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

**Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do
guaranazeiro e o controle da antracnose**

Maria Letícia Bonatelli

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

**Piracicaba
2012**

Maria Letícia Bonatelli
Licenciada em Ciências Biológicas

Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose

Orientador:
Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

Piracicaba
2012

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

Bonatelli, Maria Letícia

Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose / Maria Letícia Bonatelli.- - Piracicaba, 2012.
83 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Antracnose 2. Bactérias 3. Biocontrole 4. Diversidade 5. Guaraná 6. Sequência do DNA I. Título

CDD 633.88328
B699b

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

Dedico

Ao meu pai Renato (*in memorium*) pela grande inspiração!

Ofereço

À minha querida mãe Mirian, pelos conselhos,
amor e paciência durante o meu mestrado!
Aos meus irmãos Guilherme e Gabriel pela eterna parceria!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela confiança, orientação e amizade durante o encaminhamento do mestrado;

À Prof^a. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pela atenção, ajuda e conselhos no convívio quase que diário;

À Dra. Maria Carolina Quecine pela ajuda durante o desenvolvimento da dissertação. Querida, sua participação no meu projeto foi fundamental!

Aos colegas de laboratório, em especial a Bruna e a Sarina pela jornada rumo ao desconhecido mundo dos microrganismos do guaranazeiro, a ajuda e presença de vocês foram essenciais! Aos demais colegas de convivência diária um muito obrigada pelos conselhos, ensinamentos e conversas;

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pelos inúmeros conselhos sobre diversidade;

Ao pessoal da UFAM e da AMBEV/Maués pelo suporte durante a coleta;

Ao Prof. Dr. Márcio Lambais e seus alunos pelo tempo cedido na realização de procedimentos no seu laboratório;

Aos demais que, de alguma forma, colaboraram com o trabalho, podem ter certeza de que sua ajuda não foi esquecida nem desvalorizada!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (proc: 2010/14382-4) pelo apoio financeiro.

“Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo,
no convertir en realidad tus sueños.”

Queda Prohibido,
Pablo Neruda

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica.....	17
2.1.1 O Guaraná.....	17
2.1.2 A antracnose no guaranazeiro.....	18
2.1.3 Microrganismos epifíticos.....	19
2.1.4 Microrganismos endofíticos.....	20
2.1.5 Estudos da diversidade microbiana.....	22
2.2 Material e Métodos.....	23
2.2.1 Material vegetal e local de coleta.....	23
2.2.2 Estudo da diversidade bacteriana.....	24
2.2.2.1 Diversidade bacteriana dependente de cultivo.....	24
2.2.2.1.1 Isolamento das bactérias epifíticas.....	24
2.2.2.1.2 Isolamento das bactérias endofíticas.....	24
2.2.2.1.3 Purificação e estocagem dos isolados bacterianos.....	25
2.2.2.1.4 Extração de DNA das bactérias associadas à folha do guaranazeiro	25
2.2.2.1.5 Amplificação do gene 16S rDNA e sequenciamento.....	25
2.2.2.1.6 Classificação taxonômica dos isolados bacterianos.....	26
2.2.2.1.7 Análises estatísticas baseadas nas UTOs: rarefação, Chao1, Ace e cobertura.....	27
2.2.2.1.8 Análise de Multivariada.....	27
2.2.2.2 Estudo da comunidade bacteriana independente de cultivo.....	27
2.2.2.2.1 Extração de DNA das folhas.....	27
2.2.2.2.2 Sequenciamento do gene 16S DNAr via Pirosequenciamento.....	28
2.2.2.2.3 Classificação taxonômica, alinhamento e formação das unidades taxonômicas dos fragmentos do gene 16S rDNA.....	28
2.2.2.2.4 Análises estatísticas baseadas nas UTOs: rarefação, Chao1, Ace e cobertura.....	28
2.2.3 Potencial de biocontrole e biotecnológico dos isolados bacterianos.....	29
2.2.3.1 Ensaio de antagonismo.....	29

2.2.3.2 Produção de enzimas hidrolíticas.....;	30
2.2.3.2.1 Atividade aminolítica	30
2.2.3.2.2 Atividade celulolítica.....	31
2.2.3.2.3 Atividade lipolítica.....	31
2.2.3.2.4 Atividade esterásica.....	31
2.2.3.2.5 Atividade proteolítica.....	31
2.2.3.2.6 Atividade pectinolítica.....	31
2.2.3.3 Produção de sideróforos	32
2.2.3.4 Análises estatísticas.....	32
2.3 Resultados.....	32
2.3.1 Estudo da comunidade dependente de cultivo.....	32
2.3.1.1 Isolamento de bactérias endofíticas e epifíticas da folha do guaranazeiro.....	32
2.3.1.2 Composição da comunidade bacteriana e classificação taxonômica.....	33
2.3.1.3 Correlação dos gêneros com o tecido e o estado fisiológico	34
2.3.1.4 Diversidade, riqueza e rarefação.....	37
2.3.2 Estudo da comunidade bacteriana independente de cultivo.....	39
2.3.2.1 Composição da comunidade bacteriana e classificação taxonômica.....	39
2.3.2.2 Correlação dos filos e gêneros com os estados fisiológicos.....	40
2.3.2.3 Diversidade, riqueza e rarefação.....	44
2.3.2.4 Análise das sequências não classificadas.....	45
2.3.4.5 Comparação entre os dados das bactérias dependente de cultivos e independentes.....	46
2.3.3 Ensaio de antagonismo.....	47
2.3.4 Produção de enzimas hidrolíticas e sideróforos.....	51
2.4 Discussão.....	54
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	81

RESUMO

Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose

O guaraná, *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, espécie nativa do Brasil é uma cultura de relevância para o país, principalmente nos estados da Bahia e Amazonas. O fruto contém substâncias estimulantes, como a cafeína, que conferem ao guaraná um grande potencial exploratório, visto que esta é uma das substâncias estimulantes mais consumidas no mundo. Apesar de sua importância, a cultura do guaraná é pouco estudada, portanto pouco se sabe sobre sua genética e as interações microbianas existentes, tanto em relação aos microrganismos endofíticos e epifíticos, quanto em relação aos patógenos. De tal forma que a cultura do guaraná na região Amazônica vem sendo afetada por condições fitossanitárias desfavoráveis, como a presença do fungo do gênero *Colletotrichum*, causador da antracnose, doença considerada uma ameaça à produção comercial do guaraná. Assim, visando compreender a dinâmica envolvida na interação planta - microrganismos e o possível controle da antracnose, o presente trabalho acessou a comunidade bacteriana associada às folhas com e sem sintomas de antracnose, de forma independente e dependente de cultivo; bem como, investigou o potencial biotecnológico e de biocontrole dos isolados bacterianos. A comunidade bacteriana acessada de forma dependente e independente de cultivo apresentaram similaridades, como maior valor de riqueza e menor diversidade bacteriana em folhas assintomáticas, quando comparadas com folhas sintomáticas, e com relação ao filo *Proteobacteria*, mais abundantemente acessado nas duas comunidades. Comparações realizadas com isolados bacterianos acessados epi e endofiticamente de folhas com e sem sintoma da antracnose apontaram que o aparecimento da doença antracnose na folha pareceu ser o fator que mais influenciou na estrutura da comunidade bacteriana. Com relação às diferenças entre tecidos sintomáticos e assintomáticos, foi possível identificar alguns gêneros abundantes mais frequentemente acessados em plantas sintomáticas, sendo que os gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Pantoea* foram acessados em grande frequência tanto de forma dependente como independente de cultivo. Porém, de forma independente de cultivo foram acessados outros táxons abundantes que diferiram significativamente entre as plantas, sendo que folhas sintomáticas apresentaram *Acinetobacter*, *Acidobacter_GPI* e *Sphingobacteria*, e em folhas assintomáticas foram acessados os táxons *Methylobacterium*, *Beijerinckia*, *Bacilli* e um grupo de *Rhizobiales* não classificados. Além disto, os microrganismos endofíticos e epifíticos cultivados foram testados com o fitopatógeno *Colletotrichum* sp. em ensaios de antagonismos, sendo que isolados do gênero *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, entre outros, apresentaram inibição do crescimento do fungo fitopatogênico. As bactérias cultivadas ainda foram testadas quanto ao potencial biotecnológico de produção de enzimas hidrolíticas e sideróforo. Muitos isolados apresentaram produção de protease e sideróforo. Foi possível também correlacionar a produção das enzimas amilase, lipase e poligalacturanase com os isolados provenientes de tecidos sintomáticos.

Palavras-chaves: Guaraná; Endofítico; Epifítico; Antracnose; Biocontrole; Diversidade; Pirosequenciamento

ABSTRACT

Endophytic and epiphytic bacteria cultivated and uncultivated of guarana and control of anthracnose

Guarana, *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, is a native culture of Brazil that has relevance to the country, mainly in the states of Bahia and Amazonas. The fruit contains stimulant substances, such as caffeine, that gives a high exploration potential to the culture, since this is one of the most consumed stimulant substance in the world. Despite its importance, the culture of guarana hasn't gotten much of attention, and little is known about its genetics and microbial interactions with both epiphytic and endophytic microorganisms, and in relation to pathogens. So, the guarana culture in the Amazon region has been affected by bad phytosanitary conditions, such as the presence of the fungi *Colletotrichum*, which causes anthracnose disease that's considered a threat to guarana commercial production. Thus, to understand the dynamics involved in the interaction plant-microorganism and the possible control of anthracnose, this study accessed the bacterial community associated to leaves with and without anthracnose symptoms, combining culture-dependent and -independent methodologies and also investigated the biotechnology potential and biocontrol of culture-dependent bacteria. The bacterial community accessed by culture-dependent and -independent manner presented similarities, both presented higher bacterial richness but lower bacterial diversity in asymptomatic leaves when compared with symptomatic leaves, and both communities presented the *Proteobacteria* phylum as the most abundant one. Comparisons between the endophytic and epiphytic bacterial isolates associated with leaves with and without anthracnose symptoms showed that the onset of anthracnose disease on leaf seemed to be the most important factor that modified the bacterial community structure. Regarding the differences between symptomatic and asymptomatic tissue it was possible to identify some genera most frequently accessed in symptomatic plants such as *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Pantoea* accessed in both culture-dependent and -independent methodologies. However, the culture-independent approach of bacterial accessed others abundants taxa that differed significantly between plants. Symptomatic leaves showed *Acinetobacter*, *Acidobacter_GPI* and *Sphingobacteria* and asymptomatic leaves presented taxa *Methylobacterium*, *Beijerinckia*, group "Bacilli" and a group of unclassified *Rhizobiales*. In addition, endophytic and epiphytic isolates microorganisms were tested with the pathogen *Colletotrichum* sp. in antagonism assays, and isolates from the genus *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Entereobacter*, *Pseudomonas*, and others, showed inhibition of growth of the fungus. The bacterial isolates were also tested for production of hydrolytic enzymes and siderophore. Many isolates showed protease and siderophore production. It was possible to correlate the production of amylase, lipase and poligalacturanase with isolates from symptomatic tissue.

Keywords: Guarana; Endophytic; Epiphytic; Anthracnose; Biocontrol; Diversity; Pyrosequencing

1 INTRODUÇÃO

A cultura do guaranazeiro é de grande importância para grandes e pequenos produtores em diferentes estados do Brasil. A partir do fruto é possível a fabricação de refrigerantes, sorvetes, sucos, xaropes, pó estimulante, além de produtos medicinais. O Brasil é o único país produtor de guaraná em escala comercial, sendo que, 70% de sua demanda é absorvida pelos produtores de refrigerantes. No ano de 2010 o rendimento da produção de guaraná no Brasil foi de 303 kg/ha, sendo que o total da área plantada 15.318 ha (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE 2011). No estado da Amazonas, o rendimento médio da produção de guaraná foi de 205 kg/ha, enquanto que no estado da Bahia, o rendimento alcançado foi quase o dobro, 404 kg/ha, sendo que a produção total de 2.688t superou em mais de mil toneladas a produção de guaraná do estado de Amazonas (IBGE, 2011).

Assim, atualmente a Bahia é o principal produtor de guaraná no Brasil, superando o Amazonas que é considerado centro de origem da cultura (ATROCH, 2009). Entre as razões para a baixa produtividade da cultura, estão: o plantio de variedades tradicionais não melhoradas, a idade avançada dos guaranazais, a falta de tratamentos culturais adequados e a alta incidência de pragas e doenças (EMBRAPA, 2005).

Uma das principais doenças relacionadas à baixa na produção de guaraná no estado do Amazonas é a antracnose, sendo esta considerada a doença mais importante da cultura. Causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, a antracnose caracteriza-se pelo aparecimento de lesões foliares arredondadas, necróticas, de coloração alaranjada (SILVA et al., 2004).

Os microrganismos endofíticos e epifíticos, por dividirem o mesmo habitat dos patógenos, tornam-se potenciais agentes de biocontrole (AZEVEDO et al., 2000; ANDREOTE, 2007; BLAKEMAN; BRODIE, 1977). Entretanto, as relações nesse microambiente são pouco estudadas e conhecidas (HALLMAN et al., 1997), havendo a necessidade de se realizar estudos relacionados à diversidade dos microrganismos endofíticos e epifíticos e sua relação com os patógenos (ARAÚJO et al., 2002a, TROTEL-AZIZ et al., 2008), assim como a análise das principais substâncias produzidas pelos mesmos (SESSITSCH; REITER; BERG, 2004) que podem colaborar de forma substancial ao entendimento da dinâmica envolvida na complexa interação planta-patógeno-microrganismo, além de viabilizar a aplicação dos endófitos no biocontrole ou possibilitar a manipulação e descoberta de novas substâncias com potencial biotecnológico. Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar um

levantamento da comunidade bacteriana cultivável e não cultivável associadas às folhas sintomáticas e assintomáticas do guaranazeiro; buscar soluções mais ecológicas pra efetuar o controle da antracnose, através da investigação de microrganismos endofíticos e epifíticos isolados de guaraná com potencial de biocontrole e, por fim, estudar a produção de enzimas hidrolíticas e sideróforos pelos isolados bacterianos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 O Guaraná

A domesticação do guaraná está atribuída aos povos indígenas Sateré-Maués no norte da região Amazônica, entre os Rios Madeira e Tapajós. Da família Sapindaceae, o gênero *Paullinia* contém cerca de 200 espécies, sendo 9 consideradas nativas do Brasil (ANGÊLO et al., 2008). O guaraná apresenta duas variedades, *P. cupana* variedade *typica*, que ocorre na Venezuela, na Colômbia e no Brasil, e a *P. cupana* variedade *sorbilis*, conhecida como guaraná verdadeiro, ocorrendo apenas na área central da Amazônia brasileira, principalmente na região de Maués (ARAÚJO et al., 2009).

O Brasil é o único produtor de guaraná em escala comercial do mundo, com possibilidade real de expansão, o que incrementaria a economia regional e nacional. No ano de 2010 o rendimento brasileiro da produção de guaraná foi de 303 kg/ha, sendo o total da área plantada 15.318 ha (IBGE, 2010). No estado da Amazonas, o rendimento médio da produção de guaraná foi de 205 kg/ha, enquanto que no estado da Bahia, o rendimento alcançado foi quase o dobro, 404 kg/ha, superando em mais de mil toneladas a produção de guaraná do Estado do Amazonas.

Uma das principais causas da perda de produtividade da guaranicultura no Amazonas é a alta incidência da antracnose, doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, que em plantios de mudas propagadas sexualmente (originárias de sementes de materiais genéticos não-selecionados) atinge níveis alarmantes: cerca de 80% das plantas sofrem infestações em níveis graves (NASCIMENTO FILHO; ATROCH, 2003).

