

Boletim de Pesquisa 38 ***e Desenvolvimento*** ISSN 1516-4675 Junho, 2006

**Microrganismos Endofíticos:
potencial de uso como agentes de
biocontrole da ferrugem do cafeeiro**

República Federativa do Brasil

Luis Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

Luís Carlos Guedes Pinto

Presidente

Sílvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Sílvio Crestana

Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores-Executivos

Embrapa Meio Ambiente

Paulo Choji Kitamura

Chefe Geral

Ladislau Araújo Skorupa

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Cristina Martins Cruz

Chefe-Adjunto de Administração

Ariovaldo Luchiani Junior

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 38

Microrganismos Endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro

Harllen Sandro A. Silva
Wagner Bettiol
César Rafael F. Terrasan
João Paulo L. Tozzi
Itamar Soares de Melo
Flávia Vieira Nunes

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3867-8750 Fax: (19) 3867-8740
sac@cnpma.embrapa.br
www.cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicação da Unidade

Presidente: *Ladislau Araújo Skorupa*

Secretário-Executivo: *Sandro Freitas Nunes*

Bibliotecária: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Membros: *Heloisa Ferreira Filizola, Manoel Dornelas de Souza, Cláudio César de Almeida Buschinelli, Maria Conceição Peres Young Pessoa, Osvaldo Machado R. Cabral e Marta Camargo de Assis*

Normalização Bibliográfica: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Editoração Eletrônica: *Sandro Freitas Nunes*

1ª edição eletrônica
(2006)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no seu todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Microrganismos endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro / Harllen Sandro A. Silva, Wagner Bettiol, César Rafael F. Terrasan, João Paulo L. Tozzi, Itamar Soares de Melo, Flávia Vieira Nunes. – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

25p. – (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; 38).

1. Ferrugem do cafeeiro – Controle biológico. 2. Microrganismos endofíticos. I. Silva, Harllen Sandro A. II. Bettiol, Wagner. III. Terrasan, César Rafael F. IV. Tozzi, João Paulo L. V. Melo, Itamar Soares de. VI. Nunes, Flávia Nunes. VII. Título. VIII. Série.

CDD 632.96

© Embrapa 2006

Sumário

| | |
|---|----|
| Resumo | 04 |
| Abstract | 05 |
| Introdução | 06 |
| Diversidade de microrganismos endofíticos | 07 |
| Endofitismo como fenômeno biológico | 08 |
| Fontes de endófitas e colonização dos tecidos | 09 |
| Efeitos benéficos dos microrganismos endofíticos | 11 |
| Promoção de crescimento | 11 |
| Controle biológico de doenças | 12 |
| Seleção e dispensa dos endófitas nas plantas | 14 |
| Bioprospecção de microrganismos endofíticos com potencial para o biocontrole da ferrugem do cafeeiro | 16 |
| Considerações finais | 18 |
| Referências | 19 |

Microorganismos Endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro

*Harllen Sandro A. Silva*¹

*Wagner Bettiol*²

*César Rafael F. Terrasan*³

*João Paulo L. Tozzi*⁴

*Itamar Soares de Melo*⁵

*Flávia Vieira Nunes*⁶

Resumo

O reino vegetal é colonizado por uma diversidade de microrganismos endofíticos, principalmente bactérias e fungos, os quais estabelecem relações não patogênicas com seus hospedeiros. Quando benéficas tais associações podem estimular o crescimento das plantas, aumentar a resistência a doenças e às condições adversas do ambiente, como estresse hídrico. Relatos dessas características inerentes aos endófitas despertaram o interesse da comunidade científica, que passou a estudar meios de inserir isolados previamente selecionados, no sistema de produção agrícola. Assim, nas últimas décadas intensificaram-se os trabalhos buscando microrganismos endofíticos com capacidade de promoverem o crescimento de culturas agrônomicas e de atuarem como agentes de biocontrole de fitopatógenos, estudando os possíveis mecanismos envolvidos nessas interações com as plantas, e formas de preservação e de aplicação dos isolados no campo. No presente trabalho 217 bactérias e 17 fungos endofíticos de cafeeiro foram testados em discos de folhas e, os de melhor desempenho, em mudas de cafeeiro 'Mundo Novo', para o controle de *Hemileia vastatrix*. As bactérias endofíticas 3F e 119G destacaram-se proporcionando redução da severidade da ferrugem em torno de 85%. Estudando os possíveis mecanismos de controle envolvidos, encontrou-se aumento da atividade de peroxidase em mudas de cafeeiro tratadas com as endófitas em questão. As mesmas bactérias inibiram também a germinação de uredíniosporos em testes *in vitro*. Alguns isolados, porém, aumentaram a suscetibilidade do hospedeiro ao ataque do patógeno.

¹Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Instituto Biológico, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1.252, Caixa Postal 70, 04.014-002 Campinas, SP. harllen@biologico.sp.gov.br

²Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. bettiol@cnpma.embrapa.br

³Biólogo, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. cesar Terrasan@ig.com.br

⁴Bolsista - CNPq, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. jao-tozzi@hotmail.com

⁵Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. itamar@cnpma.embrapa.br

⁶Bióloga, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. flaviavnunes@yahoo.com

Endophytic Microorganisms: biological aspects and potential of biological control of *Hemileia vastatrix*, causal agent of coffee leaf rust

Abstract

Plants are capable of hosting a great diversity of endophytic bacteria and fungi that cause no apparent harm to the host and can be considered to be either mutualistic or neutral symbionts. Interactions between plants and beneficial microorganisms can have a profound effect on crop health and yield, increasing the plant growth, the disease resistance and adaptation to the environmental changes, such as hidric stress. Reports on these characteristics, related to endophytes, have encouraged the scientific community to study these organisms in agricultural systems. Thus, in the last decades, the researches have focused on bioprospecting endophytic microorganisms for plant growth promotion and for biocontrol of plant pathogens, studying mainly the mechanisms involved in these interactions, biodiversity and applications. In this paper, 217 bacteria and 17 fungi isolated of coffee were tested in coffee plant 'Mundo Novo' for their activity against *Hemileia vastatrix*, causal agent of coffee leaf rust. Two endophytic bacteria (13 F and 119 G) significantly reduced the rust severity in 85%. The mechanism by which beneficial effect occurred show to be increased activity of peroxidase in seedlings treated with these bacterial strains. These bacteria inhibited *in vitro* the urediniospores germination. Some strains, however, increased the host susceptibility to the pathogens.

