenológico das plantas (FERREIRA, 2008; PROCÓPIO et al., 2009). Dentre os microrganismos observados em associação com *Eucalyptus* podem ser citados os endófitos, os quais são 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; MENDES et al., 2007). Além dos endófitos os microrganismos que colonizam a superfície das raízes (rizoplane) também possuem papel fundamental no estabelecimento, crescimento e proteção das plantas às quais estão associados (WELLER, et al., 2002; KAVROULAKIS et al., 2007; WELLER, 2007; CHANDEL; ALLAN; WOODWARD, 2010).

Algumas características benéficas podem ser conferidas à planta hospedeira pelo microrganismo associado. Dentre estas, destaca-se a maior resistência em ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos ou abióticos (SAIKKONEN

et al., 1998; CLAY; SCHARDL, 2002; DERAM et al., 2008). Também, em alguns casos a interação induz a germinação de sementes (HOLLAND, 1997; FREYERMUTH; LONG; MATHUR, 1996), o aumento do crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; PARK et al, 2005; TSAVKELOVA et al., 2007; QUECINE, 2010) e aumento da resistência contra patógenos (RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007; WELLER, 2007; ISLAM, 2010).

Os microrganismos endofíticos e do rizoplane são capazes de penetrar ou colonizar a planta hospedeira de forma sistêmica ou localizada (QUADT-HALLMANN; HALLMANN; KLOPPER, 1997), e por ocuparem o mesmo nicho que os fitopatógenos, apresentam potencial como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997; RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007). Este controle biológico pode ocorrer principalmente devido a atuação direta sobre o patógeno (PAN et al., 1997), por competição (MARI; GUIZZARDI; PRATELLA, 1996) ou por antagonismo (ALTINDAG et al., 2006; KOZDRÓJ; TREVORS; van ELSAS, 2004). Ferreira, (2008) observaram a ocorrência de gêneros bacterianos associados a raízes de *Eucalyptus*, os quais são considerados importantes na proteção de plantas como é o caso de *Pseudomonas* (NAGARAJKUMAR; BHASKARAN; VELAZHAHAN, 2004; MIKANI et al, 2007), *Rhanelia* (CALVO et al, 2007; HASSNI et al, 2007) e *Bacillus* (SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007). Adicionalmente, *Pseudomonas* e *Rhanelia* foram observadas exclusivamente associadas a raízes de plantas de *Eucalyptus* com menor incidência de *Ceratocystis fimbriata* no campo (FERREIRA, 2008).

Dentre os principais patógenos de *Eucalyptus* é possível citar os causadores de cancro e murcha nas plantas (ZAUZA et al., 2004; ROUX et al., 2004 FERREIRA et al., 2006; VAN WYK et al., 2009). *Ceratocystis fimbriata* é considerado um dos mais importantes para eucaliptocultura e atualmente e tem sido responsável pela quebra de resistência de muitos clones anteriormente descrito como resistentes ao cancro (FERREIRA et al., 2006; GONZÁLES; ODA¹). A quebra de resistência desses clones com ótimas características industriais implica na sua não utilização comercial e conseqüente prejuízo econômico para empresas e agricultores do setor florestal. No

¹ GONZALES, E.R.; ODA, S. Suzano Papel e Celulose.

entanto, como abordado e demonstrado no capítulo anterior (desta tese) alguns cuidados são necessários, já que, sintomas semelhantes no campo podem ser causados também por *Botryosphaeria*, *Cytospora* e *Bipolaris*, além das semelhanças na morfologia de colônias e estruturas reprodutivas utilizadas para caracterizações morfológicas (AUER; KRUGNER, 1994; MYBURG et al., 2004; BAKER; HARRINGTON, 2004; ALONSO et al., 2009; PEGG et al., 2010).