Os principais produtos oriundos dessa cultura são vendidos em forma de xarope, pó, e outros subprodutos. Do total da produção nacional, cerca de 70% da sua demanda é absorvida pelas fábricas de refrigerante (ATROCH, 2009). Além disso, 20% da produção de guaraná atende a demanda internacional, sendo que entre os países importadores do guaraná estão Japão, Alemanha, Itália, Inglaterra, Estados Unidos e Espanha (ARAÚJO et al., 2009).

Dentre as características que mais impulsionam o consumo do guaraná, destaca-se a cafeína, presente em altos teores, principalmente nas sementes (TFOUNI et al., 2007). Esta é considerada a substância psicoativa mais consumida no mundo. Cerca de 80% da população mundial consome algum tipo de bebida com cafeína, sendo que o Brasil tem uma das maiores médias de consumo da substância, cerca de 300 mg/Kg/dia

(FAO, 1995, HECKMAN; WEIL; MEJIA, 2010). Além da presença de cafeína, outras substâncias como a teobromina e a teofilina, alcalóides com moléculas similares, são considerados estimulantes. Dentre os avanços nos estudos dessas e outras substâncias, ficaram comprovados por diversos pesquisadores os efeitos contra a fadiga, contra a perda de memória e de inibição do apetite (ARAÚJO et al., 2009).

Em relação às condições adequadas para a produção de guaraná, sabe-se que esta é uma planta que se desenvolve bem em áreas de clima tropical chuvoso, com precipitações médias anuais superiores a 1.300mm. A temperatura média anual ideal para seu cultivo oscila entre 23° - 28°C, a umidade relativa do ar acima de 80 % e não suporta ventos frios. Os solos para a cultura devem ser profundos, bem drenados, de textura média, topografia levemente ondulada e não sujeito a inundações. Entretanto, os solos de baixa fertilidade e elevada acidez predominam na Amazônia, o que limita a sua utilização para a agricultura (SANCHEZ; VILLACHICA; BANDY, 1983).

Dentre os poucos trabalhos relacionados à citogenética e biologia molecular da planta, podem ser destacados dois. O primeiro estudo mostrou que o cariótipo do guaraná supera em muito o número de cromossomos de outras plantas do gênero *Paullinia* sendo que *P. cupana* var. *sorbilis* tem $2n=210$ cromossomos em contraste com a maioria das espécies do gênero, que apresentam $2n=24$. Acredita-se que os nativos americanos tenham reparado em características medicinais e estimulantes do guaraná, propagando-as e possibilitando a criação da variedade “sorbilis” (FREITAS et al., 2007). Um segundo estudo foi o sequenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) sendo mapeando genes ativados em plantas saudáveis com sementes. A partir daí foi possível estabelecer a localização dos genes que produzem as principais substâncias do guaraná. Metabólitos secundários como flavonóides, que são poderosos antioxidantes e a cafeína, principal estimulante do guaraná, foram pesquisados, elucidando parcialmente a estrutura e os padrões de expressão dos genes que contribuem para as propriedades biológicas do guaraná (ANGÊLO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2011)

2.1.2 A antracnose no guaranazeiro

Como destacado anteriormente, a produção de guaraná no Brasil, principalmente no estado do Amazonas, tem sido afetada drasticamente pela antracnose, doença descrita por Albuquerque em 1961 como sendo causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* Albq. Entretanto, há controvérsias quanto à classificação do agente

causal, possivelmente, várias espécies do gênero *Colletotrichum* estariam envolvidas no aparecimento do sintoma da doença (BENTES; BARRETO, 2004). O fungo atua principalmente promovendo a necrose na folha que coloniza. O processo de infecção ocorre pela germinação dos conídios do fungo dando origem a um apressório globoso de coloração marrom-escuro. Há emissão de uma hifa de infecção que penetra na parede celular da epiderme da planta, dando origem a uma vesícula de infecção. A partir desse ponto, é possível a colonização, através da hifa primária de células adjacentes, dando origem às áreas necróticas no tecido (BENTES; MATSUOKA, 2002; SILVA et al., 2004).

O *Colletotrichum* é encontrado tanto em guaranazeiros doentes, quanto sadios. Isso poderia indicar que existem fungos do gênero que não são danosos a planta, ou então que a doença só ocorreria se houvessem condições favoráveis sua manifestação (COSTA NETO, P.Q., 2009).

Este é um gênero muito estudado e conhecido por provocar antracnose em diversas culturas de interesse agrônomo, como citrus, milho, pepino, entre outros (PERFECT et al., 1999). Alguns fatores como, incidência de luz, temperatura e estresse no hospedeiro causado por outros parasitas parecem ser fatores que influenciam diretamente na severidade da antracnose causada no milho (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999).

O controle de patógenos fúngicos, incluindo *Colletotrichum* spp., é feito através da seleção de plantas com genótipos resistentes e da aplicação de fungicidas (NEWTON; GRAVOUIL; FOUNTAINE, 2010). Porém, o uso indiscriminado de fungicidas pode desbalancear o equilíbrio existente entre os microrganismos e, em alguns cultivares, aumentar a severidade da doença, por conta da diminuição da competição entre o patógeno e um outro grupo ali presente que, de alguma forma, controlava a doença. Além disso, o uso de fungicidas por um longo tempo pode selecionar linhagens resistentes de patógenos (HEANEY et al., 2000). Esses efeitos são diminuídos com o uso de agentes de controle biológico, tanto com relação a seleção de linhagens resistentes de patógenos, como com relação ao equilíbrio ecológico (NEWTON et al., 2010).

2.1.3 Microrganismos epifíticos

Microrganismos epifíticos são conhecidos há longo tempo, bem como o interesse em compreender o papel desenvolvido por eles no controle de doenças

causadas por fungos na superfície foliar (POTTER, 1909). O microambiente onde os mesmos são encontrados é caracterizado pela ocorrência de grandes e rápidas variações. Fatores como umidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes variam em curtos períodos de tempo, ocasionando sensíveis alterações nas populações microbianas patogênicas e epifíticas da superfície foliar (LINDOW; BRANDL, 2003).

Os microrganismos epifíticos são definidos como aqueles que vivem e se reproduzem na superfície foliar, sendo que as bactérias são os habitantes mais abundantes dessa região. Em uma mesma planta, a diversidade varia entre as populações microbianas, mesmo considerando-se uma pequena diferença de localização e/ou tempo (LINDOW; BRANDL, 2003).

Por colonizarem o mesmo nicho de alguns patógenos foliares, Leben em 1965 já preconizava que estes microrganismos poderiam reduzir o potencial de inóculo desses. Estudos mais recentes apontam algumas causas para tal efeito, por exemplo a competição por nutriente entre os epifíticos e fungos potencialmente patogênicos (BLAKEMAN; BRODIE, 1997, TROTEL-AZIZ et al. 2008), produção de substâncias potencialmente prejudiciais ao invasor, como exemplo as quitinases (TROTEL-AZIZ et al, 2008). Korsten et al. (1995), ao estudarem a diversidade bacteriana epifítica cultivável do abacateiro demonstraram a eficiência de alguns gêneros de bactérias no controle de diversos fungos patogênicos, destacando-se o gênero *Bacillus*, que demonstrou grande potencial antagonista contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno foliar desta cultura.

2.1.4 Microrganismos endofíticos

Os endófitos podem ser definidos como microrganismos que colonizam os tecidos internos da planta, sem causar danos aparentes ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO et al., 2000). Porém, essa definição excluía os rizóbios e micorrizas, sendo, portanto, redefinido este conceito com a separação dos endófitos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, incluindo assim, rizóbios e micorrizas (MENDES; AZEVEDO, 2007). Além disso, vários estudos destacam as características benéficas que os microrganismos endofíticos conferem às plantas hospedeiras, como resistência às condições de estresse; alteração em propriedades fisiológicas; produção de fito-hormônios e de outros componentes de interesse biológico (AZEVEDO et al., 2000; STROBEL et al., 2004).

De maneira geral, o que torna esses microrganismos potenciais agentes de controle biológico é o fato dos mesmos possuírem, da mesma forma que os patógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo habitar apoplastos, vasos condutores e ocasionalmente o meio intracelular (QUADT-HALLMAN; KLOPPER, 1996; QUADT-HALLMAN; BENHAMOU; KLOPPER, 1997; ANDREOTE, 2007). A colonização sistêmica das plantas pelos endófitos também pode alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro (ANDREOTE et al., 2006; ANDREOTE, 2007).

Apesar de seu potencial, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na atividade antagonista das bactérias endofíticas (HALLMAN et al., 1997). Testes de antagonismo, com posterior identificação destes organismos, têm ajudado a elucidar o potencial das espécies das bactérias endofíticas que podem ser aplicadas no controle de doenças (BERG et al., 2005; SESSITSCH; REITER; BERG, 2004; CHO et al., 2007).

Além disso, o estudo de substâncias produzidas pelos endófitos e seu potencial de antagonismo são importantes não somente para o entendimento de papel ecológico e de relações inter-específicas, mas também para viabilizar a aplicação desses organismos no controle biológico de patógenos ou mesmo o isolamento de compostos de importância biotecnológica (WELLER, 1988; EMMERT; HANDELSMAN, 1999; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; SESSITSCH; REITER; BERG, 2004).

Muitas bactérias, com atividade antifúngica, foram encontradas em diversas plantas, como por exemplo, na Campainha-da-china (*Platycodon grandiflorum*) (ASRAFUL ISLAM et al., 2010), no café (*Coffea arabica* L.) (MULETA; ASSEFA; GRANHALL, 2007), na banana (*Musa* spp.) (LIAN; WANG; ZHOU, 2008) e na batata (*Solanum tuberosum* L. 'Bionta') (SESSITSCH; REITER; BERG, 2004). Entre as muitas substâncias produzidas por essas bactérias salienta-se algumas enzimas hidrolíticas e sideróforos. Assim, traçar um perfil das principais enzimas hidrolíticas produzidas pelos microrganismos, pode ajudar a elucidar os processos de atividade antimicrobiana dos mesmos, uma vez que a produção desses compostos é considerada um mecanismo comum e bastante conservado entre as bactérias (SESSITSCH; REITER; BERG, 2004). A produção de sideróforos, relacionada com o suprimento de ferro da célula, também pode estar relacionada com o controle biológico, uma vez que a maioria dos microrganismos responde a um estresse induzido pela baixa quantidade de ferro extracelular (LEONG, 1986).

2.1.5 Estudos da diversidade microbiana

Os microrganismos são considerados uma grande fonte de diversidade genética, porém pouco compreendida e explorada (PROSSER et al., 2007). Quanto aos microrganismos endofíticos, estima-se que das aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes no planeta, cada indivíduo destas espécies contenha um ou mais microrganismos endofíticos (STROBEL et al., 2004). Como poucas plantas já foram estudadas em relação à diversidade das comunidades bacterianas presentes, existem uma grande possibilidade de se encontrar microrganismos com potencial biotecnológico nunca antes explorado (RYAN et al., 2008).

Assim, a fração de diversidade dos grupos microbianos conhecidos e descritos representa uma pequena porção daquela existente na natureza (AZEVEDO, 1998). Entretanto, a evolução da biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente no conhecimento da diversidade microbiana.

As técnicas mais utilizadas são mapas de restrição, hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA, sequências de subunidades do rRNA, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) e DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), dentre outras (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000).

Estudos taxonômicos e de variabilidade genética em microrganismos usam frequentemente o gene codificador do RNA ribossômico, por este apresentar múltiplas cópias que não codificam proteínas, por ser muito conservado e também por estar presente em todos os organismos (GUARRO et al., 1999). O sequenciamento desse gene permite a identificação de microrganismos em nível de gênero e também em nível de espécie, e ainda permite fazer correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEY et al., 2000).

Visando um melhor acesso à diversidade da comunidade, atualmente as técnicas de biologia molecular são amplamente utilizadas para caracterização desses microrganismos. A diversidade bacteriana pode ser estudada por meio de técnicas de sequenciamento a partir das bactérias cultiváveis, sendo esta uma metodologia rotineira, mas de limitada aplicação, uma vez que são influenciadas por muitos fatores e subestimam a diversidade bacteriana (RASCHKE et al., 2006; ANDREOTE et al., 2009). Assim, a clonagem e o sequenciamento de genes 16S, a partir de PCR com *primers* universais de comunidades bacterianas não cultiváveis, indicam que a diversidade microbiana é muito maior do que se imaginava antigamente (TRINGE;

HUGENHOLTZ, 2008; PACE, 1997), abrindo assim um novo universo a ser explorado.

A técnica de *fingerprint* chamada *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) desenvolvida há quase 30 anos (MUYZER; DE WALL; UITTERLINDEN, 1993) tem sido amplamente utilizada para descrições e comparações de diferentes comunidades bacterianas (RANJARD et al., 2000). Essa técnica distingue produtos de PCR com números similares de nucleotídeos, baseando-se em suas diferenças de composição (porcentagem de CG) permitindo a análise de diversidade de bactérias cultiváveis e não-cultiváveis (ARAÚJO et al., 2002b; WEST et al., 2010), bem como as relações entre bactérias e patógenos (HJORT et al., 2007).

Recentemente, técnicas mais robustas e com grande poder de amostragem têm sido utilizadas para estudos de diversidade microbiana, como o pirosequenciamento. Esta técnica consiste na adição, em cada ciclo, de uma espécie de nucleotídeo, seguida da adição de substrato (luciferin, adenosina 5'-fosfosulfato) que geram luz onde houve incorporação do nucleotídeo, por último a apyrase remove os nucleotídeos que não foram incorporado e outro ciclo pode ser iniciado (SCHENDURE, 2008). Produtos de PCR do gene 16S são submetidos ao sequenciamento em larga escala em equipamentos 454 GS FLX, dessa forma é possível 300.000 *reads* de tamanhos de 200 a 300 pb com apenas uma corrida (SHENDURE; HANLEE, 2008). O avanço desses aparelhos é tão rápido que, hoje é em dia em aparelhos 454 GS FLX+ é possível fazer mais de um milhão de *reads* de alta qualidade de com tamanho médio de 1000 pb em apenas uma corrida (TEILING et al., 2012).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material vegetal e local de coleta

Para o estudo da diversidade da comunidade bacteriana associada ao guaranazeiro, foram coletas folhas de 10 diferentes plantas de guaranazeiro: 5 plantas consideradas sadias – assintomáticas e 5 plantas consideradas doentes – com sintomas de antracnose (Figuras 1 A e B). Todos os indivíduos amostrados pertenciam ao mesmo clone (série 800). A coleta foi realizada no mês de junho/2010 na Fazenda Santa Helena pertencente à AMBEV, localizada no município de Maués-AM.

Figura 1 – Folhas de guaranazeiro assintomáticas (A) e sintomáticas (B) coletadas no município de Maués-AM

2.2.2 Estudo da diversidade bacteriana

2.2.2.1 Diversidade bacteriana dependente de cultivo

2.2.2.1.1 Isolamento das bactérias epifíticas

As folhas foram cortadas em pequenos fragmentos, de aproximadamente 5x5 mm (amostras de aproximadamente 1 grama) e misturadas em 10 mL de tampão PBS (10 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4 ; 3 mM KCl; 140 mM NaCl; pH 7,4). Posteriormente, esse material foi transferido para tubos de 50 mL que foram incubados por agitação por 1 hora a 28°C. Foram efetuadas diluições apropriadas e estas foram semeadas em meio Triptona Soja Agar (TSA) (Difco) 10% suplementado com benomil (50 $\mu\text{g/mL}$) para evitar contaminação fúngica. As placas foram incubadas a 28°C por 5 dias para avaliação das colônias isoladas.