Introdução

Os primeiros relatos da presença de fungos e bactérias no interior de tecidos de plantas datam do final do século XIX. Mundt e Hinkle (1976) citam que um pesquisador chamado Fernbach, em 1888, detectou a presença de células bacterianas no interior de tecidos de tomate, cenoura e beterraba açucareira. Segundo Vogl, citado por White Jr. et al. (1996), em 1898 foi detectado um fungo endofítico em sementes de *Lolium temulentum* L. Esta descoberta desencadeou uma série de estudos por vários pesquisadores da época sobre novos fungos, principalmente ascomicetos, vivendo no interior de gramíneas sem, contudo, causar qualquer dano aparente.

Trabalhos mais direcionados ao tema começaram a aparecer em número considerável a partir de 1940, com muitos relatos sobre microrganismos isolados de tecidos vegetais saudáveis, principalmente bactérias. Nas últimas duas décadas, a pesquisa tem focado, na maioria dos estudos, aos efeitos benéficos que a aplicação dos endófitas nas plantas pode gerar, como por exemplo o aumento da produção e a redução da severidade de várias doenças. Também há muitos estudos versando sobre a biodiversidade e plantas servindo como reservatório de material genético, abrigando microrganismos endofíticos (BACON & WHITE, 2000; CHEN et al., 1995; CLAY, 1990; KOWALSKI & SADLOVSKI, 1993; McINROY & KLOPPER, 1995).

O termo endófito foi cunhado por Perotti, em 1926, em um trabalho pioneiro sobre interações plantas-microrganismos, ao observar a presença de bactérias em tecidos corticais de raízes de plantas saudáveis (HALLMANN et al., 1997). Atualmente, há diferentes conceitos para o termo, com relação a fungos e bactérias. Alguns autores consideram a necessidade de uma relação de endossimbiose do endófito com a planta para considerá-lo como um endofítico (QUISPEL, 1992). Para Kado (1992), bactérias endofíticas são aquelas que residem dentro de tecidos vivos de plantas, sem causar prejuízos aparentes, tendo como benefício apenas sua proteção. Estes conceitos são restritivos, excluindo a possibilidade de uma relação de neutralidade ou de simbiose, no caso da primeira e segunda definição, respectivamente. Conceitualmente, pode-se adotar que endófitas são microrganismos que podem ser isolados de material vegetal desinfestado superficialmente, e que não causa danos à planta. Assim, podem estar incluídos como microrganismos endofíticos colonizadores tanto com comportamento neutro como simbiotes, e ainda aqueles que transitam entre colonizando ora endofiticamente ora como epífitas (AZEVEDO, 1999).

Diversidade de Microrganismos Endofíticos

Dos microrganismos encontrados em associações endofíticas com plantas as bactérias são as mais freqüentes. Por exemplo, McInroy e Kloepper (1995) estudaram a diversidade de bactérias endofíticas em associação com raízes e caules de milho e algodão no estado do Alabama, EUA. Os autores obtiveram isolados de 36 gêneros, sendo que desses, 70,5% pertencentes a *Enterobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*. Estudando plantas assintomáticas de algodão (*Gossypium hirsutum*), Misaghi e Donndelinger (1990) isolaram seis espécies de bactérias, *Erwinia* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus* sp., *Clavibacter* sp. e *Xanthomonas* sp., que segundo os autores não interferiam no crescimento da planta. Bell et al. (1995a), estudando a diversidade e a natureza de bactérias residentes em xilema de videira (*Vitis vinifera*), na Nova Escócia, Canadá, verificaram que 78% dos isolamentos obtidos foram Gram-negativos, com predominância dos gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter*. Sturz et al. (1997) identificaram 31 espécies pertencentes a 14 gêneros distintos de bactérias endofíticas em associação com folhas, raízes e nódulos de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.). Segundo os autores, *Pantoea agglomerans* foi a espécie mais comum como endófita na parte aérea (59,6%); *Bradiirhizobium* sp. mais comum em nódulos e *Agrobacterium rhizogenes* em raízes.

De maneira geral, o grupo mais comum de bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais é composto por *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*) e por *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*) (HALLMANN et al., 1997). Deve-se lembrar que os exemplos aqui relatados referem-se às plantas cultivadas em países do hemisfério norte. É possível que, em países tropicais como o Brasil, a diversidade de bactérias endofíticas em associação com plantas seja ainda maior e, possivelmente, com predominância de outros grupos de microrganismos.

Em estudos sobre a biodiversidade de microrganismos endofíticos realizados pela equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental, da Embrapa Meio Ambiente, dentre actinomicetos e bactérias, encontraram-se isolados pertencentes a mais de 20 gêneros, além dos supracitados. *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Nocardia*, *Cedecea*, *Stenotrophomonas* e *Amphibacillus* são alguns exemplos.