A ocorrência dessas espécies bacterianas com diferentes características benéficas pode estar relacionada com a sobrevivência de plantas sob diferentes condições ambientais auxiliando na resistência contra patógenos. No entanto, os mecanismos de atuação devem ser explorados para um melhor conhecimento e confirmação desta interação, inclusive indicando bactérias potenciais para uso no controle biológico de doenças emergentes como a murcha e o cancro. Dessa forma, no presente trabalho foi avaliado a diversidade e potencial antagônico de bactérias associadas a *Eucalyptus* sp. contra os fungos *C. fimbriata* (Agn 7) e *Bipolaris* sp. (CfSz). Assim, os objetivos deste estudo foram: (i) testar o potencial antagônico de bactérias do rizoplane e endofíticas de sementes e raízes de *Eucalyptus* contra *C. fimbriata* e *Bipolaris* sp. (ii) identificar os microrganismos antagônicos por seqüenciamento parcial do gene 16S RNAr.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Isolados Bacterianos

Foram utilizados cerca de 45 isolados de bactérias endofíticas obtidos de sementes de *Eucalyptus* (*Eucalyptus citriodora*; *E. urophylla* e *E. grandis* x *globulos*) obtidas nesse trabalho (capítulo 2). Além disso, foi utilizada parte de uma coleção de bactérias do rizoplane e endofíticas de raiz com cerca de 450 isolados obtidos de plantas de *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) (FERREIRA, 2008).

4.2.2 Seleção de isolados com ação antifúngica

No presente estudo foram utilizados os isolados fúngicos Agn 7 (*Ceratocytis fimbriata*) e CfSz (*Bipolaris* sp.). Os isolados fúngicos foram cultivados e mantidos em meio de cultivo BDA (Difco). A atividade antagonista dos isolados bacterianos foi primeiramente avaliada contra *C. fimbriata* por ser essa uma das principais espécies causadoras de murcha e cancro em *Eucalyptus*. Posteriormente, os isolados bacterianos que apresentaram antagonismo contra *C. fimbriata* foram avaliados contra *Bipolaris* sp. por ser essa uma nova espécie causadora de doença em *Eucalyptus*. As avaliações foram realizadas utilizando o método de cultura pareada, o qual consiste no confronto direto, em meio sólido, do antagonista (endófitos) e do fungo fitopatogênico (MARIANO, 1993). Para tanto os isolados bacterianos foram inoculados sobre meio de cultura BDA (Difco) a 28°C por 2 dias. Posteriormente, o isolado fúngico foi inoculado na margem oposta da placa de Petri seguido de incubação por 20 dias. Nas placas controle foi inoculado somente o fungo. Após o cultivo, a presença de zonas de inibição entre as culturas pareadas e o crescimento radial do fitopatógeno em relação ao controle indicou a inibição do patógeno pela bactéria. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

4.2.3 Identificação molecular das bactérias

O 16S DNAr foi amplificado diretamente de colônias bacterianas sem extração de DNA. As colônias de interesse foram crescidas em meio de cultura TSA 10% e transferidas para tubo contendo 200 µL de água deionizada ultra-pura esterilizada. Esta suspensão foi utilizada como fonte de DNA para realização da PCR juntamente com os iniciadores 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, 10 mM 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 e uma extensão final de 72°C por 7 min. O produto da PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), corado com brometo de etídio e observado sobre luz ultravioleta. Posteriormente, o produto da PCR foram purificados com polietilenoglicol (polietilenoglicol 8000 20%; NaCl 2,5 mM) e seqüenciados parcialmente (Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo) utilizando o iniciador 1387R. As seqüências obtidas foram comparadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997) contra a base de dados do GenBank. Após a comparação com a base de dados as seqüências foram utilizadas para alinhamento e análise filogenética no programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007).

4.3 Resultados

4.3.1 Bactérias com ação antifúngica e identificação molecular

Foi avaliado o potencial antifúngico de aproximadamente 500 isolados bacterianos de *Eucalyptus* contra os fungos *Ceratocystis fimbriata* (Agn 7) e *Bipolaris* sp. (CfSz). A metodologia da cultura pareada (MARIANO, 1993) possibilitou a avaliar os isolados bacterianos e selecionar 41 isolados (8,2%) com ação inibitória a *C. fimbriata* (Figura 4.1; Tabela 4.2). Os 41 isolados bacterianos capazes de controlar *C. fimbriata* foram identificados por meio do seqüenciamento parcial do gene 16S RNAr. Foi observado que os isolados bacterianos que apresentam antagonismo a *C. fimbriata* pertencem a *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus* sp., *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia* sp., *Microbacterium azadirachtae*, *Rahnella* sp., *Staphylococcus* sp. e *Stenotrophomonas* sp. (Tabela 4.1). Estes 41 isolados foram então testados contra o fungo *Bipolaris* sp. onde 24 desses apresentaram capacidade antagonica (Tabela 4.2). Os demais 17 isolados foram considerados como não testados por problemas no experimento. Assim, foi observado que os isolados bacterianos que apresentam antagonismo a *Bipolaris* sp. pertencem a *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus* sp., *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia* sp., *Microbacterium*