2.2.2.1.2 Isolamento das bactérias endofíticas

As folhas cortadas, em fragmentos de aproximadamente 5x5 mm (amostras de aproximadamente 1 grama) foram primeiramente submetidas à desinfecção superficial: lavagem em álcool por 1 minuto, lavagem em hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (v/v) por 2 minutos, lavagem em álcool 70% por 1 minuto, e duas lavagens com água destilada autoclavada (Araújo et al., 2002b). Após a desinfecção superficial, as folhas foram trituradas em 5 mL de tampão PBS. O material foi transferido para tubos de 50 mL incubados sob agitação (150 rpm) por 1 hora a 28°C. Após diluições seriadas, o extrato foi semeado em meio TSA 10%, suplementado com benomil (50 $\mu\text{g/mL}$). As

placas foram incubadas a 28°C durante 5 dias para posterior avaliação das colônias isoladas. A eficácia do processo de desinfecção superficial foi observada por meio da semeadura de alíquotas de água da última lavagem em meio de cultura TSA 10%.

2.2.2.1.3 Purificação e estocagem dos isolados bacterianos

Após a incubação, as colônias foram contadas e por meio da técnica de esgotamento por estrias, uma amostra dos isolados representantes da diversidade bacteriana foi purificada em placas contendo o meio TSA 10%. Assim que as colônias cresceram as mesmas foram repicadas em tubos de ensaio contendo TSB 100% (40 g), sendo incubadas a 28° C por 24 horas e estocadas em glicerol 15% a -80° C para análises posteriores. As bactérias epifíticas isoladas de tecido sadio foram identificadas como - EPS e de tecido doente – EPD; sendo as bactérias endofíticas de tecidos sadios identificadas como – FS e de tecidos doentes – FD.

2.2.2.1.4 Extração de DNA das bactérias associadas à folha do guaranazeiro

Os isolados bacterianos selecionados foram crescidos em meio TSB 10% por 3 dias a 28°, sob agitação (150 rpm). A cultura bacteriana foi centrifugada e ao precipitado obtido foram adicionados 700 µL de tampão TE, 30 µL de SDS 10% e 0,5 g de sílica (0,1 mm). Em seguida, a suspensão foi agitada no Homogeneizador de Células (Ação Científica) por 30 segundos a 5000 bpm, e em seguida, centrifugada por 10 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado à ele 500 µL de fenol, sendo então a suspensão homogeneizada por inversão e centrifugada nas condições anteriores. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 500 µL de clorofórmio. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada novamente. O sobrenadante foi então transferido para novo tubo com 500µL de fenol/clorofórmio/álcool isopropílico (5:4:1), homogeneizado, centrifugado e coletado. Em seguida, foram adicionados 0,1 do volume de NaCl (5 M) e 0,6 do volume de isopropanol. A mistura foi deixada por 10 minutos à temperatura de 6°C e centrifugada por 15 minutos a 10.000 g. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 40°C por 20 minutos e ressuspenso em 50 µL de água deionizada esterilizada.

2.2.2.1.5 Amplificação do gene 16S rDNA e sequenciamento

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada diretamente das colônias bacterianas crescidas em meio TSA 10%, ou então pela extração de DNA (item

2.2.2.4.). Para as reações de PCR foram utilizados os *primers* R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Heuer et al., 1997), e a reação foi realizada nas seguintes condições: 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 M de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, Tampão 10X, num volume final de 50 µl. O gene 16S rDNA foi amplificado com desnaturação inicial de 4 minutos a 94° C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94° C; 1 minuto a 62,5° C; 30 segundos a 72° C, e uma extensão final de 7 minutos a 72° C em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems).

O produto das reações foi analisado em gel de agarose (1% p/v) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Fermentas).

Os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados (aproximadamente 1400 pb) foram purificados através da solução PEG 8000 (10g PEG 8000; 7,3 g NaCl; 45 mL água deionizada). Para tanto, 50 µL de solução PEG foram misturados com 50 µl do produto de PCR em microtubos de 1,5 ml e então incubados a 37°C por 15 minutos. Posteriormente centrifugaram-se os microtubos a 10.000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi retirado com pipeta e fez-se uma lavagem primária com 125 µl de etanol 80% incubando-se durante um minuto à temperatura ambiente e então centrifugando-se por 5 minutos a 10.000 g. Retirou-se novamente o sobrenadante e repetiu-se a lavagem com etanol 80% sob as mesmas condições de incubação. Depois de centrifugadas, as amostras foram secas por 15 minutos a 37°C. Finalmente, as amostras purificadas foram ressuspensas em 20 µl de água deionizada, quantificadas e então enviadas para serem sequenciadas no Centro de Estudo do Genoma Humano, Instituto de Ciências Biológicas-USP (<http://genoma.ib.usp>).

2.2.2.1.6 Classificação taxonômica dos isolados bacterianos

As sequências obtidas a partir do gene 16S rDNA foram utilizadas para identificação dos isolados nos bancos de dados *Ribosomal Database Project* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>), através do *SeqMatch*, e também no NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), através do *Blastn*. Foram consideradas sequências com dissimilaridade menor ou igual a 3% com as do banco de dados.

2.2.2.1.7 Análises estatísticas baseadas nas UTOs: rarefação, Chao1, Ace e cobertura

A partir das sequências obtidas foram obtidas Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) correspondentes (SCHLOSS et al., 2009). A diversidade das amostras foi mensurada por meio do índice de Shannon e a riqueza por meio do índice Chao1. Já, para o cálculo de suficiência amostral utilizou-se a metodologia de Mullins e colaboradores (1995). Estes índices foram gerados pelo programa computacional Mothur (SCHLOSS et al., 2009), que também gerou os dados de rarefação, considerando diferentes níveis de similaridade entre as sequências. Considerado sequências com no máximo 3% de dissimilaridade genética, o programa Mothur ainda gerou o diagrama de Venn. Foi realizada também a análise de LIBSHUFF também pelo programa Mothur, que utiliza o teste estatístico Cramer-von Mises para testar se duas comunidades tem a mesma estrutura (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN 2004).

2.2.2.1.8 Análise de Multivariada

A análise de multivariada realizada pela combinação dos dados de classificação taxonômica e o ambiente foi realizada levando em conta os diferentes gêneros encontrados e o tecido e/ou estado fisiológico provenientes. A distribuição dos gêneros, determinada através da DCA (*Detrended Correspondence Analysis*) indicou o melhor modelo a ser usado para dados com distribuição normal, sendo RDA (*Redundancy Analysis*). Assim, para inferir a significância de cada fator ambiental na composição dos gêneros de cada amostra, compara-se o valor de *P* e Lambda A para cada fator ambiental considerado (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009). Os dados gerados foram obtidos do programa Canoco 4.5 (Microcomputer Power, EUA).

2.2.2.2 Estudo da comunidade bacteriana independente de cultivo

2.2.2.2.1 Extração de DNA das folhas:

As folhas do guaranazeiro foram cortadas (aproximadamente 1 g por planta) e então maceradas com nitrogênio líquido. Em seguida, foi utilizado o Kit *Power Soil DNA Isolation* (MO BIO, EUA) seguindo as instruções do fabricante para realizar a extração do DNA total das amostras de folha.

2.2.2.2.2 Sequenciamento do gene 16S DNAr via Pirosequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado por serviço terceirizado (Helixxa, Campinas, São Paulo, Brasil). Para tal, o DNA extraído das folhas foi submetido a reações de PCR com *primers* que flanquearam a região V4 do gene 16S de ribossomo, sendo utilizado o *primers* direto 520F (5'-AYT GGG YDT AAA GNG-3') e uma mistura de quatro *primers* reversos 802R (5'-TAC CRG GGT HTC TAA TCC-3', 5'-TAC CAG AGT ATC TAA TCC-3', 5'-CTA CDS RGG TMT CTA ATC-3', 5'-TAC NVG GGT ATC TAA TCC-3') para aumentar o poder amostral, como descrito no *Ribosomal Database Project (RDP)* (ANEXO A e B). Em todos os *primers* foram adicionado adaptadores A e B conforme manual do fabricante (Roche, EUA). Ainda, ao primer direto de cada amostra foi adicionada uma sequência de oito bases (*tag*) para a posterior identificação da origem de cada sequência.

2.2.2.2.3 Classificação taxonômica, alinhamento e formação das unidades taxonômicas dos fragmentos do gene 16S rDNA.

A análise das sequências foi realizada com o auxílio do *Pyrosequencing Pipeline* do *Ribosomal Database Project (RDP)*. Com a ferramenta *Pipeline Initial Process* foi realizada a filtragem das sequências de acordo com a qualidade, a qual considerou somente sequências com bases de pontuação superior a 20 e tamanhos superiores a 150 pb. Pela triagem inicial também foram separadas as sequências de acordo com os tratamentos, utilizando os barcodes referentes à cada tratamento (ANEXOS A e B). Foram excluídas as sequências de DNA cloroplastidial para os seguintes procedimentos. As sequências foram alinhadas com o auxílio da ferramenta *Aligner* e, após o agrupamento das sequências em dois *datasets* de plantas assintomáticas e sintomáticas, a ferramenta *Complete Linkage Clustering* gerou, baseando-se na similaridade entre as sequências a ferramenta gerou as UTOs para cada *dataset*. Cada um dos *datasets* foi submetido à afiliação taxonômica com o auxílio do *RDP classifier* e também ao *RDP Library Compare* com a finalidade de comparar os táxons presentes nos dois tratamentos, estimando a probabilidade de observar diferenças dentro desses táxons, através do teste estatístico padrão de proporção entre duas populações, considerando que estas estão em uma distribuição normal padrão. O valor de *P* é estimado a partir do valor crítico de *z* e calculado no *RDP Library Compare*.

2.2.2.2.4 Análises estatísticas baseadas nas UTOs: rarefação, Chao1, Ace e cobertura

Por meio do arquivo de *cluster* gerado pela ferramenta *Complete Linkage Clustering*, foi possível fazer as curvas de rarefação para os dois *datasets* através da ferramenta *Rarefaction*. A diversidade das amostras foi mensurada por meio do índice de Shannon e a riqueza por meio do índice Chao1. Já, para o cálculo de suficiência amostral utilizou-se a metodologia de Mullins e colaboradores (1995). Estes índices foram gerados pelo programa computacional Mothur (SCHLOSS et al., 2009). Considerado sequências com no máximo 3% de dissimilaridade genética, o programa Mothur ainda gerou o diagrama de Venn.

2.2.3 Potencial de biocontrole e biotecnológico dos isolados bacterianos

2.2.3.1 Ensaio de antagonismo

Para avaliar a atividade antagônica dos isolados bacterianos contra o agente causal da antracnose, foi realizado o teste de paridade *in vitro*. Os fitopatógenos testados foram *Colletotrichum* sp. (L1) e *Colletotrichum* sp. (L3) gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Pedro Queiroz Costa Neto da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus-AM. Para tanto, foi utilizado o meio de cultura Batata Dextrose Ágar-BDA (Difco).

Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa da capacidade inibitória dos isolados. Em três extremidades foram inoculados diferentes isolados bacterianos do guaraná. No mesmo dia foi feita a inoculação no centro da placa com o fitopatogênico (discos de 2 cm de diâmetro). As culturas foram incubadas a 28°C durante 5 dias (Figura 2). O ensaio foi realizado com os dois patógenos, L1 e L3, separadamente.

Figura 2 – Triagem realizada com os isolados bacterianos, teste de paridade com um dos isolados do fungo fitopatogênico – *Colletotrichum* sp. **L1**

Os isolados bacterianos que inibiram ou retardaram o crescimento fúngico foram novamente testados com o fitopatógeno, isolado L1, em um ensaio individual quantitativo.

As culturas bacterianas foram novamente repicadas em meio sólido de TSA 10% e após 24 horas de incubação a 28°C foram transferidas para 5 ml de água deionizada autoclavada, e a absorbância (O.D._{600nm}) das culturas foi medida para que o ensaio fosse realizado com aproximadamente 10⁸ células bacterianas/ml. Em uma extremidade da placa foi inoculado 10 µl da solução bacteriana e, no mesmo dia, no centro da placa de Petri foi inoculado um disco de 2 cm de diâmetro do isolado L1. As placas foram incubadas por 5 a 7 dias a temperatura de 28°C, sendo o teste realizado em triplicata.

O cálculo da porcentagem de inibição dos isolados endofíticos testados foi realizado a partir da subtração do crescimento total considerado (média $X_2, X_2', X_2''/3$) pelo do valor do diâmetro de inibição (X_1). (Figura 3).

Figura 3 – Inibição do crescimento de L1 pelos isolados bacterianos. A fórmula utilizada foi: $100 - \{X_1 / (X_2 + X_2' + X_2''/3) * 100\}$

2.2.3.2 Produção de enzimas hidrolíticas

A atividade enzimática das bactérias cultiváveis foi avaliada qualitativamente. Para isso, as bactérias foram crescidas em placa de 96 poços contendo meio TSB 100% (40 g) e então semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura específico e incubadas a 28°C por 2 a 4 dias.

2.2.3.2.1 Atividade aminolítica

As bactérias foram crescidas em placas com em meio mínimo M9 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel (p/v). Após o crescimento microbiano foram adicionados 10 mL de solução de iodo e as placas foram lavadas

quase imediatamente com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a secreção de amilase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

2.2.3.2.2 Atividade celulolítica

As bactérias foram crescidas em placas com meio mínimo M9 (Araújo et al., 2002b) contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de Carboximetilcelulose (CMC) (p/v). Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL do Corante Vermelho Congo. Decorridos 15 minutos, as placas foram lavadas com NaCl (5M) segundo a metodologia proposta por Teather e Wood (1982). A presença de um halo amarelado ou incolor em torno da colônia indicou a secreção de endoglicanase.

2.2.3.2.3 Atividade lipolítica

O meio para detecção de lipase foi o proposto por (SIERRA, 1957). Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (p/v) de Tween 20, previamente esterilizado. A presença de halos formados por cristais indicou a secreção de lipase pelos isolados bacterianos.

2.2.3.2.4 Atividade esterásica

A metodologia utilizada para observação da produção de esterase foi a mesma utilizada para lipase, sendo substituído o Tween 20 pelo Tween 80 na mesma proporção. A produção de esterase foi indicada pela presença de halos claros ao redor da bactéria (SIERRA, 1957).

2.2.3.2.5 Atividade proteolítica

Para avaliação da atividade proteolítica foi utilizado o meio de cultura contendo 5,0g triptona, 2,5g extrato de levedura, 1,0g glicose, 2,5g NaCl, 18g/L de ágar (pH 7,0), suplementado, após esterilização, com 100 mL de leite desnatado. A atividade proteolítica foi indicada pela visualização de um halo ao redor da colônia bacteriana.

2.2.3.2.6 Atividade pectinolítica

Os microrganismos foram crescidos em meio mínimo M9 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de pectina (p/v). Após o crescimento microbiano, foram adicionados 10 mL de Lugol e imediatamente realizou-se uma lavagem com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a secreção de pectinase. O pH

desse meio pode ser modificado para caracterização de duas diferentes pectinases: O meio com pH 8,0 foi utilizado para caracterização de pectato-liase e o meio com pH 5,0 para poli-galacturonase.

2.2.3.3 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada em CAS-ágar preparado de acordo com Schwyn e Neilands (1987). Primeiramente 60,5 mg de CAS foi dissolvido em 50 ml água destilada e misturada com 10 ml de solução de ferro (III) (1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HCl). Sob agitação, à essa solução foi lentamente adicionada 72,9 mg HDTMA dissolvidos em 40 ml de água. O líquido azul escuro que resultou (solução corante) foi autoclavado. Também foi autoclavado o meio de cultura contendo em 180 ml água: 3 g ágar, 4 g sacarose, 0,4 g asparagina, 0,2 g KH_2PO_4 e 100 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Então, 20 mL da solução corante esterilizada foi adicionada ao meio de cultura e 20 mL da mistura foram vertidos em placas de Petri. A produção de sideróforos foi observada mediante a formação de halo amarelo-alaranjado.

2.2.3.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas de todos os dados foram realizadas com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, considerando os delineamentos experimentais inteiramente casualizado. Os dados de densidade bacteriana (UFC/grama de amostra) foram transformados em Log_{10} (UFC/grama de amostra +1) para normalização dos dados.