A maioria dos fungos endofíticos é biotrófico mutualista (BACON et al., 1997), e os mais comuns pertencem aos gêneros *Neotyphodium*, *Balansia*, *Epichloe* e *Myriogenospora*. Estes fungos são associados com centenas de espécies vegetais,

e embora alguns possuam uma restrita associação com diversos tipos de gramas, outros são encontrados em muitas espécies de plantas (BACON & HINTON, 2002). Arnold et al. (2000), estudando a diversidade de fungos endofíticos em plantas de florestas do Panamá, isolaram 418 morfoespécies, que segundo os autores são compostos majoritariamente por ascomicetos. Estima-se que apenas 10% dos fungos do planeta estão classificados, e que a grande fonte destes microrganismos certamente são os vegetais. É de se esperar que muito ainda precise ser investigado a respeito das espécies endofíticas no mundo.

Endofitismo como Fenômeno Biológico

É sabido que bactérias e fungos podem viver endofiticamente em diferentes partes das plantas, como raízes, ramos, folhas, sementes, frutos, tubérculos e mesmo flores, colonizando os espaços intercelulares, vasos do xilema ou mesmo apresentando colonização intracelular (MUNDT & HINKLE, 1976; GARBEVA et al., 2001; STURZ et al., 1999; DARBYSHIRE & GREAVES, 1971; HALLMANN et al., 1997), em diversas culturas de importância agrônômica como milho, algodão, tomate, batata, citros e videira dentre outras (BELL et al., 1995b; JACOBS et al., 1985; HINTON & BACON, 1995; QUADT-HALLMANN et al., 1997).

Essa relação endofítica pode ter surgido quando do aparecimento dos vegetais superiores no planeta, ou seja, há centenas de milhões de anos (STROBEL, 2002). Evidências de microrganismos associados às plantas foram detectadas em tecidos de folhas e ramos fossilizados (TAYLOR & TAYLOR, 2000), mostrando uma co-evolução extremamente especializada entre as partes desta interação.

A grande vantagem que os endófitas têm em colonizar as plantas é que os tecidos internos proporcionam um ambiente protegido das adversidades do meio, tais como raio ultravioleta, chuvas e flutuações de temperatura, bem como maior disponibilidade de nutrientes, evitando assim competição com outros microrganismos, como a microflora rizosférica (McINROY & KLOEPFER, 1995; McINROY & KLOEPFER, 1995b). Logo, endofitismo pode ser visto como uma forma de sobrevivência destes microrganismos.

Desta íntima associação, muitas vezes mutualística, levantou-se a hipótese de que os endófitas podem exercer efeitos benéficos nos seus hospedeiros, como a promoção de crescimento e o controle de fitopatógenos. Esses tópicos serão discutidos mais adiante.

Fontes de Endófitas e Colonização dos Tecidos

As fontes mais prováveis de microrganismos endofíticos são as sementes (ADAMS & KLOPPER, 1996), materiais propagativos (DONG et al., 1994), a rizosfera (HALLMANN et al., 1997b) e o filoplano (BEATTIE & LINDOW, 1995). De forma geral, a entrada nos tecidos vegetais ocorre por estômatos, lenticelas, ferimentos e áreas de emergência de raízes secundárias (AZEVEDO, 1999).

Embora bactérias endófitas tenham sido detectadas dentro de sementes por microscopia (MUKHOPADHYAY et al., 1996), acredita-se que muito provavelmente tais microrganismos penetram nas sementes por ferimentos causados por danos físicos, e não são provenientes da planta. White Jr. et al. (1996), trabalhando com *Acremonium* em grama, afirmam que a transmissão deste fungo para a próxima geração, geralmente, ocorre via penetração no embrião dentro da semente. Segundo Hallmann et al. (1997), é possível que populações extremamente baixas de endófitas estejam presentes em regiões mais internas das sementes.

A maioria dos trabalhos reporta a rizosfera como a principal fonte de microrganismos endofíticos (VERMA et al, 2001; McINROY & KLOPPER, 1995b; SHISHIDO et al., 1999). Isso pode ser confirmado pelo trabalho de De Boer e Copeman (1974) que plantaram mudas axênicas de batata no campo e isolaram espécies saprófitas das mesmas após algumas semanas.

Segundo Hinton e Bacon (1995), o caminho mais lógico para a colonização dos tecidos por microrganismos endófitas parece começar com a migração da bactéria ou fungo para locais onde sementes estejam germinando, ou as raízes estejam crescendo. A partir daí há a colonização da radícula e coleótilo e finalmente se disseminam sistemicamente na planta. Shishido et al. (1999) detectaram, aplicando a técnica de anticorpos imunofluorescentes, a colonização de um isolado de *Bacillus* e outro de *Pseudomonas* aplicados nas sementes de abeto. Segundo os autores, as bactérias se movimentaram apoplasticamente, nos espaços intercelulares, sendo constatadas em ramos, folhas e flores. Acrescentam ainda que são os ferimentos, ocasionados pelo crescimento das radículas, a principal porta de entrada para os microrganismos que estão na rizosfera iniciarem sua colonização endofítica.

Contudo, há relatos de casos em que a penetração pode ocorrer sem a necessidade de ferimentos. Quadt-Hallmann et al. (1997), com estudos microscópicos de ultraestrutura, procuraram investigar por meio de quais mecanismos *Enterobacter asburiae* penetra nas plantas de algodão. Penetração

passiva foi descartada, pois células mortas com glutaraldeído aplicadas a sementes e folhas não foram encontradas no interior dos tecidos, mas o mesmo não acontecia com células vivas. Ainda não se relatou transmissão de endófitas por insetos e são raros trabalhos tratando da aplicação na parte aérea.

Empregando técnicas imunológicas, Jacobs et al. (1985) puderam detectar, em raízes de beterraba, populações de bactérias endofíticas tanto nos vasos do xilema como no interior de células do parênquima. Trabalhando com raízes de limoeiro, Gardner et al. (1982) detectaram células de bactérias endofíticas no fluido do xilema obtido por extração a vácuo.