azadirachtae, *Rahnella* sp., e *Stenotrophomonas* sp. (Tabela 4.2). Oito espécies foram capazes de inibir os dois patógenos (*C. fimbriata* e *Bipolaris* sp.) (Tabela 4.2).

Figura 4.1 – Foto de placas de Petri contendo meio de cultura BDA onde foram inoculados isolados bacterianos em uma das margens e o fungo *Ceratocystis fimbriata* na outra. A - exemplo de um isolado bacteriano com capacidade de inibir o fungo *C. fimbriata*; B – exemplo de um isolado bacteriano sem a capacidade de inibir o fungo *C. fimbriata*

Tabela 4.1 - Identificação de bactérias isoladas do rizoplasma, endofíticas de raízes e de sementes de *Eucalyptus*. A identificação molecular das espécies foi realizada por seqüenciamento parcial do 16S rDNA e análises de comparação no BLASTn (*National Center for Biotechnology Information website*)

Origem*	Classe	Espécie (Blast-NCBI)	%**	Linhagem de referência
Endofítico de raiz	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ149694.1
Endofítico de raiz	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ149694.1
Endofítico de raiz	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	HQ149694.1
Endofítico de semente	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ149694.1
Endofítico de semente	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ149694.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	FR687210.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	95%	FJ620574.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ149694.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ141585.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	HQ149631.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	HM469385.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	FR687211.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	FR687211.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	FR687211.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus agri</i>	100%	HQ166189.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus agri</i>	99%	HQ166189.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus agri</i>	100%	HQ166189.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus agri</i>	100%	HQ166189.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus agri</i>	100%	HQ166189.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus agri</i>	100%	HQ166188.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus agri</i>	100%	HM355618.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus agri</i>	100%	HQ166189.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus agri</i>	100%	HM355618.1
Rizoplasma	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	99%	AB576890.1
Rizoplasma	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium azadirachtae</i>	100%	EU912487.1
Rizoplasma	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium azadirachtae</i>	99%	EU912487.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	100%	FJ232612.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	100%	GQ468397.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	100%	GQ468397.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	100%	GQ468397.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	100%	GQ468397.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	100%	GQ468397.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	100%	GQ468397.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	99%	GQ468397.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	95%	GU479034.1
Rizoplasma	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	100%	GQ468397.1
Endofítico de raiz	<i>Gamaproteobacteria</i>	<i>Rahnella</i> sp.	100%	FN547805.1
Endofítico de raiz	<i>Gamaproteobacteria</i>	<i>Rahnella</i> sp.	99%	GQ148970.1
Endofítico de raiz	<i>Gamaproteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	100%	HM748087.1

*Local de onde as bactérias foram isoladas. **Similaridade com a linhagem de referência

Tabela 4.2 – Espécies bacterianas isoladas do rizoplano, endofíticas de raízes e de sementes de *Eucalyptus* com ação antagonista a *Ceratocystis fimbriata* e *Bipolaris* sp.

Origem*	Espécie (Blast-NCBI)	Isolados fúngicos	
		<i>Ceratocystis fimbriata</i>	<i>Bipolaris</i> sp.
Endofítico de raiz	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Endofítico de raiz	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Endofítico de raiz	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Endofítico de semente	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Endofítico de semente	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Rizoplano	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Rizoplano	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Rizoplano	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Rizoplano	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Rizoplano	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
Rizoplano	<i>Bacillus subtilis</i>	+	nt***
Rizoplano	<i>Bacillus pumilus</i>	+	nt
Rizoplano	<i>Bacillus pumilus</i>	+	nt
Rizoplano	<i>Bacillus pumilus</i>	+	nt
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	+
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	nt
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	+
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	+
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	+
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	nt
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	nt
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	nt
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	+
Rizoplano	<i>Brevibacillus agri</i>	+	+
Rizoplano	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	nt
Rizoplano	<i>Microbacterium azadirachtae</i>	+	+
Rizoplano	<i>Microbacterium azadirachtae</i>	+	+
Rizoplano	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	+	+
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	nt
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	nt
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	+
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	nt
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	nt
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	+
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	+
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	nt
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	nt
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	nt
Rizoplano	<i>Burkholderia</i> sp.	+	nt
Endofítico de raiz	<i>Rahnella</i> sp.	+	nt
Endofítico de raiz	<i>Rahnella</i> sp.	+	+
Endofítico de raiz	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	+	+