2.3 Resultados

2.3.1 Estudo da comunidade dependente de cultivo

2.3.1.1 Isolamento de bactérias endofíticas e epifíticas da folha do guaranazeiro

A partir do isolamento de bactérias endofíticas e epifíticas, foi possível estimar a abundância bacteriana por meio da UFC/grama de tecido vegetal. A densidade encontrada em folhas sintomáticas foi significativamente maior, tanto para bactérias epifíticas, quanto para endofíticas (Tabela 1).

Tabela 1 – Densidade bacteriana isolada de plantas de guaraná com e sem sintomas de antracnose

Tecidos amostrados	Densidade bacteriana*	
	Epifíticas	Endofíticas
Assintomático	3 a	3,1 a
Sintomático	4 b	5,1 b

*Densidade bacteriana mensurada em Log (UFC/ g de tecido +1) dos isolados epifíticos e endofíticos provenientes de folhas de guaranazeiro com (sintomáticas) e sem sintomas (assintomáticas) de antracnose, coletadas no município de Maués-AM. As médias apresentadas na mesma coluna com mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o Teste de Tukey ($P > 0,05$).

2.3.1.2 Composição da comunidade bacteriana e classificação taxonômica

Foram identificadas por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA um total de 216 bactérias endofíticas e epifíticas de folhas assintomáticas e com o sintoma característico da antracnose. O critério de seleção para o sequenciamento foi baseado na morfologia das bactérias, tentando abranger os diferentes aspectos e formas presentes nos isolados.

Dentre estes isolados, foi possível identificar 18 gêneros, sendo que a grande maioria pertencia ao filo *Proteobacteria*, seguido de *Firmicutes*, e em menor porcentagem *Acidobacteria* e *Bacterioides*, considerando os diferentes estados fisiológicos (assintomático e sintomático) e os diferentes locais de isolamento (epifítico e endofítico) (Figura 4A).

Foi possível observar que, dentro do filo mais abundante, a classe mais predominantemente isolada foi *Gammaproteobacteria*, porém foram isolados também representantes das classes *Alpha* e *Betaproteobacteria* (Figura 4B).

Figura 4 – Distribuição das bactérias isoladas epifíticas e endofíticas de folhas com ou sem sintoma da antracnose ao nível taxonômico de filo (A); Classes dentro do filo Proteobacteria (B)

2.3.1.3 Correlação dos gêneros com o tecido e o estado fisiológico

Análises feitas comparando as comunidades de isolados dos dois estados fisiológico da planta (folhas assintomáticas e sintomáticas) e das duas comunidades (epi e endofítico) distintos mostraram que há diferença significativa entre eles. Duas comunidades podem ser consideradas significativamente distintas se qualquer um dos valores de P gerado através do LIBSHUFF for menor ou igual que o valor crítico de P (o valor crítico de P para duas bibliotecas é 0.025).

Tabela 2 – Valores de P obtidos através da comparação dos isolados de 16S rDNA entre os diferentes estados fisiológicos (1) e tecidos (2), dados gerados pelo programa Mothur

(1)		(2)			
Estado fisiológico	Valores de P nos diferentes estados fisiológicos		Comunidade	Valores de P para os diferentes isolados	
	Sintomático	Assintomático		Epífita	Endófito
Assintomático	0.005		Endófito	0.0363	
Sintomático		0.2492	Epífita		0.0215

Tabela 3 – Análise multivariada RA realizada comparando isolados de tecidos epifíticos e endofíticos, de tecidos com e sem sintomas da antracnose através do programa CANOCO 4.5

Variável	Lambda A	P
Sintomático/Assintomático	0,56	0,338
Endófito/Epífita	0,28	0,492

O estado fisiológico, ou seja, folhas com ou sem sintomas da doença causada pelo fungo *Colletotrichum* sp., pareceu influenciar mais na comunidade bacteriana presente do que o isolado da superfície – epifítico ou interno – endofítico de onde os isolados se encontravam. Apesar de o valor de *P* não ter sido considerado significativo para as comparações feitas na análise de multivariada RDA (Tabela 3), o valor de Lambda A, que representa o quanto da variação observada na comunidade é explicada pela variável, foi maior quando considerado o presença dos sintomas da doença na folha.

Os gêneros mais abundantes aparecem em todos os tratamentos, em maior ou menor porcentagem. Entretanto foram os gêneros menos abundantes que se encontraram ausentes ou presentes nos diferentes tratamentos. No caso de plantas assintomáticas, os gêneros exclusivos foram *Burkoldelia*, *Luteibacter* e *Staphylococcus*, enquanto que nas plantas sintomáticas os gêneros exclusivos foram *Brevundimnoas*, *Microbacterium*, *Curtobacterium* e *Sphingobacterium*. Quando se considerou os isolados epi e endofíticos, os epifíticos não apresentaram qualquer isolado de gênero não compartilhado com os endofíticos, enquanto que este apresentou sete gêneros não compartilhados: *Pantoea*, *Comamonas*, *Burkoldelia*, *Luteibacter*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* e *Sphingobacterium* (Figura 5A e 5B).

Porém, apesar de os gêneros mais abundantes aparecerem em todos os

tratamentos, houve predominância de alguns gêneros como *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* e outros predominantes em plantas assintomáticas, como *Acinetobacter* e *Bacillus* (Figura 5A). Quanto aos isolados epi e endofíticos onde as bactérias foram isoladas, somente os gêneros *Erwinia* e *Acinetobacter* pareceram ser preferencialmente acessados epifiticamente (Figura 5B).

Figura 5 – Percentagem de ocorrência de cada gênero observado na comunidade bacteriana cultivável do guaranazeiro, de acordo com o estado fisiológico do tecido, com ou sem sintoma da antracnose (A) e endófitos ou epifitos (B)

Quanto aos filotipos encontrados, considerando-se no máximo 3% de dissimilaridade, foi possível observar, por meio do diagrama de Venn gerado pelo programa Mothur, que os diferentes estados fisiológicos S (isolados de planta assintomática) *versus* D (isolados de planta sintomática) e F (Endófitos) *versus* E (Epífitos) apesar de compartilharem um grande número de filotipos, as comunidades destes tratamentos não podem ser consideradas como iguais, justamente porque em F contém 9 filotipos únicos, assim como D também (Figura 6) corroborando com os outros resultados encontrados.

Figura 6 – Diagrama de Venn entre os isolados F (Endófitos) *versus* E (Epífitos) e entre o estado fisiológico S (isolados de planta assintomática - sadias) *versus* D (isolados de planta sintomática - doentes). Os números representam os filotipos de cada tratamento, e o valor presente na intersecção representa as UTOs compartilhadas entre os tratamentos

2.3.1.4 Diversidade, riqueza e rarefação

Considerando endófitos e epífitos, assim como os diferentes estados fisiológicos da planta, foram também analisados os índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao), além dos dados de rarefação, utilizando-se o programa Mothur.

Foi possível observar que, os dois índices de riqueza considerados (Chao 1), demonstraram a mesma relação entre os diferentes tratamentos. Quando se considera uma dissimilaridade de até 3%, o tecido de folha assintomática apresentou maiores índices de riqueza, quando comparados com o tecido de folha sintomática. O mesmo ocorre quando se comparou endófitos com epífitos, ambos os índices de riqueza são maiores no primeiro (Tabela 4).

Quanto à diversidade das comunidades bacterianas acessadas, tecidos de plantas assintomáticas e endófitos apresentaram maiores índices, quando foi considerada dissimilaridade de 3% (Tabela 4).

Tabela 4 - Estimativa de riqueza de UTOs e índice de diversidade calculados a partir da análise de sequências dos isolados bacterianos no software MOTHUR 1.25.1

Tratamento	NS ^a	NU ^b	Estimativa de riqueza de UTOs	Índice de diversidade	ICE(%) ^c
			Chao1	Shannon (H')	
Assintomático	68	18	28,00 (18,66-70,20)	2,13 ($\pm 0,26$)	86,76
Sintomático	148	23	23,20 (22,14-32,37)	2,42 ($\pm 0,16$)	97,29
Endofítico	117	24	27,6 (23,15-49,14)	2,62 ($\pm 0,18$)	91,91
Epifítico	99	18	22 (17,77-49,13)	2,39 ($\pm 0,15$)	95,72

Para identificação de UTOs utilizou-se $D = 0,03$;

^aNúmero de sequências;

^bNúmero de UTOs determinado pelo MOTHUR 1.25.1

^cÍndice de cobertura estimada.

Já, a análise de rarefação demonstra que os filotipos bacterianos encontrados nos diferentes tecidos e estados fisiológicos da planta foram acessados, sendo que a 3% de dissimilaridade, a maioria das amostras obteve uma curva bastante similar, alcançando um patamar por volta de 20 filotipos (Figura 7). Os índices de cobertura também apresentaram uma alta porcentagem, demonstrando que se obteve uma cobertura satisfatória das amostras (Tabela 4).

Figura 7 – Análise de rarefação de filotipos componentes das comunidades bacterianas isoladas das comunidades epifíticas e endofíticas e os estados fisiológicos (A – Isolados de folha sintomática; B – Isolados de folha assintomática; C – Isolados endofiticamente; D – Isolados epifiticamente). As análises são baseadas em seqüências parciais do gene 16S ribossômico. As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos

2.3.2 Estudo da comunidade bacteriana independente de cultivo

2.3.2.1 Composição da comunidade bacteriana e classificação taxonômica

Foram geradas 33.983 e 46.231 seqüências do gene 16S através do pirosequenciamento, com tamanho médio de 206 pb, de tecidos assintomático e sintomático, respectivamente. Destas, 86,95% e 79,65% foram classificadas como seqüências pertencentes ao DNA cloroplastidial, nos tecidos assintomáticos e sintomáticos, respectivamente. Para as seguintes análises, desconsiderou-se o DNA cloroplastidial, sendo então utilizadas nas análises 4429 seqüências dos tecidos assintomáticos e 9396 dos tecidos sintomáticos (Tabela 5).

Tabela 5 – Sequências do gene 16S rDNA geradas através do pirosequenciamento

	Sequências	DNA cloroplastidial	Bactéria Classificada	Bactéria não classificada
Assintomático	33983	29549	1194	3235
Sintomático	46231	36825	4052	5344

O filo *Proteobacteria* foi o mais abundante, com 83,16% das sequências pertencentes a este grupo. Outros filios foram encontrados com menor abundância, como *Acidobacteria* (7,87%), *Bacteroidetes* (3,22%), *Actinobacteria* (1,88%), *Firmicutes* (1,69%) e *Verrumicrobia* (1,31%). Outros filios como *TM7*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, *Armatimonadetes*, *OD1*, *Chlamydiae* e *Tenericutes* foram reportados com menos de 1%. (Figura 8A).

2.3.2.2 Correlação dos filios e gêneros com os estados fisiológicos

Os filios obtidos nos dois diferentes estados fisiológicos variaram, sendo que filios menos abundantes encontrados em plantas assintomáticas como *Tenericutes*, *Chlamydiae*, *OD1*, *Armatimonadetes*, *Gemmatimonadetes*, *Verrumicrobia* não foram reportados em plantas sintomáticas.

Porém, os filios mais abundantes que foram acessados nos dois estados fisiológicos, variaram quanto a sua porcentagem. O filo mais abundante *Proteobacteria* teve 66,33% e 88,12% das sequências afiliadas em tecidos sintomáticos e assintomáticos, respectivamente. Dentro deste filo, também houve variação com relação às classes encontradas, sendo que *Alphaproteobacteria* foi mais abundante nos tecidos assintomáticos (91,49%) enquanto que nos tecidos sintomáticos *Gammaproteobacteria* foi o mais presente (68,17%), seguido de *Alphaproteobacteria* (30,11%) (Figura 8B).

O segundo filo mais abundante foi *Acidobacteria* com 17,75% e 4,96% de sequências atribuídas aos tecidos assintomáticos e sintomáticos, respectivamente. Dentro deste filo, o grupo mais representativo foi *Acidobacteria_GPI* 97,01% e 58,96% nos folhas sintomáticas e assintomáticas, sendo que na folha assintomática o grupo *Acidobacteria_GP2* também foi abundante, com 27,35% (Figura 8C).

Com relação à classe *Gammaproteobacteria*, os gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Pantoea* foram abundantes e preferencialmente reportados em tecidos sintomáticos. Outros gêneros menos abundantes, porém que também apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) foram *Cronobacter*, *Stenotrophomonas* e *Citrobacter*. Ainda foi possível verificar a presença de uma grande porcentagem de

Enterobacteriaceae não classificada dentro das sequências do tecido sintomático (Figura 9).

Já com relação aos gêneros da classe *Alphaproteobacteria*, como *Methylobacterium* e *Beijerinckia* foram reportados abundantemente no tecido assintomático. Outros gêneros menos abundantes, porém reportados com diferenças significativas ($P > 0,05$) com relação ao tecido sintomático foram: *Rhizobium*, *Acidisoma*, *Acidicaldus* e *Phenylobacterium*. Ainda foi encontrada uma porcentagem grande de (22,6%) de *Rhizobiales* não classificada (Figura 9).

Com relação aos gêneros desse filo *Acidobacteria*, *Granulicella* foi reportado preferencialmente em tecido sintomático, enquanto que *Gp1* foi reportado preferencialmente em tecido assintomático (Figura 9).

No filo Firmicutes, a classe “*Bacilli*” foi preferencialmente acessada em folha assintomática, encontrando preferencialmente os gêneros: *Lactococcus*, *Carnobacterium* e *Entereococcus* (Figura 9).

Outros gêneros acessados que apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) quanto ao estado fisiológico proveniente foram: *Granulicella* e *Opituales* em folhas assintomáticas e *Gp1* e *Sphingobacteria* em folhas sintomáticas. Os demais gêneros não apresentaram diferenças significativas, ou então, foram encontrados em pequena abundância relativa.

Figura 8 – Total dos filos reportados através de sequências geradas pelo pirossequenciamento do gene 16S rDNA de tecidos sintomáticos e assintomáticos (A); Classes reportadas dentro do filo Proteobacteria (B); Classes reportadas dentro do filo Acidobacteria (C). * Com diferença significativa de $p > 0,05$

Figura 9 – Porcentagem dos gêneros mais abundantes acessados através do sequenciamento do gene 16S rDNA nos tecidos sintomáticos e assintomáticos. *Diferença significativa ($P > 0,05$)

2.3.2.3 Diversidade, riqueza e rarefação

Considerando a dissimilaridade de no máximo 3% foram formados 434 e 373 UTOs de folhas assintomáticas e sintomáticas, respectivamente, sendo coincidentes 23,77% UTOs (Figura 10). Através da formação das UTOs, foi possível calcular índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon). Folha sintomática apresentou menores valores de riqueza e diversidade que o tecido assintomático (Tabela 6).

Quanto a rarefação das folhas assintomáticas e sintomáticas (Figura 11) percebeu-se que a 3% de dissimilaridade foi possível observar a formação de platôs.

Tabela 6 – Análise de sequências do gene 16S rDNA geradas através do pirsequenciamento no software MOTHUR 1.25.1

Tratamento	NS ^a	NU ^b	Estimativa de riqueza de UTOs	Índice de diversidade	ICE(%) ^c
			Chao1	Shannon (H')	
Assintomático	4429	434	769,51 (668,28-914,10)	2,04 (±0,08)	96,54
Sintomático	9396	373	546,78 (425,06-698,61)	2,77 (±0,04)	98,54

Para identificação de UTOs utilizou-se D = 0,03;

^aNúmero de sequências;

^bNúmero de UTOs determinado pelo MOTHUR 1.25.1;

^cÍndice de cobertura estimada;

Figura 10 - Diagrama de Venn entre o estado fisiológico S (sequências de planta assintomática - sadias) *versus* D (sequências de planta sintomática - doentes). Os números representam os filotipos de cada tratamento, e o valor presente na intersecção representa os filotipos compartilhadas entre os tratamentos.