Uma vez dentro dos tecidos da planta é possível, segundo Dong et al. (1994), transmitir vegetativamente os microrganismos endofíticos, como foi demonstrado para *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar, por até duas gerações.

Fungos endofíticos têm comportamento semelhante ao das bactérias endofíticas, e colonizam espaços intercelulares, porém podendo penetrar ativamente (SCHARDL & PHILLIPS, 1997).

A nutrição dos endófitas dentro dos tecidos ainda é uma questão discutível. Foster e seus colaboradores, citados por Hallmann et al. (1997a), sugerem que os microrganismos endofíticos utilizam-se de exsudatos que extravasam para os espaços intercelulares. Em cana-de-açúcar, por exemplo, sabe-se que os espaços intercelulares contêm fluido rico em sacarose (12%), e que foram isoladas deste sítio culturas puras de uma bactéria endofítica (CANNY & HUANG, 1993). Embora seja um assunto de considerável importância, pouca atenção tem sido dada a este tema. Ainda é matéria de especulação se fungos endofíticos invadem as células para retirar seus nutrientes.

Há vários trabalhos que tratam da dinâmica da população de bactérias endofíticas nas plantas. McInroy e Kloepper (1995b) aplicaram bactérias nas sementes de milho e algodão e tentaram recuperá-las nas mais diversas partes das plantas. Segundo os autores, as bactérias foram isoladas de todas as partes das plantas testadas, numa média de 10^3 a 10^7 ufc/g de peso fresco, porém a população nas raízes foi maior do que nos ramos. A flutuação na população endofítica foi possivelmente devido à colonização diferencial dos tecidos.

Segundo Musson (1994), o total de bactérias endofíticas que invadem os tecidos das plantas é provavelmente controlado pela planta e condições ambientais. Por exemplo, para *Alcaligenes faecalis*, um endófito de arroz, estima-se que somente 10% do total da população vivendo sobre a superfície da raiz penetram nos tecidos. Isso pode dificultar a aplicação de endófitas para controle de doenças ou promoção de crescimento de plantas. Há também de ser considerado o modo de ação dos endófitas, o que torna a questão do uso destes microrganismos

como agentes de biocontrole ainda mais complexa.

Efeitos Benéficos dos Microrganismos Endofíticos

Os efeitos benéficos dos endófitas nas plantas parecem ocorrer por mecanismos similares aos já descritos para rizobactérias, uma vez que os microrganismos isolados das plantas em geral são capazes de viver epifiticamente como habitantes da rizosfera (DI FIORI & DEL GALLO, 1995).

Promoção de Crescimento

Microrganismos endofíticos têm sido associados com a promoção do crescimento de várias culturas, como tomate, alface, batata e milho (HALLMANN et al., 1997), aumentando de 20 a 100% algumas características avaliadas como o número de raízes, o peso da matéria seca, a área foliar e a velocidade de germinação das sementes (FROMMEL et al., 1991). Chanway et al. (2000) verificaram aumento de até 82% na biomassa de mudas de um híbrido de abeto, no Canadá, quando aplicaram uma bactéria endofítica, em testes de campo. Frommel et al. (1991) observaram que plantas de tomateiro tratadas com um isolado endofítico de *Pseudomonas* sp. apresentaram um crescimento de cerca de 26 a 28% na altura das plantas e, conseqüentemente, maior enfolhamento. *Neotyphodium coenophialum*, um fungo endófito muito estudado no hemisfério norte, aumentou o crescimento de raízes e o perfilhamento de forrageiras, em testes de campo sob condições de estresse (ARECHAVALETA et al., 1989).

Há vários mecanismos descritos sobre como endófitas promovem o crescimento dos vegetais que os abrigam. A fixação do N_2 atmosférico é um mecanismo bem estudado e há vários exemplos descritos na literatura de isolamento de endófitas com capacidade de fixar nitrogênio e disponibilizá-lo às plantas. Baldani et al. (1986) isolaram *Herbaspirillum seropedicae* de ramos e raízes de milho, arroz e sorgo. Cavalcante e Döbereiner (1988) isolaram uma bactéria diazotrófica, *Acetobacter diazotrophicus*, associada à cana-de-açúcar. Paula et al. (1993) reportaram uma associação micorrízica desta bactéria com o fungo *Glomus clarum* em batata doce, sorgo e cana-de-açúcar. A fixação de N_2 é controlada pelos genes *nif*, em especial, o *nif D* e o *nif H* e por isso usado como marcador em estudos onde se busca elucidar possíveis mecanismos de promoção de crescimento que estejam atuando.

A produção de fitormônios ou análogos destes por microrganismos endófitas

também pode promover o crescimento de plantas. A produção de ácido 3 - indol acético (AIA) foi detectada em bactérias com hábitos de endofíticas como *Frankia* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Azospirillum* sp. e *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (MUSSON, 1994). Os efeitos da produção de AIA pelos endofíticos são a maior proliferação e o alongamento das raízes, o que proporciona facilidade na retirada de água e nutrientes do solo para a planta (VERMA et al., 2001). Há ainda outros relatos de bactérias endofíticas produzindo outros fitormônios como etileno, auxinas e citocininas (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1991; BASHAN & HOLGUIN, 1997).

Disponibilização de nutrientes, como a solubilização de fósforo, é outro mecanismo de promoção de crescimento descrito na literatura como um efeito dos endófitas nas plantas (GLICK & BASHAN, 1997). Entra em ação neste caso a produção de fosfatases pelos endófitas e normalmente são feitos testes *in vitro* para detecção desta enzima. Acontece que em grande parte das vezes, em testes *in vivo*, não se consegue confirmar os resultados obtidos no laboratório. Em associações micorrízicas a disponibilização de nutrientes para as plantas pelo fungo associado é bastante comum. Tanto que a produção de mudas florestais inoculadas com microrganismos endofíticos, fungos ou bactérias, é uma tecnologia que está ganhando espaço no mercado (CHANWAY et al., 2000; MARX & CORDELL, 1989; KROPP & LANGLOIS, 1990).