* Local de onde as bactérias foram isoladas. ** Antagonismo positivo contra o fungo de referência. *** Não testado

Os isolados bacterianos identificados como antagonistas variaram em quantidades de acordo com o local de origem do isolamento. Em relação à capacidade de inibir o patógeno avaliado, a maior frequência foi observada no rizoplano (80,5%), seguido pelo interior de raízes (14,6%) e de sementes (4,9%) (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Número de isolados bacterianos identificados com capacidade de inibir o fungo *C. fimbriata* obtido dos diferentes origens (loais) de isolamento nas plantas de *Eucalyptus*

4.4 Discussão

Controle biológico consiste no uso de microrganismos selvagens ou geneticamente modificados para reduzir os efeitos de patógenos sobre as plantas de interesse (RESEARCH BRIEFINGS, 1987; OWNLEY; WINDHAM, 2008). No presente trabalho foi avaliada a diversidade de bactérias associadas a *Eucalyptus* com potencial para a inibição de *Ceratocystis fimbriata* e *Bipolaris* sp. Nenhum tipo de seleção ou modificação genética foi empregada com objetivo de potencializar características pré-existentes nesses microrganismos. Segundo Ownley e Windham (2008) o antagonismo é o mecanismo geral que os microrganismos agentes de controle biológico usam para reduzir a sobrevivência do patógeno causador de doença na planta. No presente estudo, foram consideradas bactérias antagonicas a *C. fimbriata* e *Bipolaris* sp. somente aquelas que apresentavam antibiose ao fungos, ou seja, liberavam metabólitos inibidores no meio de cultura. Os outros dois aspectos do antagonismo, competição e parasitismo, não foram considerados no presente estudo, visto que no campo espera-se

que exista competição destes organismos (bactérias X fungos patogênicos) durante a colonização da planta hospedeira.

As bactérias associadas as plantas podem utilizar ainda múltiplas estratégias de antagonismo culminando com menor incidência do patógeno, como por exemplo, produção de antibióticos e indução de resistência sistêmica (MADHAIYAN et al., 2004; PARK et al, 2005; TSAVKELOVA et al., 2007; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007). Os gêneros bacterianos *Bacillus* e *Burkholderia*, os quais apresentaram maior número de isolados com potencial antagônico, são amplamente descritos como potenciais para uso no controle biológico de fungos patogênicos (RYU et al., 2006; KARLIDAG et al., 2007). No entanto, os gêneros *Rahnella* e *Stenotrophomonas*, também já foram descritos como potenciais agentes de controle biológico (KOBAYASHI et al., 2002; HASSNI et al, 2007; CALVO et al., 2010; BERG et al., 2010).

Alguns desses gêneros bacterianos haviam sido isolados, em trabalho anterior, de plantas com menor incidência de *C. fimbriata* no campo (FERREIRA, 2008). Na oportunidade os autores sugeriram uma possível relação entre a ocorrência de *Rhanella* e *Pseudomonas* com a menor incidência da doença. No presente estudo *Pseudomonas* não foi observada como antagônica a *C. fimbriata* sugerindo que se esta bactéria está associada ao controle deste patógeno no campo, isso se deve a outros mecanismos tais como indução de resistência sistêmica e exclusão de nicho. Os demais gêneros bacterianos antagônicos observados no presente trabalho foram detectados nas plantas de *Eucalyptus* independentemente da incidência de *C. fimbriata* (FERREIRA, 2008), sugerindo que no campo, poderiam ocupar nichos diferentes e que em condições normais não competem durante a colonização da planta hospedeira.

O uso de microrganismos no controle biológico de patógenos pode apresentar alguns problemas, principalmente relacionados a manutenção da performance desempenhada *in vitro* em experimentos e condições reais de campo (OWNLEY; WINDHAM, 2008). Segundo esses autores muitos fatores podem estar envolvidos com essa diferença de comportamento, dos quais podem ser destacados genótipo da planta, práticas culturais e eventos bióticos em geral. Vale lembrar que as bactérias aqui identificadas com potencial antagônico a *C. fimbriata* e *Bipolaris* sp. são oriundas de

uma coleção obtida de plantas de *Eucalyptus*. Dessa forma, é provável que ocorra redução dos problemas de interação a planta hospedeira, embora a competição com outros microrganismos possa atuar negativamente no controle biológico.

Além disso, os gêneros bacterianos anteriormente citados apresentam capacidade antagônica a *Bipolaris* sp., o qual foi descrito no capítulo 3 do presente trabalho como um possível novo patógeno causador de cancro e murcha em *Eucalyptus*. Nesse contexto, os resultados de antagonismo observados no presente trabalho são de grande importância, visto que apresenta possíveis ferramentas de controle biológico para dois importantes patógenos de *Eucalyptus*. *C. fimbriata* e *Bipolaris* sp..

Além do potencial para uso no controle biológico de *C. fimbriata* e *Bipolaris* sp. outra alternativa é o uso desses isolados bacterianos nos estudos de busca e identificação de genes relacionados a produção de compostos antagônicos. Futuros estudos devem focar em testes de validação do potencial desses microrganismos no campo e também no uso de tecnologias baseadas em mutação aleatória para busca e identificação de genes associados ao controle de *C. fimbriata* e *Bipolaris* sp.. Além disso, os mecanismos de interação devem ser mais bem entendidos para que possa de fato permitir a sua utilização em condições de campo.

Referências

- ALONSO, R.; TISCORNIA, S.; ALFENAS, A.C.; BETTUCCI, L. Fungi associated to bark lesions of *Eucalyptus globulus* stems in plantations from Uruguay. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, p.591-597, 2009.
- 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.
- AUER, C.G.; KRUGNER, T.L. Cancros de *Eucalyptus grandis* em três locais do estado de São Paulo. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 28/29, p.3-10, jan./dez. 1994.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. p. 189-207.

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

BERG, G.; EGAMBERDIEVA, D.; LUGTENBERG, B.; HAGEMANN, M. Symbiotic Plant–Microbe Interactions: Stress Protection, Plant Growth Promotion, and Biocontrol by *Stenotrophomonas*. **Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**, Oregon, v. 17, p. 445-460, 2010.

CALVO, J.; CALVENTE, V.; ORELLANO, M.E.; BENUZZI, D.; SANZ, M.I. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple fruit by mixtures of bacteria and yeast. **Food Bioprocess Technology**, Oakland, v. 3, p. 644-650, 2010.

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.

CHANDEL, S., ALLAN, E. J. WOODWARD, S. Biological Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on Tomato by *Brevibacillus brevis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, p. 470–478, 2010.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, Chicago, v. 160, p. 99-127, 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.

FERREIRA, A. **Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplane com *Eucalyptus***. 2008. 77 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FERREIRA, F.A.; MAFIA, L.A.; BARRETO, R.W.; DEMUNER, N.L.; PIGATTO, S. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, p. 155-162, 2006.

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

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.

HASSNI, M.E.; HADRAMI, A.E.; DAAYF, F.; CHÉRIF, M.; BARKA, E.A.; HADRAMI, I.E. Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 59, p. 224–234, 2007.

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

KAVROULAKIS, N.; NTOUGIAS, S.; ZERVAKIS, G.I.; EHALIOTIS, C.; HARALAMPIDIS, K.; PAPADOPOULOU, K. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 29, p. 1-12, 2007.

KOBAYASHI, D.Y.; REEDY, R.M.; BICK, J.A.; OUDEMANS, P.V. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1047-1054, 2002.

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.

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.

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.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 369-409, 1993.

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.

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, v. 48, p. 107-112, 2007.

MYBURG, H.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, B.D.; STIPES R.J.; WINGFIELD, M.J. Phylogenetic relationships of *Cryphonectria* and *Endothia* species, based on DNA sequence data and morphology. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 990-1001, 2004.

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.

OWNLEY, B.H.; WINDHAM, M.T. Biological control of plant pathogens. In. TRIGIANO R.N., WINDHAM, M.T.; WINDHAM, A. S. **Plant pathology – concepts and laboratory exercises**. London: CRC Press, cap. 37, p. 423-435. 2008.

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**, 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.

PEGG, G.S.; GRYZENHOUT, M.; O'DWYER, C.; DRENTHE, A.; WINGFIELD, M.J. The Eucalyptus canker pathogen *Chrysosporium cubensis* discovered in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, London, v. 39, p. 343-349, 2010.

PROCÓPIO, R.E.L.; MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, p. 1408-1422, 2009.

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.

QUECINE, M.C. **Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp., L.)**. 2010. 196 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RESEARCH BRIEFINGS. **Report of the Research Briefing panel on biological control in managed ecosystems**. Washington: National Academy Press, 1987.

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.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.L.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 319–343, 1998.

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

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.

VAN WYK, M.; WINGFIELD, B.D.; MOHALI, S.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis fimbriatimima*, a new species in the *C. fimbriata sensu lato* complex isolated from *Eucalyptus* trees in Venezuela. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 34, p. 175-185, 2009.

WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; McSPADDEN GARDENER, B.B.; THOMASHOW, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309-348, 2002.

WELLER, D.M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years, **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 250-256, 2007.

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

5 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 fitopatógenos causadores da murcha e cancro nessa espécie. Adicionalmente, foi avaliada a colonização de sementes de três espécies de *Eucalyptus* e a diversidade de bactérias endofíticas, bem como os efeitos da germinação sobre essa comunidade.

No capítulo 2, os resultados das análises, dependentes do cultivo, da diversidade das comunidades bacterianas acessada por isolamentos e sequenciamentos mostraram que o híbrido *Eucalyptus globulus* x *grandis* possui maior diversidade de bactérias endofíticas nas sementes. As análises de diversidade bacteriana por DGGE associada aos isolamentos mostraram que a germinação interfere positivamente na comunidade de bactérias endofíticas presentes nas sementes. Foi observado também que as bactérias endofíticas de sementes colonizam preferencialmente os espaços intercelulares durante a germinação. Alguns dos grupos bacterianos observados como endofíticos nas sementes de *Eucalyptus* são descritos na literatura como potenciais controladores biológicos de fungos.

No capítulo 3, foi observado que além do principal fungo causador de murcha e cancro em *Eucalyptus* (*C. fimbriata*) outros fungos patogênicos causadores desses estão ocorrendo em florestas brasileiras. Esses fungos são *Cytospora eucalypticola* e *Bipolaris* sp., sendo que esse último nunca havia sido descrito como patógeno de *Eucalyptus* sp.. *Bipolaris* sp. também apresentou quimiotaxia para sementes e plântulas de *Eucalyptus* sp.. Além de relatar *Bipolaris* sp., como um possível novo patógeno de *Eucalyptus* sp. foi possível obter isolados geneticamente modificados desse fungo, expressando o gene *gfp*. Esses isolados são de grande importância na condução de novos experimentos relacionados a patogenicidade desse fungo para *Eucalyptus* sp., bem como para outras espécies vegetais atacadas por ele.

No capítulo 4, os resultados das análises de antagonismo possibilitaram a obtenção de isolados bacterianos, de diferentes espécies, capazes de controlar *C. fimbriata*. Além de *C. fimbriata* algumas espécies bacterianas controlam também o fungo *Bipolaris* sp.. Esse resultado é importante por que esses isolados são potenciais

para uso no controle biológico tanto de um importante patógeno de *Eucalyptus* como é o caso de *C. fimbriata*, como do possível novo patógeno *Bipolaris* sp.. Vale lembrar que bactérias endofíticas de sementes também apresentaram capacidade antagonica a *Bipolaris* sp. que por sua vez é atraído quimicamente por sementes. Assim, essas bactérias endofíticas podem ter importante papel na proteção das sementes plântulas no campo.

Concluindo, o presente trabalho mostra que a comunidade bacteriana associada *Eucalyptus* pode ter importante papel na proteção contra os fungos causadores de murcha e cancro. Além disso, algumas bactérias presentes nas sementes podem aumentar a chance de desenvolvimento da planta de *Eucalyptus* no campo.