Figura 11 – Análise de rarefação de filotipos componentes das comunidades bacterianas acessadas através de pirosequenciamento nos diferentes tecidos (A – Sequências de folha sintomática; B – Sequências de folha assintomática). As análises são baseadas em sequências parciais do gene 16S ribossômico. As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos.

2.3.2.4 Análise das sequências não classificadas

Um grande número de sequências foi classificado pelo *RDP classifier* como pertencentes a bactérias não cultivadas, representando estas 73,04% e 56,87% das sequências afiliadas dos tecidos assintomáticos e sintomáticos, respectivamente.

A análise de diversidade baseada na formação de UTOs realizada com estas sequências gerou 126 e 151 UTOs nos tecidos assintomáticos e sintomáticos, respectivamente, sendo coincidentes entre os tecidos 38,5% (Figura 12), a 3% de dissimilaridade, no máximo.

Figura 12 - Diagrama de Venn entre o estado fisiológico S (sequências não-classificadas de planta assintomática - sadias) *versus* D (sequências não-classificadas de planta sintomática - doentes) das sequências afiliadas a bactérias não-cultivadas. Os números representam os filotipos de cada tratamento, e o valor presente na intersecção representa as UTOs compartilhadas entre os tratamentos.

2.3.3 Comparação entre os dados das bactérias dependente de cultivos e independentes

Conforme resultados expostos acima, o filo mais acessado, tanto de forma dependente, como independente de cultivo foi *Proteobacteria*. A maioria dos isolados bacterianos pertencia à ordem *Gammaproteobacteria*, enquanto que a comunidade acessada de forma independente de cultivo apresentou grande porcentagem das ordens *Alpha* e *Gammaproteobacteria*.

Além deste filo, os filós *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram acessados nas duas metodologias (Tabela 7).

Tabela 7 – Porcentagem dos gêneros bacterianos acessados de forma dependente de cultivo e comparação com a porcentagem destes gêneros acessados de forma independente de cultivo

Gêneros	Dependente		Independente	
	Sintomático	Assintomático	Sintomático	Assintomático
<i>Pseudomonas</i>	19,9	1,4	17,7*	0,2
<i>Erwinia</i>	5,8	1,4	N.A.	N.A.
<i>Entereobacter</i>	10,3	25,7	N.A.	0,1
<i>Pantoea</i>	17,3	1,4	14*	0
<i>Serratia</i>	3,2	7,1	10,9*	0,1
<i>Acinetobacter</i>	1,9	22,9	10,9*	0,1
<i>Microbacterium</i>	1,3	1,4	N.A.	N.A.
<i>Stenotrophomonas</i>	20,5	2,9	1,3*	0
<i>Brevundimonas</i>	1,3	0,0	0,3	0,2
<i>Sphingobacterium</i>	1,3	0,0	3,5	1,1
<i>Bacillus</i>	12,8	25,7	0,2	0,4
<i>Cronobacter</i>	0,6	0,0	2,2*	0
<i>Curtobacterium</i>	0,6	1,4	1,0*	0,2
<i>Comamonas</i>	2,6	0,0	0,1	N.A.
<i>Rhizobium</i>	0,6	0,0	0,8*	0
<i>Klebsiella</i>	0,0	4,3	N.A.	N.A.
<i>Burkholderia</i>	0,0	1,4	1,4	1,2
<i>Dyella</i>	0,0	1,4	0,2	0
<i>Staphylococcus</i>	0,0	1,4	0,1	0

N.A. – Não acessado;

0 – Acessado com frequência menor que 0,01;

* Diferença significativa $P > 0.05$.

Quanto aos gêneros acessados de forma dependente de cultivo, os gêneros *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas* foram acessados preferencialmente nas duas metodologias, em folhas sintomáticas. Já nas folhas assintomáticas, houve

discrepâncias em alguns gêneros acessados. *Acinetobacter* que foi acessado preferencialmente em tecido assintomático, na metodologia não dependente de cultivo, foi acessado preferencialmente em tecido sintomático na metodologia independente de cultivo. Assim como o gênero *Enterobacter* que quase não foi acessado de forma independente de cultivo.

Porém, o gênero *Bacillus*, apesar de ter sido acessado em menor porcentagem na metodologia independente de cultivo, apresentou o mesmo padrão na metodologia dependente de cultivo, onde apresentou maior porcentagem em folhas assintomáticas.

2.3.4 Ensaio de antagonismo

Por meio da análise qualitativa, foi possível observar que 12,34% e 8,33% dos isolados endofíticos de folhas sintomáticas e assintomáticas, respectivamente, e 14,92% e 12,50% dos isolados epifíticos de folhas sintomáticas e assintomáticas, respectivamente apresentaram potencial de inibição fúngica. Sendo que tanto entre o estado fisiológico, como entre as comunidades (epi e endofítico), não foi encontrado diferenças significativas ($P > 0,05$) entre isolados com e sem potencial antagonico por meio de testes não paramétricos de qui-quadrado realizado nas amostras.

Os isolados antagonicos foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Bacillus* (7 isolados), *Stenotrophomonas* (3 isolados), *Pantoea* (3 isolados), *Erwinia* (3 isolados), *Entereobacter* (3 isolados), *Pseudomonas* (2 isolados), *Acinetobacter* (1 isolado), *Serratia* (1 isolado) e *Comamonas* (1 isolado) (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 – Identificação dos isolados epifíticos que apresentaram algum grau de inibição contra os dois isolados, L1 e L3, do gênero *Colletotrichum* spp

Amostra	Identificação	Similaridade ^a	Ref. NCBI
EpD1-2*	<i>Pantoea agglomerans</i>	99%	EF522135
EpD2-5*	<i>Bacillus vallismortis</i>	100%	AY620954
EpD2-7*	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%	AM934698
EpD2-12*	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	AY553097
EpD2-17*	<i>Comamonas</i> sp.	100%	AJ550282
EpD3-10*	<i>Pantoea</i> sp.	99%	EF179817
EpD4-14*	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	99%	EU704826
EpD4-15*	<i>Bacillus</i> sp.	100%	AF290557
EpS4-9**	<i>Acinetobacter</i> sp.	100%	AB020207
EpS4-12**	<i>Bacillus pumilus</i>	100%	AY167879
EpS5-9**	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%	AJ884484
EpS5-11**	<i>Erwinia</i> sp.	100%	GQ157225

*Isolados de folha sintomática;

**Isolados de folha assintomática;

^a - Similaridade com sequências do banco de dados do NCBI, indicada na coluna ao lado – Ref. NCBI.Tabela 9 – Identificação dos isolados endofíticos que apresentaram algum grau de inibição contra os dois isolados, L1 e L3, do gênero *Colletotrichum* spp

Amostra	Identificação	Similaridade ^a	Ref. NCBI
FD1-8*	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100%	AY345576
FD1-11*	<i>Pantoea dispersa</i>	100%	EF522135
FD1-16*	<i>Erwinia</i> sp.	99%	EU704826
FD2-12*	<i>Erwinia persicina</i>	100%	GQ157225
FD2-14*	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%	AJ884484
FD4-8*	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99%	AJ251468
FD4-13*	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%	AJ884484
FD4-14*	<i>Bacillus cereus</i>	99%	AB050630
FD5-12*	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	AY553097
FD5-13*	<i>Serratia</i> sp.	100%	AJ297950
FS3-3**	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100%	AJ251468
FS3-4**	<i>Serratia marcescens</i>	100%	AJ297950
FS3-11**	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	AJ276351

*Isolados de folha sintomática

**Isolados de folha assintomática

^a - Similaridade com sequências do banco de dados do NCBI, indicada na coluna ao lado – Ref. NCBI.

Após a triagem inicial, os isolados citados (Figura 8 e 9) acima foram submetidos a um ensaio quantitativo, também *in vitro*, com o fungo *Colletotrichum* sp. (L1). Este ensaio foi realizado apenas com o isolado fúngico L1 justamente por não ter

sido observada diferença de atividade antagônica dos isolados bacterianos entre os dois isolados fúngicos L1 e L3.

Os isolados que apresentaram maior porcentagem de inibição fúngica pertenciam ao gênero *Bacillus*, tanto entre isolados epifíticos (Ep2D5, Ep2D12, com aproximadamente 55% e 30% de redução no crescimento de *Colletotrichum* sp. L1, respectivamente, quando comparado ao controle. (Figura 13 A1 e 14 A). Entre os isolados endofíticos destacam-se FD4-14, FD5-12, FS3-11, com aproximadamente 35% e 30%, 25% de redução no crescimento do fungo, respectivamente (Figura 13 B1).

Porém, dentre os isolados endofíticos, outros gêneros apresentaram grande potencial de inibição: *Stenotrophomonas* (FD2-14), com aproximadamente 25% de redução no crescimento do fungo e *Serratia* (FD5-13, FS3-4), com aproximadamente 20% e 25% de redução no crescimento do fungo, respectivamente (Figura 14 C).

Dentre os isolado epifíticos, destacaram-se dois isolados do gênero *Pseudomonas* (EpD2-7, EpD4-14, com aproximadamente 23% e 20% de redução no crescimento do fungo, respectivamente) e um isolado do gênero *Stenotrophomonas* (Ep5S9, com aproximadamente, 25% de atividade antagônica) (Figura 14 B), sendo esses isolados importantes candidatos para o controle da antracnose.

Figura 13 – Porcentagem de antibiose *in vitro* do fungo *Colletotrichum* sp. (isolado L1) pelos isolados epifíticos (A1) e endofíticos (B1) do guaranazeiro. As barras apresentadas são a média $\pm$ desvio padrão de três repetições (* - isolados que não apresentaram antagonismo na triagem inicial)

Figura 14 – Isolados que mostraram atividade antagônica contra o fungo *Colletotrichum* L1, sendo A – Ep2D5 – gênero *Bacillus*; B – Ep5S9 – gênero *Stenotrophomonas*; C – F5D13 – gênero *Serratia*

2.3.5 Produção de enzimas hidrolíticas e sideróforos

As bactérias epifíticas e endofíticas isoladas foram testadas *in vitro* quanto à produção de determinadas enzimas hidrolíticas: celulase, amilase, lipase, esterase, protease, pectino-liase e poligalacturanase. Além destas enzimas, os isolados também foram testados quanto à produção de sideróforos.

Figura 15 – Porcentagem dos isolados bacterianos do guaranazeiro que apresentaram produção de enzimas hidrolíticas e sideróforo

De maneira geral os isolados bacterianos foram capazes de produzir enzimas

hidrolíticas e sideróforo, sendo que 44% produziram protease, 41% produziram sideróforo, enquanto que a produção das outras enzimas hidrolíticas variou de 23 a 12% de isolados capazes de produzi-las (Figura 15).

Quanto aos diferentes estados fisiológicos 40% dos isolados de plantas sintomáticas e 45% dos isolados de plantas assintomáticas produziram protease. Porém, maior número de isolados de planta assintomática produziram enzimas hidrolíticas que os isolados de planta sintomática, principalmente quando se compara a produção de: amilase, lipase e poli-galacturanase (Figura 16). Em relação à produção de sideróforos, não foi observada grande diferença entre os isolados de folha assintomática ou sintomática. Todavia, o que se observa é que uma porcentagem considerável de isolados é capaz de produzir sideróforos (Figura 16).

O teste não paramétrico de qui-quadrado foi realizado nas amostras para saber se havia diferença significativa entre a porcentagem de isolados produtores de determinada enzima em relação ao tratamento, ou seja, se proveniente de tecido assintomático ou sintomático e isolado epi ou endofiticamente. Para valores significativamente diferentes ($P > 0,05$) estão discriminados nos gráficos por asteriscos.

Figura 16 – Porcentagem dos isolados bacterianos, de cada estado fisiológico (folha sintomática e assintomática) que produziram enzimas hidrolíticas e sideróforos. * Com diferença significativa de $P > 0,05$.

Com relação aos isolados das diferentes comunidades (endofítica e epifítica), foi possível observar que, aproximadamente, 50% dos isolados endofíticos produziram protease e sideróforo, em contraste com aproximadamente 40% dos isolados epifíticos. As duas únicas enzimas hidrolíticas que os isolados epifíticos produziram em maior

quantidade, quando comparado com isolados do outro tecido, foram a celulase e a esterase (Figura 17).

Figura 17 – Porcentagem dos isolados, de cada tecido (epifítico e endofítico) que produziram enzimas hidrolíticas e sideróforo. * Com diferença significativa de $p > 0,05$.

Dentre os gêneros isolados, observaram-se que uma grande porcentagem dos isolados do gênero *Bacillus* produzem as várias enzimas hidrolíticas e sideróforo (Figura 18). Entretanto, outros gêneros produtores de enzimas hidrolíticas e sideróforos, destacam-se os gêneros *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Erwinia* e *Stenotrophomonas*.

Figura 18 – Porcentagem dos isolados dos gêneros com maior abundância relativa que produziram enzimas hidrolíticas e sideróforo.

2.4 Discussão

Muitos são os fatores a serem considerados para uma abordagem eficiente na escolha e utilização de agentes de controle biológico (ACBs). Não fosse isso, os estudos que buscam ACBs não seriam muitas vezes discrepantes entre a inibição encontrada *in vitro* e no campo (XU et al., 2011). Os estudos de ecologia microbiana da planta hospedeira, de ecologia do patógeno e de metodologias eficientes na busca dos ACBs estão entre as abordagens mais importantes a serem consideradas na busca e obtenção de sucesso no controle biológico.

O controle biológico realizado através de microrganismos de ocorrência natural na planta pode ser uma maneira eficiente e menos invasiva para o vegetal. Para tanto, é necessário entender a ecologia microbiana presente na planta hospedeira e o impacto destes microrganismos no seu crescimento e na sua sanidade. (FÜRNKRANZ et al., 2012). Assim sendo, o contexto ecológico da tolerância de um cultivar deve levar em conta um amplo aspecto de microrganismos que beneficiam ou prejudicam o hospedeiro e o patógeno. Neste contexto, acredita-se que existam muitos microrganismos presentes na relação patógeno-hospedeiro e que a tolerância de um determinado cultivar poderia ser atribuída a interação com outros microrganismos que, de alguma forma, reduzem a capacidade do patógeno de infectar a planta (NEWTON; GRAVOUIL; FOUNTAINE, 2010).

Além dos fatores ecológicos, a busca e detecção de microrganismos com potencial de controle biológico dependem de uma metodologia eficiente de triagem, onde frequentemente necessita-se da análise de centenas de isolados para encontrar apenas alguns com características favoráveis para o controle, como a capacidade de colonizar e competir por nutrientes e/ou sítios onde o patógeno interage com a planta (MONTESINOS, 2000).

Desta forma, compreende-se a importância do estudo da comunidade microbiana presente nas plantas e dos fatores que podem atuar na modificação e/ou reestruturação destas. A variação de diversidade e entre as estruturas de comunidades bacterianas, tanto ao longo do tempo, como por diferenças fisiológicas, e também por habitarem diferentes espécies de plantas já foram reportadas em vários trabalhos (GARDENER; WELLER, 2001; ARAÚJO et al., 2002b; BENÍTEZ et al., 2007; LAMBAIS et al., 2006).

O ambiente foliar, onde o patógeno *Colletotrichum* sp. causador da antracnose se instala no desenvolvimento da doença no guaranazeiro e em outras culturas, tem uma

ecologia microbiana complexa. De maneira geral, a filosfera contém dois distintos ambientes a ser colonizados: a superfície foliar e o meio intercelular. A estruturação da comunidade bacteriana está sujeita às pressões do meio em que ela se insere e também às variações existentes neste meio ao longo do tempo. Como exemplo, na superfície foliar tem-se um ambiente mais exposto aos estresses e variações abióticas, como limitação de nutrientes, disponibilidade de água, mudança na temperatura e exposição direta a radiação UV (MORNIER; LINDOW, 2003). Já no meio endófito há maior provisão de nutrientes, diminuição dos estresses ambientais, além da diminuição da competitividade microbiana (SCHULZ; BOYLE, 2005), porém é um ambiente onde os microrganismos ficam mais expostos a possíveis respostas de defesa vegetal por conta de moléculas elicitoras (HIRSCH, 2004).