Deve-se ressaltar que os mecanismos acima descritos, bem como outros, são em geral estudados isoladamente. Sabendo-se que na natureza há inúmeras interações, é provável que alguns isolados endofíticos promovam o crescimento das plantas exercendo mais de um mecanismo. O uso de misturas de isolados é uma alternativa interessante para aumentar as possibilidades de sucesso na aplicação de endófitas promotores de crescimento para fins experimentais e, futuramente, comerciais.

Controle Biológico de Doenças

A estrita relação entre microrganismos endofíticos e seus hospedeiros faz com que sejam candidatos naturais a serem usados como agentes de controle de doenças. Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos os microrganismos endofíticos apresentam potencial para o controle biológico (HALLMANN et al., 1997a).

Este controle pode ser resultante de diversos mecanismos, como competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira (SCHARDL & PHILLIPS, 1997), produção de compostos antimicrobianos (STROBEL, 2002) e indução de

resistência sistêmica (van LOON et al., 1998).

Em patossistemas fúngicos envolvendo patógenos de colonização sistêmica, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodão, *Verticillium albo-atrum* e *Rhizoctonia solani* em batata e *Sclerotium rolfsii* em feijão, os microrganismos endofíticos têm mostrado significativo controle, diminuindo a incidência das doenças (CHEN et al., 1995; NOWAK et al., 1995; PLEBAN et al., 1995), atuando por competição de sítios. Pratella et al. (1993) testaram 122 bactérias endofíticas obtidas de várias fontes como pepino, berinjela, pimentão e tomate, para o biocontrole de *Monilia laxa* e *Rhizopus stolonifer*. Vinte desses endófitas proporcionaram mais de 90% de controle para as doenças de pós-colheita incitadas pelos patógenos supracitados. Schardl e Phillips (1995) relatam o efeito de proteção proporcionado por *Neotyphodium coenophialum* em plantas forrageiras contra insetos, nematóides e fungos fitopatogênicos.

Endofíticos exercendo atividade inibitória *in vitro* contra fitopatógenos têm sido estudados e relatados. Shimizu et al. (2002) estudaram a produção de substâncias antimicrobianas por um actinomiceto endofítico e sua atividade antifúngica. Segundo os autores, houve produção de metabólitos em meio de cultura com amplo espectro antimicrobiano, inibindo o crescimento de *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia homoeocarpa*. Em estudo parecido, Lu et al. (2002) verificaram que o fungo endofítico *Colletotrichum* sp., isolado de *Artemisia annua*, protegeu sua hospedeira do ataque do fungo *Gaeummanomyces graminis* var. *tritici* pela produção de metabólitos tóxicos ao patógeno. Esses são exemplos clássicos de antibiose como mecanismo de controle de patógenos.

Há relatos de microrganismos endofíticos, principalmente bactérias, serem capazes de induzir resistência em plantas a patógenos. Benhamou et al. (1996) realizaram um trabalho com *Bacillus pumilus* (isolado SE34) num sistema *in vitro* em que raízes de ervilha foram microbiolizadas com o endófito e depois inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. O estímulo dos mecanismos de defesa da planta pela sensibilização com o endófito foi em nível de ultraestrutura. Nas raízes controle o fungo cresceu abundantemente nos tecidos, inclusive no tecido vascular ao passo que nas raízes pré-bacterizadas o crescimento do patógeno ficou restrito à epiderme e ao córtex externo. Nas raízes pré-bacterizadas foram observadas reações do hospedeiro como o aumento da espessura das paredes celulares de células epidérmicas e corticais, e aposições próximas aos sítios de infecção ricas em calose e compostos fenólicos.

Há algumas evidências que endófitas podem contribuir para o controle de nematóides (HALLMANN et al., 1997) e insetos (van BUREN et al., 1993).

Porém, o controle destes organismos é mais complexo e difícil de ser implementado do que para fungos e bactérias, uma vez que os danos provocados pelo seu ataque advêm dos inerentes hábitos alimentares e de migração interna, limitando a eficácia dos microrganismos endofíticos. De qualquer forma, nematóides sedentários podem ser um alvo interessante para estudos de controle com endófitas.

Seleção e Dispensa dos Endófitas nas Plantas

A principal questão para o emprego de microrganismos endófitas para fins agrônômicos, depois de se ter o isolado selecionado, implica em como dispensá-los na planta, de forma que ele venha a penetrar e se estabelecer nos tecidos. Métodos práticos e confiáveis devem ser desenvolvidos. Em geral, métodos desenvolvidos para aplicação de inoculantes microbianos na rizosfera e filosfera são válidos para endófitas (ANDREWS, 1992).

A seleção de endófitas envolve paciência e dedicação, desde o isolamento até os testes finais de campo. Segundo Chen et al. (1996), não mais do que 2%, do total de microrganismos existentes, apresentam algum efeito benéfico para plantas, considerando microrganismos endofíticos, rizosféricos e epifíticos. Logo, esta etapa de busca e teste dos melhores demanda sempre muito tempo e às vezes nem sempre chega a resultados animadores.