Por sua vez, um estado fisiológico alterado, como o aparecimento de uma doença, pode causar uma perturbação no meio foliar, especialmente no caso da antracnose do guaranazeiro, onde há o aparecimento de lesões necróticas. Além desta alteração, o patógeno poderá promover a reestruturação do meio através de vários mecanismos, que incluem competição por nutrientes e espaço, produção de metabólitos, mudança no nicho e *cross-talk* entre patógeno-microrganismo (TRIVEDI; DUAN; WANG, 2010).

No guaranazeiro foi possível observar que entre os diferentes estados fisiológicos e as comunidades endofítica e epifítica estudadas, houve diferenças significativas nas comunidades bacterianas cultivadas encontradas. A presença da doença pareceu ser o fator que mais influenciou na composição da comunidade bacteriana, quando comparado com bactérias epifíticas ou endofíticas de onde o isolado proveio. O padrão de distribuição dos gêneros foi mais parecido, tanto com relação ao número de gêneros compartilhados, quanto em relação à porcentagem dentro de cada gênero, entre as comunidades epifíticas e endofíticas. Beattie e Lindow (1995) sugeriram que os termos 'endofítico' e 'epifítico' deveriam ser vistos mais como padrão de crescimento de microrganismos na folha do que dois grupos distintos propriamente ditos, porque durante a colonização das plantas, estes microrganismos podem sofrer fases egressão e ingressão (BEATTIE; LINDOW, 1999, NEWTON; GRAVOUIL; FOUNTAINE, 2010). Melnick et al. (2008) monitorou o padrão de colonização de duas linhagens de *B. cereus*, sendo que esta ocorreu primeiramente de forma epifítica, depois endofítica. Este padrão, talvez, possa explicar a considerável similaridade dos gêneros presentes nesses dois ambientes.

Apesar de compartilharem muitos gêneros, a população endofítica do guaranazeiro, independente do estado fisiológico, apresentou maior riqueza e maior diversidade, quando comparado com a população epifítica, resultado observado através dos índices de Chao1 e Shannon.

Resultados semelhantes foram descritos por Santamaría e Bayman (2005), pois quando compararam a comunidade endofítica com a epifítica cultiváveis de fungos, notaram que a riqueza, calculado pelo índice de Chao1, era maior na comunidade endofítica, sendo que também relataram que os gêneros mais frequentes estavam presentes em ambas comunidades. Já Kuklinsky-Sobral (2003) ao estudar a comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja, encontrou maior diversidade entre os isolados da comunidade endofítica.

Já o aparecimento da doença pareceu acarretar no aumento da diversidade e diminuição da riqueza da comunidade bacteriana cultivada, independente da comunidade acessada, quando comparado com as bactérias isoladas de folhas assintomáticas. O maior valor de diversidade encontrado em tecidos sintomáticos do guaranazeiro pode estar ligado com o fato de o cálculo da diversidade envolver dois parâmetros: riqueza e abundância relativa. Como a densidade bacteriana encontrada em tecidos sintomáticos foi maior, pode ter sido este o fator que inflacionou o valor da diversidade, uma vez que a riqueza bacteriana encontrada em plantas assintomáticas foi maior. No entanto, Suda et al. (2009) que também reportaram diferenças na composição de comunidades bacterianas epifíticas cultivadas de pepinos infectados e não infectados por oídio, verificaram a presença do patógeno provocou aumento na riqueza e diversidade bacteriana, índices calculados por Margalef's e Shannon, respectivamente.

As diferenças encontradas nos índices de riqueza e diversidade refletiram as diferenças encontradas nos táxons das bactérias cultivadas. O filo mais abundantemente acessado foi *Proteobacteria*, sendo que dentro deste filo a classe *Gammaproteobacteria* foi a mais abundante. O segundo filo mais acessado foi *Firmicutes*. As diferenças na comunidade bacteriana, no entanto, foram também observadas ao nível de gênero. Folhas sintomáticas apresentaram preferencialmente bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas* e *Erwinia*, enquanto que folhas assintomáticas tinham maior porcentagem dos isolados do gênero *Enterobacter*, *Stenotrophomonas* e *Bacillus*. Essa diferença foi muito menos acentuada quando se comparam isolados epifíticos e endofíticos. Reiter et al. (2002) isolou endófitos do gênero *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* em caule de batata que apresentavam infecção por *Erwinia*

carotovora subsp. *atroseptica*. Araújo et al. (2002a) reportaram em seu trabalho diferenças significativas entre gêneros de bactérias endofíticas isoladas de plantas sintomáticas e com assintomáticas de Clorose Variegada de Citrus (CVC), sendo mais frequentemente isolados as espécies *Methylobacterium* spp. e *Curtobacterium flaccumfaciens* em plantas sintomáticas e assintomáticas, respectivamente.

O número de sequências investigadas por estudos dependentes de cultivo é, muitas vezes, limitado. Desta forma, tende-se a isolar principalmente membros dominantes da comunidade, deixando a extensão da diversidade bacteriana por ser detectada (WHIPPS et al., 2008). Yashiro et al. (2011) ao estudar a comunidade bacteriana presente em folhas de maçã, de forma dependente e independente de cultivo, encontrou uma quantidade 100-1000 vezes superior na estimativa de população quando utilizadas metodologias independente de cultivo.

De fato, a comunidade bacteriana do guaranazeiro acessada pelo sequenciamento da região hipervariável V4 do gene 16S rDNA feita através do pirosequenciamento, foi mais diversa e rica que a acessada pela metodologia dependente de cultivo. Outros estudos demonstraram essa diferença, onde a filosfera demonstrou-se muito mais diversa do que anteriormente, quando a comunidade microbiana foi acessada através de técnicas moleculares como pirosequenciamento, DGGE e outras técnicas (ARAÚJO et al., 2002b; SUDA; NAGASAKI; SHISHIDO, 2009; TRIVEDI; DUAN; WANG, 2010). Yang et al. (2001) encontraram maior complexidade que se esperava em comunidades de bactérias associadas à folha através de análises baseadas no gene 16S rDNA. Encontraram muitos organismos não-cultivados, onde as sequências obtidas coincidiam apenas 90% com as depositadas nos bancos de dados. Lambais et al. (2006) avaliaram a diversidade bacteriana presente duas espécies de plantas da mata Atlântica através do sequenciamento parcial do gene 16S e também encontraram um nível de biodiversidade de bactérias presente na filosfera muito maior que o conhecido.

Quanto à influência da doença na comunidade bacteriana, dados do pirosequenciamento de folhas com e sem sintomas da antracnose do guaranazeiro demonstraram maior diversidade bacteriana em folhas sintomáticas, porém maior riqueza bacteriana em folha assintomática. Reiter et al. (2002) ao acessar, de forma independente de cultivo, a resposta da comunidade endofítica da batata à infecção por *E. carotovora* subsp. *atroseptica* encontraram populações distintas entre ramos sadios e infectados, sendo maior o valor de diversidade encontrado na última. Já em parreiras

afetadas por amarelecimento da videira, plantas sadias apresentaram maior diversidade na comunidade endofíticas de bactérias acessadas pela metodologia independente de cultivo (BULGARI et al., 2011).

É difícil determinar quais são os fatores que promovem modificações na comunidade bacteriana, uma vez que poucos são os estudos que correlacionaram as interações existentes entre a planta hospedeira, a infecção fúngica e a comunidade bacteriana (SUDA; NAGASAKI; SHISHIDO, 2009). Estudos como o de Reiter et al. (2002), que reportou maior diversidade bacteriana em tecidos sintomáticos, estudou doença cujo patógeno causou degradação, em algum nível, na folha. O aparecimento destas lesões pode estar relacionado com a entrada de várias outras bactérias nos tecidos internos da planta (TRIVEDI; DUAN; WANG, 2010).

Porém, no caso do guaranazeiro, as folhas assintomáticas apresentaram maior riqueza que as folhas sintomáticas em ambas as técnicas dependente e independente de cultivo. Portanto, o aumento da diversidade neste ambiente talvez não esteja ligado com o fato de outros grupos bacterianos serem capazes de colonizar a folha sintomática, mas sim com o fato de ocorrer aumento na abundância de alguns grupos bacterianos da comunidade. Sagaram et al. (2009) reportaram a presença de 9 táxons significativamente mais abundantes nas nervuras de folhas de citrus com sintomas de *Huanglongbing* (*Greening*), quando comparado com folhas assintomáticas.

De forma geral, o estudo realizado da comunidade bacteriana da filosfera do guranazeiro de maneira independente de cultivo reportou os principais filos que foram previamente associados à filosfera. O filo mais abundante foi *Proteobacteria*, seguido de outros filos menos abundantes como *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Verrucomicrobia*. Ainda foi possível relatar a presença de filos como TM7, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmationadetes*, *Armatimonadetes*, OD1, *Chlamydiae* e *Tenericutes* que apareceram em baixíssima frequência.

Da mesma maneira o trabalho de Kim et al. (2012) reportou a presença do filo *Proteobacteria* como o mais abundante em folhas de seis árvores estudadas de regiões subtropicais e temperadas da Malásia. Os autores também reportaram outros filos como *Betaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, OP10 e TM7 em menor abundância. E também Sagaram et al. (2009) reportaram o filo *Proteobacteria* como mais abundante (47,1%) das sequências, seguido de *Bacteroidetes* (14.1%), outros filos menos abundantes foram encontrados como *Acidobacteria*, *Chlamydiae*, *Firmicutes*, TM7 e *Verrucomicrobia*.

De maneira geral, a presença de diversos filos bacterianos encontrados na filosfera do guaranazeiro, indica um potencial reservatório de espécies que apresentam funções biológicas de interesse no quesito planta-microrganismo.

Proteobacteria é um filo comumente associado à filosfera e que contém diversas espécies conhecidos por suas funções biológicas de importância ecológica e econômica (ANDREWS; HARRIS, 2000; HAYWARD et al., 2010). Outro filo comumente reportado e de importância ecológica reconhecida, especialmente voltada para o controle de fitopatógenos, é o filo *Firmicutes* (KLOEPPER et al., 2004). Já o filo *Bacteroidetes* tem espécies conhecidas por produção de biocompostos atuantes na relação planta-microrganismo (MARQUES et al., 2010). *Actinobacteria* é um filo conhecido pelo potencial de produção de biocompostos de interesse biológico (MIAO; DAVIES, 2010). Já os filos *Acidobacteria* e *Verrumicrobia* são comumente relacionados com o ambiente de solo e rizosfera, sendo encontrado muitas vezes em grande abundância nestes locais (ROCHA; van ELSAS; van OVERBEEK, 2010).

O aparecimento da doença provocou alterações significativas na taxonomia da comunidade bacteriana presente na folha acessada de forma independente de cultivo. Os táxons mais abundantes foram reportados em ambos os estados fisiológicos, como *Alpha*, *Beta* e *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroides* e *Firmicutes* quando acessados através de metodologia independente de cultivo. Araújo et al. (2002b) e Hjort et al. (2007) reportaram em seus trabalhos que a diversidade bacteriana, acessada através do gene 16S na técnica de DGGE, pareceu não demonstrar diferenças significativas no padrão de bandas com o aparecimento da doença. Isso talvez explique o padrão aqui encontrado, onde os principais filos são reportados nas folhas com e sem sintoma da antracnose. Porém, foram encontrada diferenças nas abundâncias dos filos presentes nas folhas do guaranazeiro, com diferenças dentro de classes e gêneros desses filos nas folhas sintomáticas e assintomáticas.

Nas folhas sintomáticas a classe *Gammaproteobacteria* foi a mais abundante, quando acessada de forma independente de cultivo. Sagaram et al. (2009) entretanto, reportou a presença de certas ordens da classe *Gammaproteobacteria* em folhas de citrus sem sintomas de *Huanglongbing*, como *Pseudomonadaceae* e *Moxallaceae*. Tridevi et al. (2010) também reportou a presença predominante de gêneros *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas* em rizosfera de citrus onde não havia o patógeno da doença *Huanglongbing*, porém o gênero *Pseudomonas* foi reportado na rizosfera sintomática. No guaranazeiro, as folhas sintomáticas tiveram prevalência dos

gêneros *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Acinetobacter* quando comparado com folhas assintomáticas.

Trivedi, Duan e Wang (2010) e Sagaram et al. (2009) reportaram que os táxons encontrados na rizosfera e em folhas, respectivamente, sem a presença da doença, são conhecidos na literatura por possuírem potencial de biocontrole. Porém, nenhum dos autores pode precisar qual o papel real das bactérias destes gêneros em relação à doença de *Huanglongbing*.

Já a classe *Alphaproteobacteria* foi a segunda mais abundante nos tecidos sintomáticos e a primeira mais abundante nos tecidos assintomáticos, considerando a metodologia independente de cultivo. Os gêneros mais abundantemente acessados foram *Methylobacterium*, *Beijerinckia* e um grupo não classificado de *Rhizobiales*. Estes gêneros foram reportados, predominantemente, em tecidos assintomáticos. Ao contrário do que foi reportado em Sagaram et al. (2009), que encontrou uma maior abundância da classe *Alphaproteobacteria* nas plantas sintomáticas e esse aumento pareceu ser dado por conta do aumento de bactérias das ordens *Caulobacterales*, *Sphingomonadales* e *Rhizobiales*. Em Trivedi, Duan e Wang (2010) a presença da doença reestruturou a comunidade associada à raiz de citrus, promovendo o estabelecimento de bactérias do gênero *Methylobacterium* e *Sphingobacterium*. Araújo et al. (2002b) relacionou a presença dos sintomas de CVC e o frequente isolamento de bactérias do gênero *Methylobacterium*.

Trabalhos posteriores ao de Araújo et al. (2002b), que continuaram a pesquisar a possível interação dos isolados bacterianos do gênero *Methylobacterium* com o patógeno *X. fastidiosa*, demonstraram que quando inoculado a espécie *M. extorquens* havia um estímulo no crescimento do fitopatógeno *X. fastidiosa*, enquanto que quando inoculado com a espécie *M. mesophilicum*, apresentava-se uma redução no crescimento do patógeno (LACAVA et al. 2004). Dessa maneira, a abundância de um gênero bacteriano na lesão pode não estar correlacionada com o benefício e/ou o aumento do crescimento do patógeno e, conseqüente, aumento da infecção. Ali também podem estar presentes microrganismos que competem pelo espaço e/ou nutrientes, que produzam compostos com potencial antagônico, ou então que não interajam diretamente com o patógeno.

Considerando o filo *Acidobacteria*, também foi observada diferença quanto aos grupos mais representativos nas folhas, sendo que o grupo mais representativo nos tecidos sintomáticos e assintomáticos foi *Acidobactéria_GPI*, ocorrendo também no

tecido assintomático o grupo *Acidobacteria_GP2* e *Granulicella*.

Acidobacteria é um filo comumente reportado no solo. Lima (2011) reportou, em um estudo realizado sobre a diversidade microbiana do solo de três localidades distintas, como filo mais abundante o *Acidobacteria*, seguido de *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*. Em Roesch et al. (2007), apesar de 40% das sequências encontradas no solo pertenciam ao filo *Proteobacteria*, o filo *Acidobacteria* também era predominante no solo.

É interessante esta comparação entre a comunidade pertencente ao solo e a comunidade pertencente à filosfera porque o filo *Acidobacteria*, que é frequentemente encontrada no solo, muitas vezes é detectado em baixa frequência ou então, não é detectado como representante da filosfera (SAGARAM et al., 2009). Porém, no trabalho de Kim et al. (2012) o filo *Acidobacteria* foi reportado em todas as plantas tropicais estudadas (média de 17%) e sua abundância pareceu relacionar-se com a taxonomia da composição da comunidade das bactérias desse grupo dominante no solo.

Apesar da grande abundância do filo *Acidobacteria* no solo e rizosfera, o papel desempenhado por espécies deste grupo ainda não foram elucidado (ROCHA et al., 2010). Também parece não haver dados na literatura sobre este grupo e seu potencial de biocontrole e/ou relação com fitopatógenos. O mesmo acontece com o filo *Verrucomicrobia*, que foi acessado na folha assintomática do guaranazeiro, apresentando representantes do gênero *Opitutales*, que é comumente reportado em solos e rizosfera, porém, pouco se sabe sobre a sua função (ROCHA, 2010).

Nas folhas de guaraná ainda foi identificado o filo *Firmicutes*. A classe “*Bacilli*” foi preferencialmente encontrada em tecidos assintomáticos. Os gêneros como *Lactococcus*, *Carnobacterium* e *Enterococcus* presentes em maior abundância na folha assintomática. Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* foram reportados em rizosfera de citrus assintomática, sendo que estes gêneros apresentam espécies conhecidas por realizar o controle biológico (TRIVEDI; DUAN; WANG, 2010). Já Bulgari et al. (2011) verificou que duas espécies da classe “*Bacilli*”, *B. pumilus* e *P. pasadenensis*, acessadas de forma independente de cultivo, somente estavam presentes em plantas que não apresentavam amarelecimento da videira, sendo que estas espécies são conhecidas como indutores de resistência em plantas.

Apesar de terem sido reportados 12 filos presentes na comunidade bacteriana da filosfera do guaranazeiro, uma grande porcentagem de sequências acessadas através de pirosequenciamento, tanto no tecido sintomático quanto no assintomático, não

puderam ser afiliadas a nenhuma das sequências de gene 16S rDNA presentes no banco de dados ribossomal do *Ribosomal Database Project*. Sendo assim, estas sequências foram consideradas como sequências não-classificadas. Lambais et al. (2006) reportaram que 97% das sequências de folhas de plantas da mata Atlântica pertenciam a espécies desconhecidas. Lopes-Vasco et al. (2011) reportou em sua amostra de folhas de espinafre uma porcentagem alta (75%) de sequências de não-cultivados.

Apesar de serem sequências não classificadas foi possível encontrar diversidade através de análises feitas baseando-se nas UTOs formadas. Foi possível, inclusive, observar que dentro das bactérias não-cultivadas havia diferenças entre tecido sintomático e assintomático. Estas bactérias podem ter papéis importantes na sua relação com a planta e também na sua relação com o patógeno. Melhores metodologias de cultivo devem ser desenvolvidas para que se possam acessar essas bactérias através do seu cultivo para melhor entendê-las e caracterizá-las (SIZOVA et al. 2012).

O presente estudo mostrou também que, apesar de serem metodologias com robustezes tão diferentes, encontraram-se os mesmos padrões de riqueza e diversidade em ambos as folhas sintomáticas e assintomáticas, além de acessarem grupos taxonômicos de maneira muito similar, como com os gêneros *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Algumas diferenças foram encontradas, como o gênero *Acinetobacter* que foi mais presente em tecidos assintomáticos como isolado, porém foi mais reportado em tecidos sintomáticos quando a comunidade bacteriana foi acessada através de pirosequenciamento. Outros trabalhos já reportam que as comunidades bacterianas acessadas através de metodologias dependente e independente de cultivo se assemelham (ARAÚJO et al., 2002a; SAGARAM et al., 2009).

Na tentativa de tentar compreender o papel desempenhado pelas bactérias presentes no guaranazeiro e sua relação com o patógeno, realizou-se com as bactérias isoladas epi e endofiticamente de folhas com e sem sintoma da antracnose no guaranazeiro, ensaios de antagonismo contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp. A porcentagem de isolados com potencial antagônico variou de 8% a quase 15%, dependendo do tecido ou estado fisiológico de onde as bactérias foram isoladas. Sessitsch, Reiter e Berg (2004) reportaram uma porcentagem de 14% de endofíticos da batata com potencial antagônico em relação ao fungo *Verticillium dahliae* em batata, já Brooks et al. (1994) verificaram que 20% dos endófitos apresentavam potencial antagônico em relação ao fungo *Ceratocystis fagacearum* em banana.

Foi possível observar também que o aparecimento da doença não pareceu afetar significativamente a quantidade de isolados com potencial antagonico, quando comparado com o tecido sadio. Isso também foi observado em relação as diferentes comunidades epifíticas e endofíticas, onde não foi encontrada diferença significativa quanto a porcentagem de isolados com potencial antagonico em relação ao fungo *Colletotrichum* sp. Reiter et al. (2002) encontrou 38% dos endofíticos da batata com potencial antagonico, porém, não encontrou relação entre o tecido do qual ele foi isolado, se com ou sem sintoma da doença, e este potencial. Dessa maneira, parece que o aparecimento da doença não foi um fator que influenciou na presença de bactérias com potencial antagonico ou não.

O papel dos gêneros reportados prevalentemente em tecidos sintomáticos na folha do guaranazeiro ainda necessita ser mais bem investigado. Porém, no presente trabalho, através dos ensaios de antagonismo com fitopatogênio *Colletotrichum* sp. foi possível encontrar isolados de folhas sintomáticas dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Pantoea* que inibiram e/ou retardaram o crescimento do fungo. Na literatura, estes gêneros já foram descritos com potencial antifúngico.

O gênero *Pseudomonas* é responsável pela produção de alguns compostos com propriedades antifúngicas, e ainda é conhecido pela indução de resistência sistêmica na planta hospedeira. O gênero é conhecido como capaz de interferir diretamente no fator de patogenicidade de alguns grupos de fungos (HAAS; DEFAGO, 1990). Viswanathan e Samiyappan (2004) descreveram algumas linhagens de *P. fluorescens* que apresentaram atividade antagonica contra o fitopatogênico *Colletotrichum falcatum*, sendo que estas mesmas linhagens foram avaliadas quanto à produção de enzimas quitinolíticas, correlacionando a atividade antifúngica destas bactérias à sua produção de quitinase.

Farhana, Bivi e Khairulmazmi (2011) descreveram um isolado do gênero *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia*) capaz de inibir *in vitro* o fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides*. Este ensaio foi realizado com a recuperação de substâncias antimicrobióticas produzidas por este isolado bacteriano. Já o mecanismo de controle biológico foi descrito em uma linhagem da bactéria *Pantoea dispersa* contra o patógeno de folha de cana *Xanthomonas albilineans* (ZHANG; BIRCH, 1997).

Um gênero abundante em tecido assintomático que inibiu o fitopatogênio da antracnose foi *Bacillus*, sendo que os isolados que apresentaram maior porcentagem de inibição pertenciam a este gênero. Remuska e Pria (2007) realizaram um trabalho cujo

objetivo foi avaliar o efeito antagonista de *B. thuringiensis*, largamente utilizado no controle biológico, principalmente em invertebrados, e no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Kim e Chung (2004) relataram atividade antagônica de um isolado de *B. amyloliquyefaciens* através da produção de proteína antifúngica contra o fitopatógeno *C. lagenarium*.

Bactérias pertencentes aos gêneros *Erwinia* e *Entereobacter* que foram isoladas de folhas com sintomas da antracnose, também se mostraram capazes de inibir o crescimento do fungo *Colletotrichum* sp, *in vitro*. A linhagem de *Enterobacter* sp. KB3 foi antagônica ao fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, causador de podridão da raiz no algodão, através da produção substâncias quitinolíticas que degradaram a hifa deste fungo (VELUSAMY; KIM, 2011). Já o isolado da espécie *E. herbicola* reduziu o crescimento dos fungos *Fusarium culmorum* e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* no trigo. (KEMPF; WOLF, 1989).

Finalmente, com relação ao potencial biotecnológico dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos, muitos demonstraram serem capazes de produzir sideróforos e enzimas hidrolíticas, como celulase, amilase, protease, esterase, pectino-liase e poligalacturanase. Além do valor comercial que pode ser atribuído às enzimas e sideróforos é interessante notar que, no ambiente onde estas enzimas são produzidas pelos isolados bacterianos, elas podem exercer diversas funções. Os microrganismos podem produzir algumas exoenzimas ou compostos antibióticos capazes de serem utilizadas no controle biológico (TROTEL-AZIZ et al., 2008). Além disso, estas mesmas enzimas podem estar relacionadas, direta ou indiretamente, ao aumento de biomassa na planta hospedeira (WEYENS et al., 2009).

Sessitch, Reiter e Berg (2004) reportaram que bactérias endofíticas isoladas da batata produziram um grande espectro de enzimas hidrolíticas. Grande parte, 43% produziram glucanase, 34% produziu protease e a maioria foi capaz de produzir sideróforos (77%). Endófitos têm de competir com a planta por Fe, portanto, a produção pode ser importante para o crescimento destes microrganismos. No guaranazeiro, foram reportadas cerca de 50% e 40% de bactérias isoladas com potencial de produção de sideróforo provenientes das comunidades endofíticas e epifíticas, respectivamente. Demonstrando assim, a sua possível importância para estes microrganismos.

A porcentagem de isolados produtores de enzimas hidrolíticas e sideróforo das comunidades endofíticas e epifíticas não mostrou diferenças significativas. Porém, a porcentagem de isolados provenientes de tecidos assintomáticos diferiram quanto a

produção das enzimas lipase, amilase e poligalacturanase, quando comparada com porcentagem de isolados provenientes de tecido sintomático.

Estas enzimas também podem estar relacionadas com a penetração dos microrganismos endofíticos nas folhas, uma vez que não há a lesão da antracnose nos tecidos assintomáticos. Cho et al. (2007) estudaram endófitos de diferentes grupos taxonômicos e o ponto em comum entre eles foi o fato de que estas bactérias apresentaram alta atividade enzimática. Isolados do gênero *Bacillus* produziram celulase e pectinase. Foi sugerido que enzimas hidrolíticas são produzidas pelos endófitos somente na época de invasão e não enquanto habitantes do meio intracelular, portanto, desempenhariam um papel importante na interação planta-microrganismo.

Estas enzimas ainda poderiam estar relacionadas com a prevenção da infecção do patógeno, principalmente a produção de poligalacturanase que está relacionada com a degradação de parede celular. Trivedi, Duan e Yang (2011) observaram uma maior frequência de isolados bacterianos provenientes de amostras assintomáticas que possuíam características que beneficiam as plantas, como a produção de antibióticos e enzimas líticas. Porém, Sessitsch, Reiter e Berg (2004) demonstraram que a atividade enzimática dos isolados bacterianos não necessariamente correlacionou-se com o antagonismo do patógeno.

Quanto ao potencial biotecnológico destes gêneros, o gênero *Bacillus* apresentou uma grande porcentagem de isolados com potencial de produzir uma ou mais enzimas hidrolíticas e sideróforos. Schallmeyer et al. (2004) relatou em seu trabalho que *B. subtilis*, e linhagens de *Bacillus* relacionados, ainda são os microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas mais utilizados na microbiologia industrial ou aplicada. Além deste gênero, *Stenotrophomonas* também possui uma grande porcentagem de representantes que produziram lipase, esterase e protease. O sequenciamento do genoma de um isolado da espécie *S. maltophilia* codifica várias enzimas extracelulares, como protease, lipase, esterase, entre outras (CROSSMAN et al., 2008), demonstrando o potencial biotecnológico que esta espécie oferece.

De fato, o complexo de interações que permeiam a relação planta-patógeno-microrganismo é muito difícil de dissecar ao nível molecular, porém essa é uma abordagem essencial na tentativa de desenvolver estratégias eficientes de controle biológico (BEAK; HOWELL; KENERLEY, 1999). Uma metodologia multifásica, com técnicas moleculares, de microscopia e dependentes de cultivo foi aplicada na tentativa de selecionar um consórcio de endófitos para o controle biológico em doença de

abóbora (FÜRNFRANK et al., 2012). No presente trabalho houve a preocupação de tentar detalhar melhor os papéis dos microrganismos cultivados as relações exercidas entre os estes e o patógeno *Colletotrichum* sp., bem como o estudo do potencial biotecnológico dos mesmos.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho acessou de forma dependente e independente de cultivo a comunidade bacteriana associada ao guaranazeiro. As duas metodologias, apesar de poderes de robustez tão diferentes, acessaram alguns gêneros da mesma maneira; bem como reportaram os mesmos padrões de diversidade e riqueza, sendo encontrados valores maiores do primeiro em tecido sintomático e valores maiores do segundo em tecidos assintomáticos. Além disso, o aparecimento da doença causada pelo fungo *Colletotrichum* pareceu ser o fator que mais influenciou na composição da comunidade bacteriana cultivada do guaranazeiro.

O filo *Proteobacteria* foi preferencialmente acessado em ambas as metodologias, sendo encontradas diferenças entre os gêneros acessados de forma independente de cultivo e a presença da doença, onde os gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Pantoea* foram preferencialmente acessados em tecidos sintomáticos e o gênero *Methylobacterium*, *Lactococcus*, *Beijerinckia* e *Granilicella*. Já na metodologia dependente de cultivo os mesmos gêneros foram acessados em tecidos sintomáticos, enquanto que o gênero *Bacillus* e *Acinetobacter* foi acessados, preferencialmente, em tecidos assintomáticos. A presença de diferentes gêneros em plantas sintomáticas e assintomáticas pode servir de base para futuros estudos visando o controle da antracnose no guaranazeiro.

Quando testados contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp., isolados dos gêneros *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Entereobacter*, *Pseudomonas*, entre outros, apresentaram inibição do crescimento do fungo fitopatogênico.

Além disto, o potencial biotecnológico destas bactérias, quanto a produção de enzimas hidrolíticas e sideróforo foi avaliado, revelando que muitos isolados foram capazes de produzir protease e sideróforo, além de correlacionar a produção das enzimas amilase, lipase e poligalacturanase com a comunidade proveniente de tecidos sintomáticos.

Uma abordagem metodológica polifásica colabora com o entendimento do ambiente da filosfera do guaranazeiro, que apresenta interações complexas permeando a relação hospedeiro-patógeno-microrganismo endofítico e epifítico. Além disso, a busca por soluções mais ecológicas na prevenção e diminuição de doenças ocasionadas por fitopatógenos é interessante e de extrema importância para a manutenção do equilíbrio ecológico, bem como, da preservação do meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2009. 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.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 417-432, 2009.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.
- ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review Phytopathology**, Lawrence, v. 38, p. 145-180, 2000.
- ANGÊLO, P.C.S.; NUNES-SILVA, C.G.; BRIGIDO, M.M.; AZEVEDO, J.S.N.; ASSUNCAO, E.N.; SOUSA, A.R.B.; PATRICIO, F.J.B.; REGO, M.M.; PEIXOTO, J.C.C.; OLIVEIRA, W.P. JR; FREITAS, D.V.; ALMEIDA, E.R.P.; VIANA, A.M.H.A.; SOUZA, A.F.P.N.; ANDRADE, E.V.; ACOSTA, P.O.A.; BATISTA, J.S.; WALTER, M.E.M.T.; LEOMIL, L.; ANJOS, D.A.S.; COIMBRA, R.C.M.; BARBOSA, M.H.N.; HONDA, E.; PEREIRA, S.S.; SILVA, A.; PEREIRA, J.O.; SILVA, M.L.; MARINS, M.; HOLANDA, F.J.; ABREU, R.M.M.; PANDO, S.C.; GONCALVES, J.F.C.; CARVALHO, M.L.; LEAL-MESQUITA, E.R.R.B.P.; DA SILVEIRA, M.A.; BATISTA, W.C.; ATROCH, A.L.; FRANCA, S.C.; PORTO, J.I.R.; SCHNEIDER, M.P.C.; ASTOLFI-FILHO, S. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell**, Baltimore, v. 27, p. 117–124, 2008.
- ARAÚJO, I.L.; FREITAS, D.V.; NUNES-SILVA, C.G.; ASOLFI-FILHOS, S. Guaraná, os segredos moleculares de uma planta lendária. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 43, p. 30-35, 2009.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W. JR.; VAN ELSAS, J.D.; VUURDE, J.L.V.; 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, 2002a.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002b. 86 p.
- ASRAFUL ISLAM, S.; RENUKARADHYA, M.; JONG, K.; MYOUNG, Y.; JI, C.; EUN, K.; YOUNG, L. Han, Y. Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. **Current Microbiology**, New York, v. 61, p. 1-11, 2010.