É possível, por exemplo, encontrar endofíticos que aumentem a severidade de doenças, como ocorrido nos trabalhos de Shiomi (2004) e Silva et al. (2004), que buscavam endófitas com atividade de controle biológico sobre a ferrugem do cafeeiro em discos de folhas. Segundo Musson (1994), alguns organismos endofíticos podem se comportar como não patogênicos em um hospedeiro e patogênicos em outros. Cameron (1970) encontrou que isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos de tecidos sadios de cerejeira, revelaram-se, posteriormente, fitopatogênicos. O autor sugere que endofítia poderia ser uma das formas de sobrevivência e de escape de tratamentos fitossanitários de superfície. Adicionalmente, Whitesides e Spotts (1991) encontraram isolados de *Pseudomonas syringae* no interior de raízes de pereira que não foram patogênicos nem à cerejeira nem à pereira e sugeriram que os tecidos internos de pereira poderiam servir de reservatório de inóculo para outras plantas. Dessa forma, a endofítia pode ser visualizada como um mecanismo de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas, posto estar numa posição protegida (LEBEN, 1981).

Em nível experimental alguns métodos de aplicação dos endófitas têm sido

testados. Musson et al. (1995), trabalhando com 15 bactérias endofíticas em algodoeiro, estudaram alguns métodos como tratamento de sementes, dispensa de suspensão de propágulos no solo, injeções no caule, pulverização na parte aérea, infiltração a vácuo e imersão de raízes seccionadas na suspensão dos endófitas. A eficiência dos métodos foi avaliada pela detecção da presença da bateria no interior dos tecidos. Todos os métodos funcionaram para algumas bactérias, mas nenhum funcionou para todas, sendo a introdução por picada o mais eficiente deles.

Kijima et al. (1993) patentearam um processo para introduzir endófitas em plantas olerícolas que enraízam com facilidade. O método foi usado por Barreti (2001) para introdução de endófitas em tomateiro, e consiste em seccionar o caule de plantas apresentando o segundo par de folhas definitivas, na região do hipocótilo. O sistema radicular é descartado e o restante da planta imerso por seis horas em suspensão de células do endófitas em teste. Após o intervalo de imersão, as seções de parte aérea são plantadas em substrato esterilizado, aguardando-se o enraizamento que, no caso de tomateiro, é próximo de 100%. A eficiência do método consiste em se disponibilizar para o endófitas múltiplas portas de entrada, como ferimentos e aberturas naturais.

O desenvolvimento de formulações à base de alginato é uma forma bastante interessante para aplicação dos endófitas, uma vez que apresenta a vantagem da presença de nutrientes que ajudariam na sobrevivência do inóculo (MELO & SANHUEZA, 1995). Uma outra técnica é a aplicação dos isolados endofíticos em suspensões de células vegetais, e regeneração via cultura de tecido. Isso garantiria a colonização dos embriões desde os primeiros estádios de desenvolvimento da planta (BASHAN & HOLGUIN, 1997).

Para aplicação na parte aérea, Knudsen & Spurr (1987) sugerem a pulverização de suspensões de propágulos ou formulações em pó seco de células bacterianas liofilizadas. Porém, quase nada se sabe a respeito de dosagens, pressão de aplicação e outras especificações técnicas para este método.

A aplicação de microrganismos endofíticos em plantas via ferimentos embora seja, a princípio, mais eficiente, pode não ser tão prática quanto à aplicação via tratamento de sementes ou solo. E este último ainda apresenta a vantagem da imediata proteção da plântula quando da germinação da semente (HALLMANN et al., 1997), e é tido como o método mais adequado por muitos pesquisadores, considerando todos os fatores envolvidos na aplicação dos isolados endófitas.

Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos com Potencial para o Biocontrole da Ferrugem do Cafeeiro

Foi desenvolvido na Embrapa Meio Ambiente, no período de agosto de 2003 a fevereiro de 2005, um trabalho visando selecionar microrganismos endofíticos com características de agente de biocontrole da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), dentro do projeto BIOTA - Biodiversidade de Microrganismos Endofíticos e seu Potencial Biotecnológico.

A avaliação dos microrganismos endofíticos quanto a sua capacidade em reduzir a severidade da ferrugem do cafeeiro começou com testes em discos de folhas, utilizando metodologia descrita por Eskes (1982). Duzentos e trinta e duas bactérias e 17 fungos foram testados neste ensaio onde se verificou a capacidade destes endófitas em reduzir a área lesionada do disco de folha, quando aplicados em cinco intervalos, 72 e 24 horas antes e depois da inoculação com o patógeno, e concomitantemente.

Os testes em discos de folha apontaram o isolado bacteriano 3F como o de melhor desempenho, proporcionando níveis de controle acima de 85%. Ainda com bom potencial, os isolados 14F, 36F, 115G e 116G de bactérias que apresentaram bons índices de controle quando aplicados 72 e 24 horas antes da inoculação com o patógeno. Embora os isolados supracitados tenham proporcionado redução maior na severidade da ferrugem, outros endófitas também se destacaram. Nove isolados bacterianos foram selecionados como os de melhor desempenho, reduzindo significativamente a área lesionada do disco em relação ao controle. São as bactérias a seguir: 116G, 123G, 36F, 137G, 14F, 109G, 115G, 3F e 119G (Tabela 1).

As bactérias endofíticas selecionadas na etapa anterior foram testadas em mudas de cafeeiro, agora em três intervalos de aplicação, 72 e 24 horas antes do patógeno, e simultaneamente. As mudas, após a aplicação dos endófitas e inoculação, foram mantidas em telado e procedeu-se às contagens do número de pústulas e "flecks" por folha aos 25 dias após a inoculação. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Os melhores níveis de controle foram obtidos quando os antagonistas foram aplicados 72 horas antes da inoculação com uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*. Destacaram-se os isolados 137G, 14F, 109G, 115G, 3F e 119G, em ordem crescente de eficiência na redução dos sintomas da doença (Tabela 1). O isolado endofítico 3F confirmou sua característica de promissor agente de biocontrole da ferrugem proporcionando redução da severidade da ferrugem em torno de 85%. Adicionalmente, devem ser considerados os isolados 14F e 115G que proporcionaram bons índices de controle no teste em mudas de cafeeiro, assim como no teste de seleção inicial em discos de folhas.

Tabela 1. Severidade da ferrugem do cafeeiro em mudas tratadas com bactérias endofíticas 72 horas antes da inoculação.

| Endofítico | Número médio de Lesões por folha |
|-------------------|---|
| CONTROLE | 2,47 a* |
| 116G | 1,41 ab |
| 123G | 1,14 ab |
| 36F | 1,02 ab |
| 137G | 0,94 b |
| 14F | 0,91 b |
| 109G | 0,84 b |
| 115G | 0,77 b |
| 3F | 0,39 b |
| 119G | 0,27 b |

* Valores seguidos de mesma letra não diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Apesar de se verificarem reduções no número de lesões por folha ao se aplicar os endófitas 24 horas antes e concomitante ao patógeno, estatisticamente não houve diferença entre os tratamentos e o controle.

Uma provável explicação para os resultados obtidos é o fato de a aplicação antes do patógeno garantir aos antagonistas uma vantagem adaptativa de colonização tanto de forma endofítica quanto epifítica, uma vez que microrganismos endofíticos podem ter origem em comunidades epifíticas da filosfera (BEATTIE & LINDOW, 1995; DONG et al., 1994). Além disso, aumenta a possibilidade de ocorrer indução de resistência sistêmica por sensibilização dos tecidos, além de competição por espaço e nutrientes na superfície do disco.

Para comprovar essa hipótese de indução de resistência sistêmica, foi realizado um ensaio para detecção do aumento da atividade de enzimas relacionadas à resistência. Para isso, verificou-se o aumento dos níveis de peroxidase (HAMMERSCHMIDT et al., 1982), lipoxigenase (AXELROD et al. 1981) e fenilalanina amônio-liase (PASCHOLATI et al. 1986), em mudas tratadas com as bactérias endofíticas 3F, 109G, 115G e 119G. As análises foram feitas em folhas diferentes daquelas onde tanto o endófito quanto o patógeno foram aplicados, para garantir que houve sistemicidade da indução de resistência. A atividade das enzimas foi estimada por espectrofotometria, e as médias comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Houve aumento significativo da atividade de peroxidase em plantas tratadas com as endófitas 3F e 119G. Não se detectaram aumentos nos níveis das

outras enzimas testadas, mesmo para os demais isolados. A ausência de níveis enzimáticos significativos para os isolados 109G e 115G faz pensar que tais isolados podem estar atuando contra a ferrugem por outros mecanismos de controle, tais como inibição da germinação dos uredíniosporos ou lise das estruturas do patógeno.

Para comprovar essa hipótese, foi realizado um teste de inibição da germinação com os isolados 109G e 115G, em lâminas de microscopia. As lâminas foram preparadas adicionando-se 15 μ L de uma suspensão dos endófitas (10^8 ufc mL⁻¹) e o mesmo volume de suspensão de uredíniosporos (1,0 mg mL⁻¹), e avaliadas após um período de seis horas no escuro com 100% de umidade relativa, a 22 °C. Foi estimada a percentagem de uredíniosporos germinados em cinco lâminas por endófito testado, contando-se os uredíniosporos em 10 campos. Os uredíniosporos foram considerados germinados quando ocorria a formação do tubo germinativo. Os isolados testados reduziram significativamente a germinação dos uredíniosporos, comparados ao controle, em torno de 40%. Provavelmente a produção de substâncias antimicrobianas seja uma característica destes isolados, mas ainda precisa ser comprovado com testes adicionais.

Deve-se ressaltar que houve endófitas que aumentaram a severidade da ferrugem. Segundo Musson (1994), alguns organismos endófitos podem se comportar como não patogênicos em um hospedeiro e patogênicos em outros.

Considerações Finais

Os estudos futuros com microrganismos endófitos para fins agrônômicos devem focar principalmente sobre a parte ecológica e interações com outros microrganismos, a aplicação dos endófitas e movimento destes nos tecidos, e o uso de isolados contendo genes com algum efeito benéfico para as plantas. Há vários trabalhos mostrando que endófitas não atuam sozinhas ou apenas ao nível de seu hospedeiro, e há sim uma complexa rede de interações com a microbiota nativa e com o metabolismo vegetal. Embora estudados separadamente neste trabalho, nada impede que os mecanismos de controle possam atuar simultaneamente, aumentando a capacidade de controle do endófito.

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

agrícola.

Deve-se ressaltar que é pouco provável que a aplicação de endófitas isoladamente vá sanar todos os problemas enfrentados diariamente por agricultores. Sua utilização é indicada como uma ferramenta adicional dentro do conceito de manejo integrado de doenças.

Referências

ADAMS, P.D.; KLOPPER, J.W. Seed-borne bacterial endophytes in different cotton cultivars. **Phytopathology**, v.86, p.S97, 1996. (Abstract).

ANDREWS, J.H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.603-635, 1992.

ARECHA VALETA, M.; BACON, C.W.; HOVELAND, C.S.; RADCLIFFE, D.E. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. **Agronomy Journal**, v.81, p.83-90, 1989.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Microbiological production of plant hormones. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Ed.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.327-334.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAAKSO, S. Lipooxygenase from soybean. **Methods in Enzymology**, v.71, p.441-451, 1981.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1999. p.117-137.

BACON, C.W.; WHITE JR., J.F. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000.

BACON, C.W.; HINTON, D.M. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. **Biological Control**, v.23, p.274-284, 2002.

BACON, C.W.; RICHARDSON, M.D.; WHITE JR. J.F. Modification and uses of endophytic-enhanced turfgrasses: a role for molecular technology. **Crop Science**, v.37, p.1415-1425, 1997.

BARRETTI, P.B.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; ANDRADE, C.G. Biocontrole experimental de enfermidades fúngicas e bacterianas do tomateiro pelo uso de bactérias endofíticas pré-selecionadas. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.275, 2001. (Abstract).

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relation-ships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.139, p.103-121, 1997.

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

BELL, C.R.; DICKIE, G.A.; HARVEY, W.L.G.; CHAN, J. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, n.1, p.46-53, 1995b.

BENHAMOU, N.; KLOPPER, J.W.; QUADT HALLMAN, A.; TUZUN, S. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, v.112, n.3, p.919-929, 1996.

CAMERON, H.R. Pseudomonas content of cherry trees. **Phytopathology**, v.60, p.1343-1346, 1970.

CANNY, M.J.; HUANG, C.X. What is in the intercellular spaces of roots? Evidence from the cryo-analytical-scanning electron microscope. **Physiology Plants**, v.87, p.561-568, 1993.

CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F.B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v.133, p.81-88, 2000.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOPPER, J.W. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v.5, n.1, p.83-91, 1995.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R.S. e GUPTA, V.K. (Ed.). **Management of soil born diseases**. Ludhiana: Kalyani Publishers, 1996. p.165-184.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.21, p.275-295, 1990.

DARBYSHIRE, J.F.; GREAVES, M.P. The invasion of pea roots *Pisum sativum* L. by soil microorganisms, *Acanthamoeba palestinensis* Reich) and *Pseudomonas* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, v.3, p.151-155, 1971.

DE BOER, S.H.; COPERMAN, R.J. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot disease. **Canadian Journal of Plant Science**, v.54, p.115-122, 1974.

DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.169-187.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v.105, p.1139-1147, 1994.

ESKES, A.B. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.88, p.127-141, 1982.

FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* growth potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, v.96, p.928-936, 1991.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDEN, J.W.L.; VAN ELSAS, J.D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, v.41, p.369-383, 2001.

GARDNER, J.M.; FELDMAN, A.W.; ZABLATOWICZ, R.M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1335-1342, 1982.

GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, n.2, p.353-378, 1997.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.10, p.895-914, 1997.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOPPER, J.W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.925-937, 1998.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-80, 1982.

HINTON, D.M.; BACON, C.E. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, v.129, p.117-125, 1995.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.1262-1265, 1985.

KADO, C.I. Plant pathogenic bacteria. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. p.660-662.

KIJIMA, T.; YONAI, S.; OOHASHI, K.; AMAGAI, M. **Process for biologically preenting dicotyledoneous plant diseases using symbiotical bacteria**. USA Patent No. 5.401.655 (28/03/1993). 1993. 12p.

KNUDSEN, G.E.; SPURR, H.W. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations to control peanut leaf spot. **Plant Disease**, v.71, p.442-445, 1987.

KOWALSKI, T.; SADLOWSKI, W. Endophytic fungi II. Their importance for plants and possibilities of use. **Sylwan**, v.137, n.10, p.9-15, 1993.

KROPP, B.R.; LANGLOIS, C.G. Ectomycorrhizae in reforestation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.20, n.4, p.438-451, 1990.

LEBEN, C. How plant pathogens survive. **Plant Disease**, v.65, n.8, p.633-637, 1981.

LU, H.; ZOU, W.X.; MENG, J.C.; HU, J.; TAN, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v.151, p.67-73, 2000.

MARX, D.H.; CORDELL, C.E. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: WHIPPS, J.M.; LUMSDEN, R.D. (Ed.). **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.1-25.

McINROY, J.A.; KLOPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v.173, n.2, p.337-342, 1995a.

McINROY, J.A.; KLOPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.895-901, 1995b.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p.808-811, 1990.

MUKHOPADHYAY, N.K.; GARRISON, N.K.; HINTON, D.M.; BACON, C.W.; KHUSH, G.S.; PECK, H.D.; DATTA, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, v.134, p.151-179, 1996.

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

MUSSON, G. **Ecology and effects of endophytic bacteria in plants**. Master Dissertation, Auburn University, Auburn. 1994.

MUSSON, G.; Mc INROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. **Biocontrol Science and Technology**, v.5, n.4, p.407-416, 1995.

PASCHOLATI, S.F.; NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, v.115, n.2, p.165-172, 1986.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.254-259, 1997.

QUISPEL, A. A search for signals in endophytic microorganisms. In: VERMA, D.P.S. (Ed.). **Molecular signals in plant-microbe communications**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p.471-490.

SCHARDL, C.L.; PHILLIPS, T.D. Protective grass endophytes. Where are they from and where are they going? **Plant Disease**, v.81, n.5, p.430-438, 1997.

SHIMIZU, M.; NAKAGAWA, Y.; SATO, Y.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y.; ONAKA, H.; YOSHYIDA, R.; KUNOH, H. Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. Isolated from rhododendron and its antifungal activity. **Journal of General Plant Pathology**, v.66, p.360-366, 2000.

SHIOMI, H.F. **Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro no controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*)**. Dissertação de Mestrado, UNESP, Botucatu, SP. 2004. 65p.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.191-196, 1999.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.4, p.315-333, 2002.

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

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems, and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, n.1, p.13-19, 1997.

TAYLOR, T.N.; TAYLOR, E.L. The rhynie chert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Decker, 2000.

VAN BUREN, A.M.; ANDRE, C.; ISHIMARU, C.A. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. **Phytopathology**, v.83, p.1406, 1993. (Abstract).

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.127-141, 2001.

WHITE JR., J.F.; MARTIN, T.I.; CABRAL, D. Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phyllplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. **Mycologia**, v.88, n.2, p.174-178, 1996.

WHITESIDES, S.K.; SPOTTS, R.A. Frequency, distribution and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. **Phytopathology**, v.81, p.453-457, 1991.

Embrapa

Meio Ambiente

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