ATROCH, A.L. **Avaliação e seleção de progênes de meios irmãos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (mart.) ducke) utilizando caracteres morfo-agronômicos**. 2009. 72 p. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos Endofíticos. IN: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**, Editora:Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, 1998. 488 p.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR. W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, p. 40-65, 2000.

BEAK, J-M.; HOWELL, C.R.; KENERLEY, C.M. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, New York, v. 35, p. 41-50, 1999.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacteria pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 33, p. 145–172, 1995.

_____. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, Lancaster, v. 89, p.353–359, 1999.

BENÍTEZ, M.S.; TUSTAS, F.B.; ROTENBERG, D.; KLEINHENZ, M.D.; CARDINA, J.; STINNER, D.; MILLER, S.A.; GARDENER, B.B.M. Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 39, p. 2289-2301, 2007.

BENTES, J.L.S.; BARRETO, R.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. agente causal da antracnose do guaranazeiro. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, p. 129-131, 2004.

BENTES, J.L.S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 71-77, 2002.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R.A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, p. 215–229, 2005.

BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. The biology of corn anthracnose - Knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 596-608, 1999.

BLAKEMAN, J.P.; BRODIE, I.D.S. Competition for nutrients between epiphytic micro-organisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 10, p. 29-42, 1977.

- BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 343–350, 2001.
- BROOKS, D.S.; GONZÁLEZ, C.F.; APPEL, D.N.; FILER, T.H. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. **Biological Control**, Orlando, v. 4, p. 373–381, 1994.
- BULGARI, D.; CASATI, P.; CREPALDI, P.; DAFFONCHIO, D.; QUAHLINO, F.; BRUSETTI, L.; BIANCO, P.A. Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 77, p. 5018–5022, 2011.
- 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.
- CHENEY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C.; 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121–128, 2000.
- CHO, K.M.; HONG, S.Y.; LEE, S.M.; KIM, Y.H.; KAHNG, G.G.; LIM, Y.P.; KIM, H.; YUN, H.D. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. **Microbial Ecology**, New York, v. 54, p. 341–351, 2007.
- COSTA NETO, P.Q. **Caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos *Colletotrichum* spp. isolados de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K. (Mart.) Ducke)**. 2009. 108p. Tese (Doutorado em Biotecnologia, Área de concentração: Conservação e Uso de Recursos Genéticos Microbianos da Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- CROSSMAN, L.C.; GOULD, V.C.; DOW, J.M.; VERNIKOS, G.S.; OKAZAKI, A.; SABAIHIA, M.; SAUNDERS, D.; ARROWSNITH, C.; CRAVER, T.; PETERS, N.; ADLEM, E.; KERHORNOU, A.; LORD, A.; MURPHY, L.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; RUTEER, S.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M-A.; HARRIS, D.; CHURCHER, C.; BENTLEY, S.D.; PARKHILL, J.; THOMSON, N.R.; AVISON, M.B. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 9, p. R74.1–13, 2008.
- EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Ocidental. **Cultura do guaranazeiro no Amazonas**. Manaus, 2005. 33 p. (Sistema de Produção, 2).
- EMMERT, E.A.B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 171, p. 1–9, 1999.
- FAO. **Food balance sheets**. Washington, 1995. 95 p.

FARHANA, M.S.N.; M.R. BIVI, A.; KHAIRULMAZMI, N. Effect of carbon sources on bacterial production of metabolites against *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **International Journal of Agricultura and Biology**, Pakistan, v. 13, p. 1–8, 2011.

FIGUEIRÊDO, L.C.; FARIA-CAMPOS, A.C.; ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, J.L. Identification and isolation of full-length cDNA sequences by sequencing and analysis of expressed sequece tags from guarana (*Paullinia cupana*). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto , v. 10, p. 1188-1199, 2011.

FREITAS, D.V.; CARVALHO, C.R.; NASCIMENTO FILHO, F.; ASTOLFI-FILHO, S. Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* ‘Sorbilis’). **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 120, p. 399-404, 2007.

FÜRNKRANZ, M.; LUKESCH, B.; MÜLLER, H.; HUSS, H.; GRUBE, M.; BERG, G. Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. **Microbial Ecology**, New York, v. 63, p. 418-428, 2012.

GARDENER, B.B.M.; WELLER, D.M. Changes in populations of rizhosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 4414-4425, 2001.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical microbiology reviews**, Washington , v.12, p. 454-500, 1999.

HAAS, D.; DEFAGO, G. **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1990. v. 6.

HALLMAN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Endophytic bacteria in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895–914, 1997.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, p. 597-607, 1975.

HAYWARD, A.C.; FEGAN, N.; FEGAN, M.; STIRLING, G.R. *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, p. 756–770, 2010.

HEANEY S.P.; HALL A.A.; DAVIES S.A.; OLAYA G. Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives. **The BCPC Conference: Pest & Disease**, Brighton, v. 2, p. 755–762, 2000.

HECKMAN, M.A.; WEIL, J.; MEJIA, E.G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, p. 77-87, 2010.

HIRSCH, A.M. Plant-microbe symbioses: a continuum from commensalism to parasitism. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 37, p. 1-19, 2004.

HJORT, K.; LEMBKE, A.; SPEKSNIJDER, A.; SMALLA, K.; JANSSEN, J.K. Community structure of actively growing bacterial populations in plant pathogen suppressive soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 399-413, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. Brasília, 2011. 102 p.

KEMPF, H.J.; WOLF, G. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. **Phytopathology**, Lancaster, v. 79, p. 990-994, 1989.

KIM, M.; SINGH, D.; LAI-HOE, A.; GO, R.; RAHIM, R.A.; AINUDDIN, A.N.; CHUN, J.; ADAMS, J.M. Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees. **Microbial Ecology**, New York, v. 63, p. 674-681, 2012.

KIM, P.I.; CHUNG, K. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 234, p. 177-183, 2004.

KLOEPPER, J.W.; RYU, C-M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 94, p. 1259-1266, 2004.

KORSTEN, L.; DE JAGER, E.S.; DE VILLIERS, E.E.; LOURENS, A.; KOTZÉ, J.M.; WEHNER, F.C. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 1149-1156, 1995.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (Glycine max) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 189p. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2003.

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

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

LEBEN, C. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Lancaster, v. 3, p. 209-230, 1965.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 187-209, 1986.

LIAN, J.; WANG Z.; ZHOU S. Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infection. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 54, p. 83-92, 2008.

LIMA, J.E. **Diversidade de bactéria e Archaea em solos da Mata Atlântica no estado de São Paulo**. 2011. 83 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1875–1883, 2003.

LOPEZ-VELASCO, G.; WELBAUM, G.E.; BOYER, R.R.; MANE, S.P.; PONDER, M.A. Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 110, p. 1203-1214, 2011.

MARQUES, A.P.G.C.; PIRES, C.; MOREIRA, H.; RANGEL, A.O.S.S.; CASTRO, P.M.L. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil biology and biochemistry**, Elmsford, v.42, p.1229-1235, 2010.

MELNICK, R.L.; ZIDACK, N.Z.; BAILEY, B.A.; MAXIMOVA, S.N.; GULTINAN, M.; BACKMAN, P.A. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 46-56, 2008.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COATA-MAIA, L; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, 2007. v. 1, p. 129-140.

MIAO, V.; DAVIES, J. *Actinobacteria*: the good, the bad and the ugly. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 98, p. 143-150, 2010.

MONIER, J.M.; LINDOW, S.E. *Pseudomonas syringae* responds to the environment on leaves by cell size reduction. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 1209-1216, 2003.

MONTESINOS, E. Pathogenic plant–microbe interactions. What we know and how we benefit. **International Microbiology**, Iberia, v. 3, p. 69-70, 2000.

MULETA, D.; ASSEFA, F.; GRANHALL, U. In vitro antagonism of *Rhizobacteria* isolated from *Coffea arabica* L. against emerging fungal coffee pathogens. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 7, p. 577–586, 2007.

MULLINS, T.D.; BRITSCHGI, T.B.; KREST, R.L.; GIOVANNONI, S.J. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 40, p. 148-158, 1995.

MUYZER, G.; DE WALL, 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 rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L. Guaranazeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**, Viçosa: UFV, 2002. p. 291-307.

NEWTON, A.C.; GRAVOUIL, C.; FOUNTAINE, J.M. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 157, p. 343-359, 2010.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p. 734-740, 1997.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, p. 186-198, 1999.

POTTER, M.C. Bacteria in their relation to plant pathology. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 3, p. 50-68, 1909.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P.W. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

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

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006.

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

REMUSKA, A.C.; PRIA, M.D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. Publ. UEPG Ci. **Exatas Terra**, Ponta Grossa, v. 13, p. 31-36, 2007.

ROCHA, U.N. **Ecology of Acidobacteria and Verrucomicrobia in the plant-soil ecosystem**. 2010. 200p. Tese (Doutorado em Matemática e Ciências Naturais) - Universidade de Groningen, Groningen, 2010.

ROCHA, U.N.; VAN ELSAS, J.D.; VAN OVERBEEK, L.S. Real-time PCR detection of Holophagae (*Acidobacteria*) and *Verrucomicrobia* subdivision 1 groups in bulk and leek (*Allium porrum*) rhizosphere soils. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 83, p. 141-148, 2010.

ROCHA, U.N.; ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; VAN ELSAS, J.D.; VAN OVERBEEK, L.S. Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the *Verrucomicrobia* subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere. **Journal of Soils and Sediments**, Oxford, v. 10, p. 326-339, 2010.

ROESCH, L.F.W.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPPLET, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, New York, v. 1, p. 283-290, 2007.

RYAN, R.P.; GERMAINE K.; FRANKS A.; RYAN D.J.; DOWLING D.N. Bacterial endophytes; recent developments and applications. **FEMS Microbiology Ecology**, Amstedam, v. 278, p. 1-9, 2008.

SAGARAM, U.S.; DEANGELIS, K.M.; TRIVEDI, P.; ANDERSEN, G.L.; LU, S-E.; WANG, N. Bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected citrus, using phylochip arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 1566-1574, 2009.

SANCHEZ, P.A.; VILLACHICA, J.H.; BANDY, D.E. Soil fertility dynamics after clearing a tropical rainsforest in Peru. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 47, p. 1171-1178, 1983.

SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 1-8, 2005.

SCHALLMEY, M. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 1-17, 2004.

SCHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, p. 1135-1145, 2008.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5485-5492, 2004.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SCHULTZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C. What are endophytes? In: SCHULTZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. (Org.). **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. 2006. p. 1-13.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 160, p. 47-56, 1987.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 239-249, 2004.

SIERRA, G.A. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonine van Leeuwenhoeck**, Wageningen, v. 28, p. 15-22. 1957.

SILVA, K.S.; REBOUÇAS, T.N.H.; LEMOS, O.L.; BOMFIM, M.P.; BOMFIM, A.A.; ESQUIVEL, G. L.; BARRETO, A.P.P.; JOSÉ, A.R.S.; DIAS, N.O.; TAVARES, G.M. patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, p. 131-133, 2004.

SIZOVA, M.V.; HOHMANN, T.; HAZEN, A.; PASTER, B.J.; HALEM, S.R.; MURPHY, C.M.; PANIKOV, N.S.; EPSTEIN, S.S. New approaches for isolation of previously uncultivated oral bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 1, p. 194-203, 2012.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUDA, W.; NAGASAKI, A.; SHISHIDO, M. Powdery mildew-infection changes bacterial community composition in the phyllosphere. **Microbes and Environments**, Xiamen, v. 24, p. 217-223, 2009.

TEILING, C.; HOWARD, J.; WINER, R.; KODIRA, C.D.; JARVIS, E. GS FLX+ data in the budgie genome assembly. In: PLANT & ANIMAL GENOME, 20., 2012, San Diego. **Proceedings...** Disponível em: <<https://pag.confex.com/pag/xx/webprogram/Paper1615.html>>. Acessado em: 05 mai 2012.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 43, p. 777-780, 1982.

TFOUNI, S.A.V.; CAMARGO, M.C.R.; VITORINO, S.H.P.; MENEGÁRIO, T.F.; TOLEDO, M.C.F. Contribution of guaraná powder (*Paullinia cupana*) as a source of caffeine in the diet. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, p. 63-68, 2007.

TRINGE, S.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 442-446, 2008.

TRIVEDI, P.; DUAN, Y.; WANG, N. Huanglongbing, a systemic disease, restructures the bacterial community associated with citrus roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 11, p. 3427-3436, 2010.

TROTEL-AZIZ, P.; COUDERCHETA, M.; BIAGIANTIB, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 64, p. 21-32, 2008.

VELUSAMY, P.; KIM, K.Y. Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. **Full Length Research Paper**, Sapele, v. 2, p. 206-214, 2011.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent *Pseudomonas* against *Colletotrichum falcatum* Went causing red rot disease in sugarcane. **Microbiological Research**, Jena, v. 155, p. 309-314, 2004.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N.T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 3889-3894, 2001.

YASHIRO, E.; SPEAR, R.N.; MCMANUS, P.S. Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 110, p. 1284-1296, 2011.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 379-407, 1988.

WEST, E. R.; COTHER, E. J.; STEEL, C.C.; ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 56, p. 209-216, 2010.

WEYENS, N.; LELIE, D.; TAGHAVI, S.; NEWMAN, L.; VANGRONSVELD, J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 27, p. 591-598, 2009.

WHIPPS, J.M.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G.D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, p. 1744-1755, 2008.

XU, X.M.; JEFFRIES, P.; PAUTASSO, M.; JEGER, M.J. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. **Phytopathology**, Lancaster, v. 101, p. 1024-1031, 2011.

ZHANG, L.; BIRCH, R. G. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p. 448–454, 1997.

ANEXOS

ANEXO A – Primers reverses utilizados na técnica de pirosequenciamento

Primer Reverso	Sequência (5'→3')
820R-1	CTATGCCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACCRGGGHTCTAATCC
820R-2	CTATGCCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACCAGAGTATCTAATTC
820R-3	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTACDSRGGTMTCTAATC
820R-4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACNVGGGTATCTAATCC

ANEXO B – Primers forward utilizados na técnica de pirosequenciamento

Primer Foward	Amostra	Sequência (5'→3')
520FMID1	Assintomático S1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGAGAGAGAYTGGGYDTAAAGNG
520FMID2	Assintomático S2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGAGAAGAYTGGGYDTAAAGNG
520FMID4	Assintomático S5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCATGAGAYTGGGYDTAAAGNG
520FMID5	Assintomático S4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGAGAGCAYTGGGYDTAAAGNG
520FMID6	Assintomático S3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGATCAYTGGGYDTAAAGNG
520FMID7	Sintomático D2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCAGCAGAYTGGGYDTAAAGNG
520FMID8	Sintomático D3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGATCATCAYTGGGYDTAAAGNG
520FMID9	Sintomático D4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGCTCTCAYTGGGYDTAAAGNG
520FMID10	Sintomático D5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCAGAGCAYTGGGYDTAAAGNG
520FMID11	Sintomático D1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGCATGAYTGGGYDTAAAGNG