



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

THIAGO HENRIQUE ORO

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE SOJA NO  
CONTROLE *IN VITRO* DE PATÓGENOS FÚNGICOS E  
BACTERIANOS**

---

Londrina  
2015

THIAGO HENRIQUE ORO

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE SOJA NO  
CONTROLE *IN VITRO* DE PATÓGENOS FÚNGICOS E  
BACTERIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, da Universidade  
Estadual de Londrina.

Orientador(a): Profa. Dra. Valéria Carpentieri  
Pípolo

Londrina  
2015

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

O74b Oro, Thiago Henrique.

Bactérias endofíticas isoladas de soja no controle *in vitro* de patógenos  
fúngicos e bacterianos / Thiago Henrique Oro. – Londrina, 2015.  
58 f. : il.

Orientador: Valéria Carpentieri Pípolo.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Soja – Teses. 2. Bactérias patogênicas – Teses. 3. Interação planta-  
bactéria. 4. Controle biológico – Teses. 5. Plantas transgênicas – Teses.  
I. Pípolo, Valéria Carpentieri. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de  
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 633.34

THIAGO HENRIQUE ORO

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE SOJA NO CONTROLE *IN VITRO* DE PATÓGENOS FÚNGICOS E BACTERIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valeria Carpentieri Pipolo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Giuliano Degrassi  
International Centre for Genetic Engineering  
and Biotechnology- ICGEB

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Balbi Peña  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de janeiro de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por ter me dado forças pra continuar percorrendo meu caminho mesmo em meio às dificuldades.

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Valéria Carpentieri Pípolo, pela contribuição ao meu conhecimento, não somente intelectual e científico, como também pessoal.

Ao Dr. Giuliano Degrassi pela orientação e apoio durante a condução do trabalho.

Aos colegas de laboratório Eduardo Stefani Pagliosa, Karla Bianca de Almeida Lopes, Danielle Ferreira, Jenniffer Aparecida Schnitzer e Rodrigo Thibes Hoshino, assim como aos estagiários Talita Pijus Ponce, Tamy Rodrigues Baran, Rayne Baena, Rafael Eidi Maeoka, Jackson Tavela da Silva e Osmar José Chaves Junior pela amizade e contribuição para a realização deste trabalho.

À minha mãe Maria Consoladora Parisotto Oro, ao meu irmão Geovane Déssio Júnior, à minha irmã Priscilla Oro e à minha namorada Haline Peres Praça pelo incentivo, compreensão e apoio em todos os momentos.

Aos professores do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina pelos conhecimentos transmitidos.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade da realização do mestrado.

À CAPES e à Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudo.

Oro, Thiago Henrique. **Bactérias endofíticas isoladas de soja no controle *in vitro* de patógenos fúngicos e bacterianos.** 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

Bactérias endofíticas são microrganismos que habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro. Esses microrganismos podem ser utilizados no controle biológico de pragas e doenças como alternativa ao uso de produtos químicos. O objetivo do trabalho foi testar o potencial de bactérias endofíticas isoladas de soja RR e convencional no controle, *in vitro*, de patógenos fúngicos e bacterianos. 223 bactérias endofíticas foram isoladas de raízes, caules e folhas de cultivares de soja e testadas quanto à atividade de antagonismo contra *S. sclerotiorum* e *P. sojae*. Os 13 isolados que apresentaram atividade de biocontrole a pelo menos um dos dois patógenos foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S DNA e tiveram seus sobrenadantes testados contra os dois fungos acima citados, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* através do fracionamento com sulfato de amônio e da extração do solvente com metanol, a fim de determinar se as moléculas antifúngicas e/ou antibacterianas eram proteínas ou lipopetídeos, respectivamente. A atividade de antagonismo foi determinada através da mensuração do halo transparente de inibição com auxílio de régua milimetrada. Calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento dos patógenos fúngicos. *Bacillus* sp. e *Burkholderia* sp. destacaram-se no controle dos patógenos utilizados neste estudo podendo ser considerados candidatos para o desenvolvimento de inoculantes para a proteção de culturas. O composto responsável pela atividade de antagonismo desses isolados, possivelmente, é de origem peptídica.

**Palavras-chave:** Atividade de antagonismo. Controle Biológico. Interação planta-bactéria.

ORO, Thiago Henrique. **Endophytic bacteria isolated from soybean in control *in vitro* of fungal and bacterial pathogens**. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

Endophytic bacteria are microorganisms that inhabit the interior of plant tissues without causing harm to the host. These microorganisms can be used in biological control of pests and diseases as an alternative to the use of chemicals. The aims of the study was to test the potential of endophytic bacteria in control, *in vitro*, of fungal and bacterial pathogens. 223 endophytic bacteria were isolated from roots, stems and leaves of soybean cultivars and tested for antagonistic activity against *S. sclerotiorum* and *Phomopsis. sojae*. The 13 isolates with biocontrol activity to at least one of the two pathogens were identified by 16S rDNA gene sequencing and had their supernatants tested against both fungi mentioned above, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* by ammonium sulfate fractionation and solvent extraction with methanol in order to determine whether the antifungal and/or antibacterial proteins or molecules were lipopeptides respectively. The antagonistic activity was determined by measuring the transparent inhibition zone with the aid of a millimeter ruler. The percentage of growth inhibition of the fungal pathogens were calculated. *Bacillus* sp. and *Burkholderia* sp stood out in the control of pathogens used in this study may be considered candidates for the development of inoculants for crop protection. The compound responsible for the antagonism activity of these isolates is possibly peptide origin

**Key-words:** Antagonism activity. Biological control. Plant-bacteria association.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1 –** Bactérias endofíticas isoladas de soja convencional não transgênica (C) e de soja transgênica resistente ao glifosato (GR) que apresentaram atividade antifúngica contra patógenos da soja .....51
- Figura 3.2 –** Atividade antagonista do sobrenadante de bactérias endofíticas extraído com metanol (MeOH) e precipitado com sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>-S) contra *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Phomopsis sojae* (PS) e *Rhizoctonia solani* (RS).....51
- Figura 3.3 –** Atividade antagonista do sobrenadante de bactérias endofíticas extraído com metanol (MeOH) e precipitado com sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>-S) contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 49, 61 e 62 (49Xag, 61Xag e 62Xag) e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 45, 60 e 77 (45Psg, 60Psg e 77Psg).....52
- Figura 3.4 –** Árvore filogenética obtida pelo método do algoritmo *neighbor-joining* construída utilizando as sequências do gene 16S DNAr obtidas de bactérias endofíticas isoladas de diferentes tecidos de soja convencional e transgênica resistente a glifosato. Os valores em cada ramo representam porcentagens de 1.000 réplicas *bootstrap*.....53



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Atividade antifúngica <i>in vitro</i> de bactérias endofíticas de soja contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Phomopsis sojae</i> .....	50
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1	A CULTURA DA SOJA .....	12
2.1.1	Cenário Nacional e Importância Econômica .....	12
2.1.2	Soja Transgênica Roundup Ready® .....	14
2.2	BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS .....	16
2.2.1	Aspectos Gerais.....	16
2.3	ASSOCIAÇÃO PLANTA - BACTÉRIA ENDOFÍTICA.....	18
2.4	ATIVIDADE DE ANTAGONISMO A MICRORGANISMOS PATOGÊNICO.....	21
2.6	REFERÊNCIAS .....	24
<b>3</b>	<b>ARTIGO: BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE SOJA NO CONTROLE <i>IN VITRO</i> DE PATÓGENOS FÚNGICOS E BACTERIANOS</b> .....	33
3.1	RESUMO E ABSTRACT.....	33
3.2	INTRODUÇÃO.....	35
3.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	36
3.3.1	Material Vegetal .....	36
3.3.2	Coleta das Amostras de Folhas, Raízes e Caule, e Determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	37
3.3.3	Isolamento das Bactérias Endofíticas .....	37
3.3.4	Isolados Patogênicos Utilizados no Estudo .....	38
3.3.5	Atividade de Antagonismo <i>In Vitro</i> (1).....	38
3.3.6	Caracterização Genotípica dos Isolados .....	39
3.3.7	Precipitação em Meio Ácido e Extração do Solvente com Metanol .....	40
3.3.8	Precipitação com Sulfato de Amônio .....	40
3.9	Atividade de antagonismo <i>in vitro</i> (2).....	40
3.9.1	Atividade Antibacteriana .....	40
3.9.2	Atividade Antifúngica .....	41
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41

3.5 CONCLUSÃO.....	46
3.6 REFERÊNCIAS.....	47
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>54</b>
APÊNDICE A – Teste preliminar de antagonismo das bactérias endofíticas isoladas de soja contra <i>Phomopsis sojae</i> .....	55
APÊNDICE B – Teste preliminar de antagonismo das bactérias endofíticas isoladas de soja contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	56
APÊNDICE C – Teste de antagonismo do sobrenadante das bactérias endofíticas isoladas de soja contra os patógenos fúngicos de soja A) <i>Phomopsis sojae</i> , B) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e C) <i>Rhizoctonia solani</i> .....	57
APÊNDICE D – Teste de antagonismo do sobrenadante das bactérias endofíticas isoladas de soja contra os patógenos bacterianos de soja A) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> e B) e C) <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

Fungos e bactérias patogênicas de plantas compreendem importantes grupo de microorganismos que causam perdas econômicas significativas na agricultura em todo o mundo. Para o controle de doenças causadas por esses microorganismos, os métodos mais utilizados e que ainda prevalecem entre os agricultores são o método químico para o controle de doenças fúngicas e a resistência genética para doenças bacterianas.

O uso de agroquímicos sintéticos resulta em diversos riscos, dentre os quais danos ambientais como os efeitos nocivos sobre a microbiota do solo, riscos sanitários e tóxicos para os seres humanos e animais e poluição ambiental.

Recentemente, aumentou-se o interesse pelo controle biológico, especialmente em virtude da necessidade do uso de alternativas ecológicas que visem à redução do uso extensivo de pesticidas químicos no combate de doenças das culturas. O uso de microrganismos benéficos (biopesticidas), como, por exemplo, as bactérias endofíticas, é considerado como um dos métodos mais promissores para práticas de manejo mais racionais e seguras.

Bactérias endofíticas são microrganismos que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, podendo contribuir para a sanidade e o crescimento de seu hospedeiro, sem causar efeitos negativos sobre o desenvolvimento da cultura (AZEVEDO et al., 2000; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004, SHENPAGAM et al., 2012). Quando isolados de tecido vegetal, esses microrganismos podem apresentar ação antagônica a fungos e bactérias patogênicas *in vitro* e realizar um controle biológico desses patógenos quando reinoculadas na cultura.

Os microrganismos endofíticos ocupam uma posição relativamente inexplorada e representam uma nova fonte de informações com grande potencial para serem utilizados no controle biológico e na produção sustentável das culturas. Células de bactérias, como a maioria das células vivas, apresentam um metabolismo primário sem o qual elas não sobrevivem; e um metabolismo secundário, o qual é utilizado para ter uma melhor capacidade de adaptação. No que se refere aos compostos anti-fúngicos e anti-bacterianos produzidos pelas bactérias endofíticas, geralmente são metabólitos secundários, pois são compostos produzidos a fim de competir com os demais microrganismos circundantes.

Existem alguns fatores que podem afetar a comunidade bacteriana endofítica nas plantas, entre eles destacam-se: o genótipo, o tecido onde o endófito se encontra, o estágio de desenvolvimento da planta, as variações na temperatura e na umidade e o manejo adotado, como a aplicação de agroquímicos.

Sabe-se que a aplicação do herbicida glifosato [(N - fosfometil) glicina] gera uma mudança na comunidade microbiana, sendo que este pode ser tóxico para alguns microrganismos e, para outros, ser utilizado como fonte de energia e nutrientes; todavia são necessários maiores estudos para verificar a influência destas mudanças no ambiente.

O objetivo desse trabalho foi testar o potencial de bactérias endofíticas isoladas de soja RR e convencional no controle, *in vitro*, de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis sojae*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Além disso, caracterizar parcialmente o composto responsável pela atividade de antagonismo e, em longo prazo, desenvolver um produto comercial para ser utilizado como inoculante para a proteção das culturas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DA SOJA

#### 2.1.1 Cenário Nacional e Importância Econômica

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a oleaginosa cultivada com maior importância a nível mundial. É considerada uma das principais commodities, juntamente com o arroz, trigo, cevada e milho, e vem sendo utilizada, há séculos, na alimentação de chineses, coreanos e japoneses, principalmente em razão do seu alto teor de proteína e da sua riqueza em vitaminas, fibras e minerais (LIU; PAN, 2011).

O Brasil, maior produtor mundial da cultura, colheu a maior safra histórica em 2012/2013, oficialmente estimada em 81,5 milhões de toneladas em uma área total de 27,7 milhões de hectares (CONAB, 2013). De acordo com a sétima estimativa realizada pela Conab, a safra brasileira de soja na temporada atual (2013/14) terá um incremento de 5,6 % em relação à safra 2012/13, totalizando uma produção de 86 milhões de toneladas. Esse aumento será resultado de uma expansão de 8,2% em área colhida e de uma redução na produtividade de 2,4%, quando comparado à safra anterior (CONAB, 2014).

A maior área plantada com a oleaginosa - 13,8 milhões de hectares - ocorreu na Região Centro-Oeste apresentando neste ano um incremento de 8,6% sobre o exercício anterior. Na Região Sul, a área cultivada atingiu 10,4 milhões de hectares, apresentando um incremento de 5,7% em relação à safra 2012/13. O Paraná aparece como o segundo estado produtor de soja nesta safra, com área plantada inferior apenas ao Mato Grosso. O Paraná apresentou prejuízos recordes em termos de produtividade, derivado do longo período em que a lavoura foi afetada pela ausência de chuvas e elevadas temperaturas em fases importantes da lavoura. O resultado não foi pior em função do forte incremento na área plantada, mas contribuiu para que a produção do estado apresentasse uma redução de 7,6% em relação ao ano anterior. Outro fator influenciando negativamente a produtividade na Região Sul, foi o forte ataque de pragas e doenças acarretando no aumento do número de aplicações de inseticidas, provocando forte elevação nos custos de produção (CONAB, 2014).

A soja é considerada um grão de alta versatilidade, podendo ser destinada ao processamento originando vários produtos e subprodutos da agroindústria. As indústrias alimentícias e farmacêuticas são os principais mercados beneficiados pela cultura da soja. Os produtos mais conhecidos que derivam dessa leguminosa são o óleo refinado, obtido pelo processo de esmagamento de grãos, e o farelo utilizado na alimentação animal, que também pode ser empregado no tofu e em molhos de soja. Do processamento do óleo, resulta a principal fração usufruída pela indústria de alimentos que produzem as gorduras, margarinas, óleos para cozinha e salada. Da extração do óleo da soja crua, obtêm-se a lectina, um fosfatídeo utilizado como emulsificante, lubrificante e agente estabilizador natural. Além disso, o grão pode ainda ser utilizado, nas atividades industriais, na produção de levedo, anticorpos e na fabricação de sabão e desinfetante (EMBRAPA, 2007; PRIMOMO et al., 2002; LEITE et al., 2012; SIMAS, 2005).

As projeções de consumo indicam que deve haver um grande aumento da demanda de soja no mercado internacional e no mercado interno. Neste mercado, além da demanda de rações animais, espera-se aumento forte do consumo de soja para a produção de biodiesel, estimada em 2013 pela Associação brasileira das indústrias de óleos vegetais (Abiove) em cerca de 10 milhões de toneladas. Para 2014, a projeção deve situar-se entre 80,2 e 88,8 milhões de toneladas. As projeções da Abiove vêm indicando para 2020 uma produção entre 104,0 e 105,0 milhões de toneladas, sendo que a área de produção deve aumentar cerca de 6,7 milhões de hectares, chegando a 2023 com 34,4 milhões de hectares, representando um acréscimo de 24,3% sobre a área de 2013 (MAPA, 2012).

Em vista da diversificação de sua utilidade e das projeções de consumo, muitos estudos têm sido realizados com a cultura visando melhorar seu desenvolvimento em relação ao ataque de pragas e doenças, a fim de incrementar sua produtividade.

### 2.1.2 Soja Transgênica Roundup Ready®

A soja geneticamente modificada *Roundup Ready* (RR), resistente ao glifosato [(N - fosfometil) glicina], é o produto biotecnológico de maior importância econômica nos últimos 15 anos, atingindo, no ano de 2013, um recorde de 175,2 mi de hectares cultivados no mundo, a uma taxa de crescimento anual de

3%. O Brasil ocupa o segundo lugar em área plantada de organismos geneticamente modificados no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos, com 40,3 milhões de hectares, e está emergindo como um forte líder global em culturas biotecnológicas (ISAAA, 2013).

Com o advento da soja RR, observa-se uma mudança visível na manutenção do controle de plantas daninhas. A aplicação de herbicidas em pós-emergência que, anteriormente, era realizada exclusivamente por produtos seletivos à cultura da soja, ganhou uma nova opção com o uso do glifosato. Este herbicida é de amplo espectro de ação, não seletivo na sua ação sobre mono ou dicotiledôneas e de baixo custo. Seu mecanismo de ação é de forma sistêmica e controla tanto plantas daninhas anuais quanto perenes. (VIDAL; MEROTTO JR., 2001; YAMADA; CASTRO, 2007; SILVA; SILVA, 2007). Sua degradação pode ocorrer devido à ação microbiológica, química e por irradiação ultravioleta. Seu período residual é questionável: há casos em que após dois anos de aplicação do produto, foi verificada a presença de 8% de glifosato no solo; entretanto, outros estudos observaram a redução de 50% do herbicida após 60 dias da aplicação do produto (FORLANI et al., 1999; HANEY et al., 2002)

Nas aplicações foliares, o glifosato é absorvido e translocado para os demais tecidos em crescimento do vegetal. O modo de ação do herbicida ocorre pela inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs) que inibe a síntese de fenilalanina, tirosina e triptofano, considerados aminoácidos aromáticos essenciais da via do ácido shiquímico e precursores de outros produtos como os flavonóides, alcalóides, lignina e ácidos benzóicos (LEVESQUE; RAHE, 1992; PENAZOLA-VAZQUEZ et al., 1995; FORLANI et al., 1999; RODRIGUES; ALMEIDA, 2005)

Com a aplicação do produto químico, parte do herbicida pode ser exsudado na rizosfera das plantas competidoras, sendo absorvido, em parte, pela cultura principal presente na área. Santos et al. (2007), estudando a exsudação radicular de glyphosate por braquiária e seus efeitos em plantas de eucalipto e Ricordi, Tornisielo e Almeida (2007) avaliando a translocação do herbicida aplicado para o controle de *Brachiaria brizantha* (planta-alvo) para mudas de citros e de cafeeiro constataram a absorção do produto pelas plantas não-alvo. Este fato pode acarretar na redução do crescimento e da produtividade da cultura de interesse



econômico, assim como interferir na população de microrganismos presentes no hospedeiro (KREMER; MEANS; KIM, 2005; NEUMANN et al., 2006).

Araújo (2003) relatou que a aplicação de glifosato na dosagem de 4320g i.a. ha<sup>-1</sup> foi responsável por um incremento na liberação de CO<sub>2</sub> variando de 10 a 15%. Isto sugere que a microbiota do solo seja capaz de metabolizar o herbicida como uma fonte de carbono. Wardle e Parkinson (1990) observaram que a presença de glifosato no solo estava relacionada com um aumento temporário tanto no número de bactérias no solo quanto à atividade microbiana total do solo. Porém, o número de fungos e actinomicetos não foi afetado. Haney et al. (2000) e Busse et al. (2001) avaliaram o efeito do glifosato sobre a comunidade microbiana dos solos e observaram que a atividade microbiana foi estimulada na presença do herbicida. Segundo Kononova e Nesmeyanova (2001), é cada vez mais comum a identificação de microrganismos capazes de mineralizar organofosforados como o glifosato, e utilizá-los como fonte de carbono e de nitrogênio, devido enzimas com alta especificidade a esses compostos.

Apesar de vários microrganismos degradarem o glifosato, usando o produto como fonte de energia, há estudos que mostram efeitos nocivos do produto para alguns microorganismos (LEVESQUE; RAHE, 1992; SANTOS; FLORES, 1995; BUSSE et al., 2001; ARAÚJO, 2003).

Segundo Carlisle e Trevors (1988), a estimativa da atividade microbiológica pode ser revelada pelo nível de respiração do solo, que está relacionado com o grau de degradação do glifosato. Em estudo realizado com nove herbicidas, os autores observaram que a aplicação de glifosato, segundo mais tóxico dentre os testados, resultou em inibição do crescimento (a 50ppm) de 59% de bactérias, fungos, actinomicetos e leveduras isolados anteriormente do solo.

Além do efeito sobre a população microbiana, a aplicação de glifosato pode interferir na biodiversidade microbiana do solo e associada à planta, podendo alterar o equilíbrio microrganismos-planta. Essa mudança pode resultar em um incremento de microrganismos fitopatogênicos, de modo a alterar o manejo das culturas agrícolas (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2005).

Entre os agentes patogênicos para as plantas, os fungos são os mais ativos, tendo uma maior habilidade em penetrar diretamente nos tecidos vegetais e aí facilmente se alojarem (MACHADO, 2004). As doenças fúngicas que afetam a soja merecem especial atenção, não somente devido ao maior número,

mas pelos prejuízos causados no rendimento e na qualidade das sementes (HENNING, 2004). Dentre as que se destacam, está o mofo branco, doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, a seca da haste e da vagem ou Phomopsis da Semente, causada por *Phomopsis sojae* Lehman e o *Damping off* causada por *Rhizoctonia solani*. Além das doenças fúngicas, duas doenças bacterianas afetam anualmente o desenvolvimento da cultura sendo responsáveis por perdas severas na produtividade: o crestamento bacteriano, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e a pústula bacteriana, causada por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

## 2.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

### 2.2.1 Aspectos Gerais

A nomenclatura endófito (*Endophyte*) tem origem Grega, na qual o termo 'endon' significa 'de dentro' e 'phyte' significa 'planta' (CARROLL, 1988).

Bactérias endofíticas são definidas como todos os microrganismos que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, podendo contribuir para a sanidade e o crescimento de seu hospedeiro, sem causar efeitos negativos sobre o desenvolvimento da cultura (AZEVEDO et al., 2000; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004, SHENPAGAM et al., 2012).

Até meados da década de 70 pouco se sabia a respeito dos microrganismos endofíticos. A partir de então, começou-se a verificar a sua importância para as plantas. Um dos primeiros trabalhos relatados com bactérias endofíticas foi publicado por Colombo (1978). Neste trabalho, o autor observou a presença desses microrganismos no interior dos filamentos cenocíticos de algas, em talos e entre sífões, propondo haver uma associação microorganismo-hospedeiro em uma relação de equilíbrio fisiológico entre ambos.

Desde os primeiros trabalhos confiáveis sobre o isolamento de bactérias endofíticas da superfície esterilizada de plantas (MUNDT; HINKLE, 1976), mais de 200 gêneros de bactérias de 16 filos tem sido reportados como endofíticas, como as pertencentes aos filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*,

*Proteobacteria*, *Spirochaetes* e *Verrucomicrobiae*, que incluem tanto bactérias cultiváveis como não cultiváveis (BERG; HALLMANN, 2006; MENGONI et al., 2009; MANTER et al., 2010; SESSITSCH et al., 2012). Entretanto, as endofíticas mais estudadas e de maior predominância pertencem aos três maiores filos (*Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*) e incluem os membros do filo *Azoarcus* (KRAUSE et al., 2007), *Acetobacter* (renomeadas como *Gluconobacter*) (BERTALAN et al., 2009), *Bacillus* (DENG et al., 2011), *Enterobacter* (TAGHAVI et al., 2010), *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Serratia* (TAGHAVI et al., 2009) e *Streptomyces* (SUZUKI et al., 2005).

Recentemente, tem-se observado o isolamento de microrganismos endofíticos de diversos tecidos, tais como: flores, frutos, folhas, caules, raízes e sementes de várias espécies vegetais (ZINNIEL et al., 2002; MANO; MORISAKI, 2008; SUN et al., 2008; ALTALHI, 2009; ANDREOTE et al., 2010). Esse procedimento para obtenção dos microrganismos endofíticos deve ser realizado cumprindo-se, minuciosamente, as etapas de desinfestação superficial dos tecidos vegetais, uma vez que o caráter endofítico é atribuído às bactérias isoladas, exclusivamente, a partir de tecidos vegetais sadios superficialmente estéreis (HALLMANN et al., 1997).

Quando isolados corretamente desses tecidos, os endófitos podem apresentar ação antagônica a fungos e bactérias patogênicas em testes *in vitro* e realizar um controle biológico desses patógenos quando reinoculados na cultura. Esse controle pode ocorrer de forma direta, através do parasitismo, de forma indireta, seja por competição por nutrientes ou pela indução de defesa das plantas, ou de forma mista, devido à produção de antibióticos e à atividade de antagonismo (AZEVEDO et al., 2000).

Além da atividade de antagonismo a microrganismos patogênicos, as bactérias endofíticas são capazes de controlar insetos (AZEVEDO et al., 2000; LAMPEL et al., 1994; TOMASINO et al., 1995; NAMBIAR; MA; IYER, 1990; DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000) e nematóides (HALLMANN, 1998). Em alguns casos, podem também acelerar a emergência das plântulas, promover o estabelecimento de plantas em condições adversas (CHANWAY, 1997) e auxiliar no crescimento do vegetal (BENT; CHANWAY, 1998), produzindo substâncias ou metabólitos análogos a hormônios vegetais, como giberelinas, auxinas e citocininas (BUCHENAUER, 1998; CATTELAN; HARTEL, 2000; GUTIERREZ-MANERO et al.,

2001), ou estimulando a produção desses hormônios pela planta, agindo na alongação e diferenciação celular, na emissão e aumento da permeabilidade de raízes (GLICK; BASHAN, 1997), no florescimento e no amadurecimento de frutos (LAZAROVITS; NOWAK, 1997) e através da solubilização e disponibilização de fósforo e nitrogênio para as plantas (GLICK; BASHAN, 1997).

A identificação e classificação filogenética das bactérias endofíticas é uma etapa essencial para conhecer a comunidade bacteriana presente na cultura hospedeira. Baseado no gene 16S DNAr é possível amostrar a população dos microrganismos isolados de diferentes tecidos e estudar a associação planta-bactéria endofítica existente no hospedeiro assim como a interferência de diversos fatores que influenciam na quantidade e na diversidade desses microrganismos (ARAÚJO et al., 2001; GARBEVA et al., 2001; SESSITSCH et al., 2002; SUN et al., 2008).

### 2.3 ASSOCIAÇÃO PLANTA - BACTÉRIA ENDOFÍTICA

Microrganismos endofíticos relacionam-se com a planta hospedeira de forma neutra ou simbiótica, e habitam tanto o interior quanto a superfície da maioria dos vegetais, vivendo como endófitas e epífitas, respectivamente. Ambos se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças (KUKLINSKY-SOBRAL, 2003).

No entanto, essa distinção entre os microorganismos é meramente didática. Na natureza, observa-se uma sobreposição entre esses grupos. Não há um limite claro que os diferencie. Pode haver ocasião em que uma bactéria epifítica entre em uma planta permanecendo endofítica ou causando danos à mesma, da mesma forma que uma bactéria endofítica pode tornar-se um patógeno, quando em desequilíbrio com outros endófitos e em condições ambientais favoráveis para a sua patogenicidade (ANDREWS; HARRIS, 2000).

Em virtude da endofítica se localizar dentro do hospedeiro e, dessa forma, aproveitar de forma direta os nutrientes que ali estão, não estando sujeita à competição por nutrientes, o que normalmente ocorre na rizosfera, sugere-se que esse microorganismo encontra-se em uma forma mais favorável de ambiente do que as bactérias rizosféricas, sendo, portanto, mais eficazes na promoção de crescimento, absorção de água e na supressão de microrganismos deletérios

(AMORIM; MELO, 2002; SANTOS et al., 2005). Além disso, acredita-se que os tecidos internos das plantas provêm um ambiente mais uniforme e protegido para os microrganismos do que a superfície, onde estes estão expostos aos estresses ambientais tais como temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta, e competição entre microrganismos, que são fatores limitantes para a sobrevivência da bactéria (HALLMANN et al., 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998)

A origem, forma de penetração e colonização das bactérias endofíticas ainda não estão totalmente esclarecidas. A entrada de bactérias nas plantas pode ocorrer por aberturas naturais, estômatos, lenticelas, hidatódios, injúrias causadas por insetos e maquinário agrícola e ainda pela liberação de enzimas hidrolíticas como celulases e pectinases, resultando na degradação da parede celular das plantas (HALLMANN et al., 1997). No entanto, as raízes são consideradas uma das portas de entrada mais utilizadas pelas bactérias endofíticas. O crescimento da raiz primária e/ou a emergência de raízes laterais resulta em aberturas ou abrasões que facilitam a entrada do microrganismo (AZEVEDO, 1998).

A colonização desses microrganismos pode ocorrer de duas formas: local, sendo observada em um tecido específico da planta, como o córtex; ou sistêmica, sendo transportada através dos elementos condutores ou via apoplastos (JAMES et al., 1994). Preferencialmente, bactérias endofíticas colonizam os tecidos de forma intercelular, com poucos relatos de colonização intracelular (HALLMANN et al., 1997).

De acordo com alguns autores (ANDREOTE et al., 2010; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2005; ZINNIEL et al., 2002), existem diversos fatores que podem afetar a composição da comunidade bacteriana no interior das plantas, entre eles estão a espécie, o tecido, o estágio de desenvolvimento do hospedeiro, as alterações no metabolismo da planta, as aplicações de substâncias químicas e as interações com outros microrganismos.

Kuklinsky-Sobral et al. (2004) isolaram bactérias endofíticas de soja e observaram maior população microbiana na raiz e menor quantidade de microrganismos em folhas. Fisher, Petrini e Lappin-Scottl. (1992) estudaram a distribuição de bactérias endofíticas na cultura do milho e verificaram que as partes das plantas mais próximas do solo eram mais colonizadas por esses microrganismos do que as parte superior das plantas. Assim como descrito anteriormente (MCINROY; KLOPPER, 1995; LAMB; TONKYN; KUPFEL, 1996; ELVIRA-

RECUENCO; VAN VUURDE, 2000), as raízes parecem ser o local preferencial para as bactérias endofíticas, sugerindo que esses microrganismos podem deslocar-se para os tecidos superiores a partir das raízes durante o desenvolvimento da planta. Esta preferência pelo tecido radicular reflete a presença de níveis elevados de nutrientes na rizosfera, fato que resulta em um maior crescimento e um elevado metabolismo dos endófitos presentes nas raízes quando comparado com o desenvolvimento desses microrganismos nos demais tecidos da planta (GLICK, 1995).

Assumpção et al. (2009) estudaram a diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja convencional e transgênica. Os autores verificaram que dos 62 isolados identificados, 23 (37%) foram oriundos de plantas geneticamente modificadas e 39 (63%) de plantas convencionais. No entanto, houve diferença na comunidade endofítica dessas sementes. Apesar de ter sido verificado um número de isolados menor de plantas geneticamente modificadas, observou-se uma maior diversidade (15 gêneros) comparada à comunidade isolada de plantas convencionais (sete gêneros). Além do mais, os autores relataram a presença de gêneros bacterianos isolados tanto de plantas convencionais quanto das geneticamente modificadas: *Microbacterium*, *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus* e *Methylobacterium*; gêneros exclusivos de plantas convencionais: *Pantoea* e *Acinetobacter*; e gêneros exclusivos de plantas geneticamente modificadas: *Tsukamurella*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Chryseobacterium* e *Micromonospora*.

Embora existam muitos estudos sobre a caracterização de bactérias endofíticas, pouco se sabe sobre as interações planta-bactéria e suas propriedades como potenciais bactérias benéficas para serem usados como inoculantes no campo visando o melhor desenvolvimento e sanidade das culturas (HUNG; ANNAPURNA, 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005; HUNG et al., 2007; KANG et al., 2007; ASSUMPÇÃO et al., 2009; ANDREOTE et al., 2010).

#### 2.4 ATIVIDADE DE ANTAGONISMO A MICRORGANISMOS PATOGÊNICO

Bactérias endofíticas vêm sendo estudadas como agentes de biocontrole de patógenos causadores de doenças bacterianas e fúngicas em plantas. O uso desses microrganismos é uma alternativa economicamente viável e

ambientalmente correta quando comparado ao método de controle químico, o qual resulta em diversos riscos para a saúde humana e demais animais, causa danos na microbiota, desequilíbrios no ambiente diminuindo as populações de inimigos naturais além de deixar resíduos no meio ambiente (MEDEIROS; VILELA; FRANÇA, 2006; ETHUR et al., 2007). Grigoletti Junior, Santos e Auer (2000) relataram que o controle biológico não contamina, não desequilibra o meio ambiente e não deixa resíduos. Além disso, propõe na medida do possível manter o equilíbrio no agroecossistema, de modo que a planta hospedeira, na presença do patógeno, não sofra perdas na produtividade, devido ao efeito antagônico exercido pelos organismos endofíticos.

Diferentes espécies de bactérias endofíticas têm sido isoladas e testadas, *in vitro* e *in vivo*, como potenciais agentes no biocontrole de patógenos causadores de doenças fúngicas e bacterianas de diversas culturas.

Assumpção et al. (2009) isolaram, caracterizaram e identificaram a comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja avaliando o potencial biotecnológico desses microrganismos. 62 isolados foram avaliados quanto à capacidade antagonista a três gêneros diferentes de fungos fitopatogênicos: *Fusarium semitectum*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Phomopsis sojae* e *Cercospora kikuchii*. Nenhuma das bactérias isoladas apresentou ação antagonista aos fungos *P. sojae* e *F. verticillioide*. Entretanto, 18% dos isolados bacterianos apresentaram antagonismo a pelo menos um dos seis fungos testados.

Em estudo realizado por Paz (2009), o autor isolou 28 estirpes de bactérias endofíticas e verificou que 42,8% foram capazes de formar halos de inibição do crescimento de *Xanthomonas* sp., *in vitro*, sendo identificadas como *Bacillus pumilis* e *Bacillus* sp.

Silva et al. (2008) selecionaram isolados de bactérias endofíticas de diferentes espécies e gêneros obtidos de folhas e haste de tomateiro e pimentão para o controle da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae*) do tomateiro; as espécies bacterianas mais eficazes na redução da severidade da pinta bacteriana foram *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus sphaericus*, *B. amyloliquefaciens* e *Staphylococcus aureus*. Mais de 50% dos isolados eficazes na redução da severidade foram da espécie *Bacillus pumilus*.

Dalal e Kulkarni (2013) realizaram uma triagem de bactérias endofíticas isoladas de soja indígena (CV.JS-353) para a atividade de antagonismo

contra *R. solani*, *F. oxysporum*, *S. rolfsii*, *C. truncatum*, *A. alternata* e *M. phaseolina* e verificaram que dos 31 isolados recuperados 12 apresentaram atividade de antagonismo a pelo menos um dos seis fungos testados, com destaque para o isolado JD3 (*Pseudomonas* sp.) que inibiu o crescimento de quatro patógenos (*R. solani*, *F. oxysporum*, *S. rolfsii* e *C. truncatum*).

Polli et al. (2013) testaram o antagonismo, *in vitro*, de 4 bactérias endofíticas isoladas de sabão-de-soldado (*Sapindus saponaria*) contra *Didymella bryoniae*, agente causal do crestamento gomoso do caule em melância. Os resultados demonstraram que as bactérias apresentaram de 8,3% à 36,6% de controle sob o fungo patogênico.

Bactérias podem realizar o antagonismo a microrganismos fitopatogênicos através da síntese de biosurfactantes: surfactantes de origem biológica. Estes são moléculas complexas que compreendem diferentes estruturas, dentre as quais incluem-se os lipopeptídeos, os glicolipídeos, as proteínas, os ácidos graxos e os fosfolipídios (AHIMOU et al., 2000).

Os surfactantes de origem microbiana apresentam várias vantagens em relação aos surfactantes sintéticos: sintetizados em sua grande maioria a partir do petróleo, tais como a biodegradabilidade, a baixa toxicidade, a biocompatibilidade e a habilidade em serem produzidos a partir de substratos baratos e renováveis, o que os tornam compostos bastante atrativos (ROSENBERG, 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os lipopeptídeos apresentam baixo peso molecular e representam uma classe de surfactantes microbiológicos com crescente interesse científico, terapêutico e biotecnológico. Estes compostos são produzidos por uma larga variedade de microrganismos, na qual destaca-se o gênero *Bacillus*, que apresenta grande atividade antimicrobiana (MULLIGAN, 2004). Segundo Nitschke et al. (2004), a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, por exemplo, solubiliza os principais componentes das membranas celulares microbianas, funcionando, dessa forma, como antibiótico. Essa característica proporciona a esses microrganismos uma maior chance de sobrevivência e uma maior competitividade na busca por nutrientes. Além desse grupo, destacam-se também o grupo das iturinas A, C D e o das bacilomicinas D, F e L (AHIMOU et al., 2000).

Monteiro et al. (2005) verificaram que a produção de compostos lipopeptídicos por *Bacillus subtilis* R14 foram efetivos no controle de *Xantomonas*



*campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas. Santos (2004) demonstrou a atividade antimicrobiana de *B. subtilis* R14, tanto *in vitro* como *in vivo*, contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha aquosa do melão. Carvalho (2005) demonstrou a atividade antimicrobiana *in vitro* destes compostos contra *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal da galha-da-coroa em leguminosas e contra *Erwinia amylovora*, agente causal da ferrugem de fogo em cultivares de maçã, pêra, uva, dentre outros.

Outros compostos lipopeptídicos que têm sido estudados como agentes antifúngicos em virtude de seus potenciais de controle biológico são os *burkholdines*. Estes representam uma grande família de lipopeptídios cíclicos isolado a partir de estirpes de *Burkholderia*. Lin et al. (2000) observaram que *B. ambifaria* 2,2N tem forte atividade antimicrobiana, a qual foi verificada contra *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* e *Mycosphaerella figiensis*. Como fonte provável da atividade antifúngica contra esses microrganismos, os *burkholdines* são considerados estruturas essenciais para o desenvolvimento de novos produtos antifúngicos. Além disso, *occidiofungins*, obtidos a partir de *B. contaminans*, foram recentemente mostrados serem quase idênticos à *Burkholdines* Bk-1229 e Bk-1097. Além dessas, encontra-se na literatura outras estruturas de *burkholdines* com potente atividade antifúngica, tais como Bk-1119, Bk-1213 e Bk-1215 (LIN et al., 2012). Assim como estes compostos, os *occidiofungins* são agentes antifúngicos potentes, os quais são responsáveis pela degradação da membrana celular do microrganismo patogênico. A extração desses lipopeptídeos pode ser realizada através de uma técnica que utiliza da combinação de precipitação do sobrenadante em meio ácido e extração do solvente com metanol (VATER et al., 2002).

Já as proteínas são estruturas que apresentam alto peso molecular e podem ser obtidas através da separação de meios aquosos por precipitação. Este é considerado um dos métodos mais tradicionais para a recuperação e purificação parcial dessas moléculas. Os precipitados de proteínas são agregados de moléculas protéicas suficientemente grandes para serem decantados ou centrifugados. É uma técnica de fácil ampliação de escala e com viabilidade para operação contínua a custos aceitáveis para grandes volumes. Nessa técnica, a adição de sais neutros, principalmente sulfato de amônio a elevadas concentrações reduz a disponibilidade da água devido à hidratação dos íons criando condições para a precipitação, a qual ocorre principalmente por interação das zonas hidrófobas.

Ainda que os testes de antagonismo *in vitro* com a utilização desses compostos nem sempre apresentem o mesmo resultado *in vivo* (FREITAS; PIZZINATTO, 1991), há os que defendem seu uso, com base no fato de que a detecção de isolados com características antagônicas eficientes pode facilitar uma primeira seleção, já que frequentemente se trabalha com um grande número de isolados (LUCON; MELO, 1999). Além disso, a pesquisa com bactérias endofíticas oferece uma oportunidade inovadora para a descoberta de novas estirpes com utilidade biotecnológica como inoculantes biológicos.

## 2.6 REFERÊNCIAS

- AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and Iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, 27, 749–754, 2000.
- ALTALHI, A.D. Plasmids profiles, antibiotic and heavy metal resistance incidence of endophytic bacteria isolated from grapevine (*Vitis vinifera* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p. 5873-5882, 2009.
- AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.
- ANDREOTE, F.D.; ROCHA, U.N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; VAN OVERBEEK, L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 389–399, 2010.
- ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganism on plant surfaces. **Annual reviews of Phytopathology**, v.38, p.145-180, 2000.
- ARAÚJO, A.S.F. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v.52, p.799-804, 2003.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.
- ASSUMPÇÃO, L.C.; LACAVAL, P.T.; DIAS, A.C.F.; AZEVEDO, J.L.; MENTEN, J.O.M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 117-137.

- 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**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 980-988, 1998.
- BERG, G.; HALLMANN, J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T.N. **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer, 2006. p. 53–67.
- BERTALAN, M.; ALBANO, R.; PÁDUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K. et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, p. 450, 2009.
- BUSSE, M.D.; RATCLIFF, A.W.; SHESTAK, C.J.; POWERS, R.F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1777-1789, 2001.
- CARLISLE, S.M.; TREVORS, J.T. Glyphosate in the environment. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.39, p.409-420, 1988.
- CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v. 69, p. 2-9, 1988.
- CARVALHO, A.L.U. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: Produção de lipopeptídeos e esporos**. Recife, PE, PÓS-BIOTEC/UFPE, 2005, 50p (Dissertação).
- CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with PGPR soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, Bethesda, v. 43, p. 99-112, 1997.
- COLOMBO, P.M. Occurrence of endophytic bacteria in *Siphonous algae*. **Phycologia**, Padova, v.17, p.148-151, 1978.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de Safra Brasileira: grãos**. Nono levantamento. Julho 2013. Brasília: CONAB, 2013. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_07\\_09\\_09\\_04\\_53\\_boletim\\_graos\\_junho\\_\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_07_09_09_04_53_boletim_graos_junho__2013.pdf)>. Acesso em: 21 mai. 2014.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2013/2014**. Sétimo Levantamento. Abril/2014. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_04\\_10\\_09\\_02\\_31\\_boletim\\_graos\\_abril\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_10_09_02_31_boletim_graos_abril_2014.pdf)> Acesso em: 21 mai 2014.
- DALAL, J.; KULKARNI, N. Antagonistic and Plant Growth Promoting Potentials of Indigenous Endophytic Bacteria of Soybean (*Glycine max* (L) Merrill). **Current Research in Microbiology and Biotechnology** 1(2): 62-69, 2013.

DENG, Y.; ZHU, Y.; WANG, P.; ZHU, L.; ZHENG, J.; LI, R.; RUAN, L.; PENG, D.; SUN, M. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 8, p. 2070-2071, 2011.

DOWNING, K.J.; LESLIE, G.; THOMSON, J.A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens* chiA genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2804-2810, 2000.

ELVIRA-RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Can J Microbiol** 46: 1036–1041, 2000.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja: Diferentes usos dos grãos**. 2007. Disponível em: [http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=25&cod\\_pai=29](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29). Acesso em 22 jul. 2013. EMBRAPA-SOJA, 2004. 51p. Documentos n.235.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; FLORES, M. G. V. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1794-1797, 2007.

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

FORLANI, G.; MANGIAGALLI, A.; NIELSEN, E.; SUARDI, C.M. Degradation of the phosphonate herbicide glifosato in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. **Soil Biology & Biochemistry**, v.31, p.991-997, 1999.

FREITAS, S.S.; PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v.17, p.105-112, 1991.

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

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free living bacteria. **Can J Microbiol** 41: 109–117, 1995.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v. 30, n. 0, p. 155-165, 2000.

HALLMANN J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, WF.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 895–914, 1997.

- HALLMANN, J. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 30, p. 925–937, 1998.
- HANEY, R.L.; SENSEMAN, S.A.; HONS, E.M.; ZUBERER, D.A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Sci.** 48, 89–93, 2000.
- HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes**. Noções gerais. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2004. 51p. Documentos n.235
- HUNG, P.Q.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). **Omonrice**, v. 12, p. 92-101, 2004.
- HUNG, P.Q.; KUMAR, S.M.; GOVINDSAMY, V.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. **Biol Fertil Soils**, v. 44, p. 155–162, 2007.
- ISAAA. INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS. 2013. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013**. Disponível em: <<http://isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/default.asp>>. Acesso em: 14 maio 2014.
- KANG, S.H.; HYUN-SOO, C.; HOON, C.; CHOONG-MIN, R.; JIHYUN, F.K.; SEUNG-HWAN, P. Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, n. 1, p. 96-103, 2007.
- KONONOVA, S.V.; NESMEYANOVA, M.A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. **Biochemistry**, v.67, n. 2, p. 184-195, 2001
- KRAUSE, A.; RAMAKUMAR, A.; BARTELS D.; BATTISTONI F.; BEKEL T.; BOCH J.; BÖHM M.; FRIEDRICH, F.; HUREK, T.; KRAUSE, L.; LINKE, B.; MCHARDY, A.C.; SARKAR, A.; SCHNEIKER, S.; SYED, A.A.; THAUER, R.; VORHÖLTER, F.-J.; WEIDNER, S.; PÜHLER, A.; REINHOLD-HUREK, B.; KAISER, O.; GOESMANN, A. Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Nature Biotech.**, v. 24, p. 1385-1391, 2007.
- KREMER, R.J.; MEANS, N.E.; KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organism. **Intern J. Anal. Chem.**, v. 85, p. 1165-1174, 2005.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine Max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174 p. Tese (Doutorado em Agronomia), - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244–125, 2004.

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

LAMB, T. G.; TONKYN, D. W.; KUPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Can J Microbiol** 42: 1112–1120, 1996.

LAMPEL, J.S.; CANTER, G.L.; DIMOCK, M.B.; KELLY, J.L.; ANDERSON, J.J.; URATANI, B.B.; FOULKE-JR, J.S.; TURNER, J.T. Integrative cloning, expression, and stability of the cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. cynodontis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.501-508, 1994.

LEITE, P.R.S.C.; MENDES, F.R.; PEREIRA, M.L.R.; LACERDA, M.J.R. Limitações da utilização da soja integral e farelo de soja na nutrição de frangos de corte. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1138-1157, 2012.

LEVESQUE, C.A.; RAHE, J.E. Herbicide interactions with fungal root pathogens, with special reference to glyphosate. **Annual Reviews Phytopathology**, v.30, p.597-602, 1992.

LIN, Z.; FALKINHAM, J.O.; TAWFIK, K.A.; JEFFS, P. Burkholderines from *Burkholderia ambifaria*: antifungal agents and possible virulence factors. **J Nat Prod**. 2012 Sep 28;75(9):1518-23

LIU, C.F.; PAN, T.M. Beneficial Effects of bioactive peptides derived from soybean on human health and their production by genetic engineering. In: EL-SHEMY, H. **Soybean and health**. China: Intech, 2011. p. 311-328.

LUCON, C.M.M.; MELO, I.S. Seleção de rizobactérias antagônicas a *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica, em tubérculos de batata. **Summa Phytopathologica**, v.25, p.132-136, 1999.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MANO, H.; MORISAKI, H. Endophytic Bacteria in the Rice Plant. **Microbes Environ**, v. 23, n. 2, p. 109-117, 2008.

MANTER, D.K.; DELGADO, J.; HOLM, D.G.; STONG, R. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. **Microb. Ecol.**, v. 60, p. 157-166, 2010.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2012. **Brasil projeções do agronegócio 2012/2013 a 2022/2023**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/projecoes%20%20versao%20atualizada.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20%20versao%20atualizada.pdf)>. Acesso em 07 abr. 2014.

MCINROY, J. A.; KLOEPPER, J. H. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Can J Microbiol** 41: 895–901, 1995.

MEDEIROS, M. A.; VILELA, N. J.; FRANÇA, F. H. Eficiência técnica e econômica do controle biológico da traça-do-tomateiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 180-184, 2006.

MENGONI, A.; PINI, F.; HUANG, L-N; SHU, W-S; BAZZICALUPO, M. Plant-by-plant variations of bacterial communities associated with leaves of the nickel hyper accumulator *Alyssum bertolonii* Desv. **Microb. Ecol.**, v. 58, p. 660-667, 2009.

MONTEIRO, L. MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48(1), 23-29, 2005.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198, 2004.

MUNDT, J.O.; HINKLE, N.F. Bacteria within ovules and seeds. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 32, n. 5, p. 694–698, 1976.

NAMBIAR, P.T.C.; MA, S.W.; IYER, V.N. Limiting an insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of the *Pigeon pea* (*Cajanus cajan*) by engineering the expression of an entomocidal gene in its root nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.2866-2869, 1990.

NEUMANN, G.; KOHLS, S.; LANDSBERG, E.; STOCK-OLIVEIRA SOUZA, K.; YAMADA, T.; RÖMHELD, V. Relevance of glyphosate transfer to non-target plants by rhizosphere. **Journal of Plant Diseases and Protection**, p. 936-969, 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**,25(5), 772-776, 2002.

NITSCHKE, M; HADDAD, R.; COSTA, G.N.; GILIOLI, R.; MEURER, E.C.; GATTI, M.S.V.; EBERLIN, M.N.; HÖEHR, N. F.; PASTORE, G.M. Structural Characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Science and Biotechnology**, 13, 591-596, 2004.

PAZ, I.C.P. **Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

PENAZOLA-VAZQUEZ, A.; MENA, G.L.; HERRERA-ESTRELLA, L.; BAILEY, A.M. Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.538-543, 1995.

POLLI, A; GARCIA, A; SANTOS, C; RHODEN, S; POLONIO, J; AZEVEDO, J; PAMPHILE, J. Atividade antagonística de bactérias endofíticas isoladas de folhas de

*Sapindus saponaria* L. (*Sapindaceae*) contra o fitopatógeno *Didymella bryoniae*. **Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**. v. 2, n. 3, p. 317-319, 2013.

PRIMOMO, V.S.; FALK, D.E.; ABLETT, G.R.; TANNER, J.W.; RAJCAN, I. Genotype × environment interactions, stability, and agronomic performance of soybean with altered fatty acid profiles. **Crop Science**. v. 42, n. 1, p. 37-44. 2002.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends In Microbiology**, v. 6, p. 139-144, 1998.

RICORDI, A.H.; TORNISIELO, V.L.; ALMEIDA, G.P.A. Translocação de <sup>14</sup>C-glifosato entre *Brachiaria brizantha* e mudas de café (*Coffea arabica*) e citros (*Citrus limonia* Osbeck). *In*: Simpósio internacional sobre glyphosate, 1., 2007, Botucatu.

**Anais...Botucatu**: FCA-UNESP, 2007. p. 307-310.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: [s.n.], p. 275-289, 2005.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52, 154-162, 1999.

SANTOS, A.; FLORES, M. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of freeliving heterotrophic bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.349-352, 1995.

SANTOS, E.R. **Controle biológico da mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***. Recife, PE, PÓS-BIOTEC/UFPE, 2004, 60p (Dissertação).

SANTOS, L.D.T.; TIBURCIO, R.A.S.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, F.A.; OLIVEIRA, J.A.; BENTIVENHA, S.; FERREIRA, L.R. Exsudação radicular de glyphosate por braquiária e seus efeitos em plantas de eucalipto. *In*: Simpósio internacional sobre glyphosate, 1., 2007, Botucatu. **Anais...Botucatu**: FCA-UNESP, 2007. p. 318-321.

SANTOS, M.H.L.C.; MARIANO, R.L.R.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, A.G.; WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v. 32, n. 2, p. 1-8, 2005.

SESSITSCH, A.; HARDOIM, P.; DÖRING, J.; WEILHARTER, A.; KRAUSE, A.; WOYKE, T.; MITTER, B.; HAUBERG-LOTTE, L.; FRIEDRICH, F.; RAHALKAR, M.; HUREK, T.; SARKAR, A.; BODROSSY, L.; VAN OVERBEEK, L.; BRAR, D.; VAN ELSAS, J.D.; REINHOLD-HUREK, B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 25, n. 1, p. 28-36, 2012.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, p.23-32, 2002.



SHENPAGAM, N.H.; KANCHANA, D.; SINDUJA, G.; SANDHYA, R. Isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants and its mutational effect in biocontrol activity. **IJPSR**, v. 3, n. 11, p. 4338-4344, 2012.

SILVA, A.A.; SILVA, J.F. **Tópicos em manejo integrado de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 367 p.

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008.

SIMAS, R.C. **Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia no infravermelho próximo**. 2005. 119 p. Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16SrDNA sequence analysis. **MicrobEcol**, v. 55, p. 415–424, 2008.

SUZUKI, T.; SHIMIZU, M.; MEGURO, A.; HASEGAWA, S.; NISHIMURA T.; KUNOH, H. Visualization of infection of an endophytic Actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured *Rhododendron*. **Actinomycetologica**, v. 19, n.1, p. 7–12, 2005.

TAGHAVI, S.; GARAFOLA, C.; MONCHY, S.; NEWMAN, L.; HOFFMAN, A.; WEYENS, N.; BARAC, T.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 3, p. 748-57, 2009.

TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D.; HOFFMAN, A.; ZHANG, Y-B.; WALLA, M.D.; VANGRONSVELD, J.; NEWMAN, L.; MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PLoS genetics**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2010.

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

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. (2002) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Appl Environ Microbiol** 68: 6210–6219.

VIDAL, R.A.; MEROTTO JR, A. **Herbicidologia**. 1. ed. Porto Alegre: [s.n.], p.37-46, 2001.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant Soil** 122, 21–28, 1990.

YAMADA, T.; CASTRO, P.R.C. Efeito do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. **Encarte técnico: Informações Agronômicas**. n. 119, 2007. 32p.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2198-2208, 2002.

### 3. ARTIGO: BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE SOJA NO CONTROLE *IN VITRO* DE PATÓGENOS FÚNGICOS E BACTERIANOS

#### 3.1 RESUMO E ABSTRACT

##### RESUMO

Objetivos: testar o potencial de bactérias endofíticas isoladas de soja RR e convencional no controle, *in vitro*, de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis sojae*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Além disso, caracterizar parcialmente o composto responsável pela atividade de antagonismo e, em longo prazo, desenvolver um produto comercial para ser utilizado como inoculante para a proteção das culturas.

Metodologia e Resultados: 223 bactérias endofíticas foram isoladas de raízes, caules e folhas de cultivares de soja e testadas quanto à atividade de antagonismo contra *S. sclerotiorum* e *P. sojae*. Os 13 isolados que apresentaram atividade de biocontrole a pelo menos um dos dois patógenos foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S DNAr e tiveram seus sobrenadantes testados contra os dois fungos acima citados, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* através do fracionamento com sulfato de amônio e da extração do solvente com metanol, a fim de determinar se as moléculas antifúngicas e/ou antibacterianas eram proteínas ou lipopetídeos, respectivamente. A atividade de antagonismo do sobrenadante dos isolados foi determinada através da mensuração do halo transparente de inibição com auxílio de régua milimetrada. Calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento dos patógenos fúngicos.

Conclusões: *Bacillus* sp. e *Burkholderia* sp. destacaram-se no controle dos patógenos utilizados neste estudo podendo ser considerados candidatos para o desenvolvimento de inoculantes para a proteção de culturas. O composto responsável pela atividade de antagonismo desses isolados, possivelmente, é de origem peptídica.

Significância e Impacto do Estudo: O estudo engloba a questão ambiental dos agroquímicos, pois enfatiza o controle biológico como alternativa aos agentes patogênicos, impactando na sustentabilidade agrícola.

**Palavras-chave:** Atividade de antagonismo. Controle Biológico. Interação planta-bactéria.

## **POTENTIAL OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM SOYBEAN IN CONTROL *IN VITRO* OF FUNGAL AND BACTERIAL PATHOGENS**

### **ABSTRACT**

**Aims** Test the potential of endophytic bacteria in control, *in vitro*, of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis. Sojae*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. In addition, partially characterize the compound responsible for antagonism activity and long term to develop a commercial product to be used as inoculum for the protection of crops.

**Methodology and Results:** 223 endophytic bacteria were isolated from roots, stems and leaves of soybean cultivars and tested for antagonistic activity against *S. sclerotiorum* and *P. sojae*. The 13 isolates with biocontrol activity to at least one of the two pathogens were identified by 16S rDNA gene sequencing and had their supernatants tested against both fungi mentioned above, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* by ammonium sulfate fractionation and solvent extraction with methanol in order to determine whether the antifungal and/or antibacterial proteins or molecules were lipopetídeos respectively. The antagonistic activity was determined by measuring the transparente inhibition zone with the aid of a millimeter ruler. The percentage of growth inhibition of the fungal pathogens were calculated.

**Conclusions:** *Bacillus* sp. and *Burkholderia* sp stood out in the control of pathogens used in this study may be considered candidates for the development of inoculants for crop protection. The compound responsible for the antagonism activity of these isolates is possibly peptide origin.

**Significance and Impact of the Study:** The study encompasses the environmental issue of agrochemicals, it emphasizes the biological control as an alternative to pathogens, impacting on agricultural sustainability.

**Key-words:** Antagonism activity. Biological control. Plant-bacteria association.

### **3.2 INTRODUÇÃO**

A soja (*Glycine max* L. Merril) é uma das culturas mais importantes no Brasil. Na safra 2013/14, a área plantada da oleaginosa no país foi de aproximadamente 30,1 milhões de hectares, com uma produção de cerca de 86,2 milhões de toneladas (CONAB, 2014). No entanto, perdas significativas na produtividade ocorrem anualmente, entre 15 a 20% do rendimento, devido à ocorrência de doenças. No País, cerca de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus têm sido relatadas (identificadas) para a cultura, dentre as quais se incluem o crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*), a pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), a seca da haste e do caule (*Phomopsis. sojae*) e o crestamento ou requeima (*Rhizoctonia solani*). Esse número tende a aumentar devido à expansão da soja em novas áreas de cultivo e também como consequência da monocultura. Dessa forma, estratégias para o controle de doenças são necessárias para proteger a cultura.

O uso de agroquímicos sintéticos no controle de microrganismos patogênicos de plantas ainda é o método que prevalece entre os agricultores. No entanto, essa prática traz o risco de causar graves danos ambientais, como efeitos prejudiciais sobre a microflora do solo, perigo para a saúde dos seres humanos, toxicidade para animais não-alvo e poluição ambiental.

Alguns métodos alternativos para o controle de doenças fúngicas e bacterianas são o desenvolvimento de variedades resistentes, técnicas agronômicas específicas e o uso de estratégias de controle biológico. O interesse para o controle biológico de patógenos de plantas tem aumentado na última década, especialmente devido à importância do uso de alternativas ecológicas para o uso extensivo de pesticidas químicos no combate dessas doenças (HYNES; BOYETCHKO, 2006). O uso de produtos naturais pode ser uma forma de reduzir esses riscos e perigos causados pelos defensivos químicos. (JAMALIZADEH et al., 2008; PIMENTA et al., 2010).

O biocontrole emerge não somente como uma alternativa viável aos pesticidas químicos, mas também por proporcionar controle de doenças que não podem ser administradas (ou parcialmente) por outras estratégias de controle. O uso de microrganismos benéficos (biopesticidas) é considerado como um dos métodos mais promissores para práticas de manejo mais racional e seguro (BERIC et al., 2012).

Bactérias endofíticas são microrganismos que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, podendo contribuir para a sanidade e o crescimento de seu hospedeiro, sem causar efeitos negativos sobre o desenvolvimento da cultura (BERG; HALLMANN, 2006; TAGHAVI et al., 2009;. BALDOTTO et al., 2010;. MELNICK et al., 2011;. DALAL; KULKARNI, 2013).

Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Agrobacterium* são os agentes de controle biológico predominantemente estudados e comercializados (FRAVEL, 2005). A atividade antifúngica e antibacteriana contra diferentes fitopatogênicos pode ocorrer devido à produção microbiana de proteínas, peptídeos, lipopeptídeos, bacteriocins ou metabólitos secundários. Para cada um destes compostos há um procedimento que deve ser utilizado para precipitar, extrair e purificar a molécula responsável para sua posterior caracterização, como a precipitação com sulfato de amônio e a acidificação e precipitação com metanol, seguido pela cromatografia líquida (DAWNSON; ELLIOTT; JONES, 1969; VATER et al., 2002)

O objetivo do presente estudo foi investigar a capacidade de bactérias endofíticas cultiváveis isoladas de soja para o controle, *in vitro*, de doenças fúngicas e bacterianas da cultura. Além disso, caracterizar, parcialmente, os compostos responsáveis pela atividade anti-microbiana e, a longo prazo, desenvolver produtos comerciais para o uso como inoculantes para proteger as culturas.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Material Vegetal

Cultivares de soja, cultivadas em quatro locais diferentes, foram utilizadas para o isolamento bacteriano. Coletaram-se, ao acaso, três plantas de cada cultivar em cada local experimental no estágio de desenvolvimento R6 (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007). As cultivares coletadas foram: BRS 361 e BRS 245 RR obtidas em Ponta Grossa/PR (25°05'42"S, 50°09'43"W); BRQ09-11694 e BMX Energia em Guarapuava/PR (25°23'43"S, 51°27'29"W) e em Campos Novos/SC (27°24'06"S, 51°13'30"W) - essas cultivares pertenciam a ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –

Soja (Embrapa) - e as cultivares TMG 801 e NK7059 RR obtidas em Cascavel/PR (24°57'21"S, 53°27'19"W), pertencentes a ensaios de VCU da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec). Os materiais foram acondicionados em sacos plásticos e transportados ao laboratório de biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para a esterilização dos tecidos, isolamento dos microrganismos e realização dos testes.

### 3.3.2 Coleta das Amostras de Folhas, Raízes e Caule

As amostras de folhas, raízes e caule das plantas, coletadas em triplicata, foram submetidas a lavagens seriadas com água, álcool 75%, hipoclorito (2%) e solução salina de fosfato esterilizado (PBS - 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,20 g de KCl; 8,00 g de NaCl; pH 7,4). As amostras foram pesadas e maceradas em 1 mL de tampão PBS. As suspensões obtidas foram utilizadas para contagem e isolamento a partir da diluição seriada (1:10, v:v) em tampão PBS até a diluição 10<sup>-3</sup>, segundo a metodologia de Döbereiner, Baldani e Baldan (1995); as diluições subsequentes foram inoculadas em meio de cultura sólido sendo três repetições por diluição. Para o controle da desinfecção dos tecidos, foram realizados testes com amostras das plantas, colocando-as nas placas de Petri e observando-se a ausência de crescimento de fungos e bactérias no meio. Os meios de cultivo utilizados foram o Nutrient Agar (NA) acrescido de glicerol 20%, e Trypticase Soy Agar (TSA), de acordo com a metodologia de Kado e Heskett (1970) e Döbereiner, Baldani e Baldan (1995), respectivamente.

### 3.3.3 Isolamento das Bactérias Endofíticas

Após a incubação, as colônias foram estriadas, individualmente, em placas de Petri contendo os mesmos meios que haviam sido cultivadas anteriormente, incubadas a 30 °C por 2 a 3 dias e, em seguida, armazenadas a 4 °C. Posteriormente, colônias escolhidas ao acaso isoladas nos meios NA e TSA, foram cultivadas em meio líquido Nutrient Broth (NB) e Caldo Triptona Soja (TSB), respectivamente, por 18 h a 30 °C sob agitação constante. Cada isolado bacteriano foi suspenso com glicerol esterilizado 15% e armazenados a - 80 °C.

### 3.3.4 Isolados Patogênicos Utilizados no Estudo

A atividade antagonista de bactérias endofíticas foi determinada contra nove fitopatógenos em dois experimentos.

As bactérias utilizadas neste estudo (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* NCPPB 3658, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* IBSBF 327-NCPPB 3658, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* IBSBF 333-NCPPB 3659, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* LMG 5066, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* IBSBF 355 e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* IBSBF 1462) foram obtidas a partir da Coleção de Culturas do Centro Internacional de Engenharia Genética e Biotecnologia (ICGEB), Trieste, Itália. As estirpes bacterianas foram mantidas em NA e o meio LB foi usado como meio de crescimento. A temperatura de crescimento para ambos os gêneros foi de 30 °C.

Os fungos utilizados neste estudo (*Sclerotinia sclerotiorum* e *Phomopsis sojae*) foram obtidos a partir da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil e *Rhizoctonia solani* foi obtido a partir da coleção de Cultura da Universidade de La Plata, La Plata, Argentina. Uma cultura de estoque de cada patógeno foi mantida, em Potato Dextrose Agar (PDA) a 4 °C. A cultura de trabalho foi estabelecida através da transferência de um pedaço do material estocado para placas de Petri e incubada a 25 °C.

### 3.3.5 Atividade de Antagonismo *In Vitro* (1)

Os fungos utilizados no ensaio preliminar da atividade antifúngica foram *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phomopsis sojae*. Para a determinação da atividade antifúngica de todos os 223 isolados bacterianos contra esses patógenos, espalhou-se uma solução do fungo em meio LB ágar e inoculou-se um pedaço do ágar contendo a bactéria endofítica sobre a solução fúngica, mensurando-se o tamanho do halo de inibição. **Em detalhes:** a cultura do fungo foi crescida em placas de Petri em meio PDA por 4 dias a 25 °C. No terceiro dia, a estirpe bacteriana a ser testada para o antagonismo foi inoculada em meio líquido NB e mantida a 30 °C durante a noite. No quarto dia, o fungo foi ressuspenso em 2 ml de PBS (100 mM fosfato de sódio pH 7.2, 10 g/l NaCl, 0.25 g/l KCl) e 100 ul da suspensão foi espalhada em placas contendo PDA. No dia seguinte 50 ul da cultura bacteriana foi espalhada em



placas com meio LB ágar. Depois da incubação noturna, um pedaço de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> da bactéria foi cortado com alça estéril e inoculado sobre a solução do fungo que havia sido espalhado. As placas foram então incubadas a 25-28 °C durante 4-5 dias. Um halo claro formado em torno das colônias indica a atividade de antagonismo. Os isolados foram classificados em: (-) ausência de halo, ou ausência de atividade; (+) halo pequeno (1-2 mm), pouca atividade; (++) halo médio (3-4 mm), atividade mediana; (+++) halo grande (superior a 4 mm), alta atividade.

### 3.3.6 Caracterização Genotípica dos Isolados

Isolados selecionados que apresentaram atividade de antagonismo a pelo menos um dos fungos previamente testados foram submetidos à análise filogenética do gene 16S DNAr. O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando-se o PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies). O gene 16S DNAr foi parcialmente amplificado em reações de PCR utilizando os primers 338F e 778R como descrito na literatura (LANE, 1991; ANZAI; KUDO; OYAIZU, 1997). A sequência de nucleotídeos foi determinada através do sequenciamento dos produtos da PCR, purificados com o PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Life Technologies), realizado pela empresa Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, South Korea). As sequências foram comparadas e analisadas com outras sequências presentes no *GenBank database* utilizando o programa BLAST disponível no website do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os alinhamentos múltiplos das sequências (Clustal W), bem como a construção das árvores filogenéticas (parâmetros padrão, algoritmo *neighbor-joining*) foram esquematizados no programa MEGA v. 6.0 ([www.megasoftware.net/](http://www.megasoftware.net/)). Suporte estatístico para os nós da árvore foi avaliado por análises de *bootstrap* com 1000 amostras.

### 3.3.7 Precipitação em Meio Ácido e Extração do Solvente com Metanol

Os 13 isolados bacterianos foram cultivados em 200 ml de meio NB por 24 horas à 30 °C/150 rpm e centrifugados por 20 min/4500 rpm à 4 °C para a remoção das células e o sobrenadante da cultura foi utilizado para extração de

lipopeptídeos com metanol. A acidificação foi realizada através da adição de HCl concentrado até atingir o pH da solução para 2,0. A solução foi mantida a 4 °C durante a noite para permitir a formação do precipitado. Posteriormente, outra centrifugação foi realizada para obter o pellet (20 min/4500 rpm/4 °C). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi extraído com metanol por 2 h sob agitação constante. O metanol foi filtrado para a remoção dos materiais restantes e evaporado. Toda a fração obtida depois da evaporação do metanol foi dissolvida em fosfato buffer pH 7,0 e testada para a atividade contra os isolados fitopatogênicos usados no estudo (item 3.3.4) (VATER et al., 2002).

### 3.3.8 Precipitação com Sulfato de Amônio

As bactérias endofíticas foram cultivadas durante uma noite em 500 ml de meio NB à 30 °C/150 rpm. Posteriormente, foram centrifugadas por 30 min/4500rpm à 4 °C. Adicionou-se o sulfato de amônio ao sobrenadante até obter uma saturação de 60% (DAWNSON; ELLIOTT; JONES, 1969). A solução foi agitada até que o sal se dissolvesse, e conservada durante uma noite à 4 °C. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (30 min/4500rpm/4 °C) e o pellet ressuspenso em fosfato buffer pH 7,0 e armazenado à 4 °C e testado contra os isolados fitopatogênicos usados no estudo (item 3.3.4)

## 3.9 ATIVIDADE DE ANTAGONISMO *IN VITRO* (2)

### 3.9.1 Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana dos isolados foi determinada pelo método de difusão em poços modificado (HARRIS et al., 1989). Xag e Psg foram crescidas por 24h em meio líquido PSA e KB, respectivamente. Inoculou-se 100 µL da solução em 15 mL dos respectivos meios (0,75% de ágar) e verteu-se em placas de Petri que continham o meio NA. 50 µL do extrato bacteriano endofítico foram pipetados em poços circulares de 5 mm de diâmetro formados anteriormente. As placas foram incubadas em BOD à 30 °C por 2-3 dias. O halo de inibição foi mensurado com o auxílio de régua milimetrada. O controle negativo foi realizado utilizando solução tampão fosfato a pH 7,0.

### 3.9.2 Atividade Antifúngica

Os efeitos de inibição do crescimento micelial foram estimados através da inibição do crescimento radial. Dividiu-se o meio PDA da placa de Petri em duas partes idênticas. Em uma das metades foi pipetado 500µL do extrato do sobrenadante e espalhado com alça de Drigalski. 1 cm<sup>2</sup> de meio contendo o fungo foi colocado sobre a superfície com o extrato espalhado. O controle foi realizado na outra metade da placa, realizando-se a inoculação de 1 cm<sup>2</sup> do meio contendo o fungo sobre o meio PDA. As placas foram mantidas a temperatura ambiente durante 7 dias e o halo foi mensurado. A porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:  $PI (\%) = \frac{CC-CI}{CC} \times 100$ , onde CC é o diâmetro do crescimento do controle e CI é o diâmetro do crescimento do isolado.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 223 bactérias endofíticas foram obtidas neste estudo através do isolamento de plantas de soja convencional não transgênica (C) e transgênica resistente ao glifosato (GR) cultivadas durante a safra 2013/2014 em quatro ensaios de campo diferentes, em várias localidades, no sul do Brasil (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005; HUNG; ANNAPURNA, 2004; ARANTES et al., 2007). O seguinte número de isolados foi recuperado de cada local de amostragem: Cascavel (PR) 85 (38,1%), Ponta Grossa (PR) 81 (36,3%), Guarapuava (PR) 26 (11,7%) e Campos Novos (SC) 31 (13,9%). Além disso, 58 (26,0%) foram recuperados a partir do caules, 59 (26,5%) a partir de folhas e 106 de raízes (47,5%).

Entre o total dos 223 isolados, 130 estirpes (58,3) foram recuperadas a partir de soja resistente a herbicida e 93 (41,7%) a partir de soja convencional não transgênica.

A atividade antagonista de todos os 223 isolados foi testada contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phomopsis sojae*. Apenas 13 (5,83%) mostraram atividade antagonista para, pelo menos, um dos patógenos testados (Tabela 3.1). Observou-se que duas destas bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* se destacaram sobre as demais, devido a alta atividade antagonista contra os dois fungos testados. Além da *Burkholderia* sp., uma cepa de *Bacillus* sp. destacou-se devido à alta

atividade de antagonismo contra *S. sclerotiorum*. Outros gêneros também foram identificados com a atividade antagonista contra *S. sclerotiorum*, mas com zonas de inibição inferiores às observadas nos gêneros acima mencionados (Tabela 3.1).

Três isolados foram recuperados exclusivamente em soja convencional não transgênica: *Enterobacter ludwigii* (7,7%), *Burkholderia* sp. (23,1%) e *Bacillus* sp. (7,7%); dois exclusivamente de soja transgênica resistente ao glifosato: *Agrobacterium tumefaciens/Rhizobium* sp. (7,7%), e *Pantoea* sp. (7,7%); e dois em ambas as tecnologias: *Enterobacter* sp. (30,8%) e *Variovorax* sp. (15,4%) (Figura 3.1).

O sobrenadante das 13 bactérias endofíticas previamente selecionadas foi utilizado para o antagonismo contra os fungos fitopatogênicos *S. sclerotiorum*, *P. sojae* e *R. solani* e também contra as bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Figuras 3.2 e 3.3).

Metodologias baseadas em cultivos de bactérias em meios de cultura para a identificação de grupos funcionais envolvidos na atividade antagônica têm sido focadas na taxa bacteriana de bactérias que são facilmente cultivadas em meio de cultura e que permitem a análise genética. A maioria dos isolados bacterianos endofíticos que apresentaram atividade antagônica (ou seja, 13 bactérias em um total de 223), foram obtidas de um meio de cultura semi seletivo para determinados grupos ou espécies de bactérias que apresentam atividade antagônica a patógenos fúngicos de plantas.

O dendograma construído a partir das sequências do gene 16S DNAr obtidas das 13 endofíticas selecionadas está apresentado na Fig. 3.4. A maioria dos 13 isolados que apresentaram atividade antifúngica a patógenos de soja que foram recuperados de diferentes tecidos de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR) foram distribuídos em dois grupos separados (I e II) (Figura 3.4). O grupo I agrupou isolados obtidos tanto de plantas transgênicas quanto de convencionais (4 de plantas GR e 3 de plantas C), enquanto que o grupo II agrupou quase que exclusivamente as endofíticas isoladas de plantas convencionais, excetuando-se o isolado 5. Os isolados 9 e 10 apresentaram 100% de similaridade.

Nenhum dos sobrenadantes das estirpes do gênero *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. e *Agrobacterium tumefaciens* ou *Rhizobium* sp., os quais haviam

demonstrado de baixa a média atividade no teste anterior, mostraram qualquer atividade contra os três fungos testados quando o sobrenadante foi processado com os dois métodos para a extração/precipitação das moléculas ativas. Isto sugere que, para estas bactérias, um mecanismo *in vivo* é necessário para determinar o antagonismo.

O sobrenadante dos isolados 6 e 12 (*Variovorax* sp.) mostrou uma pequena percentagem de inibição da atividade antifúngica contra *S.sclerotiorum* e *P.sojae*, variando de 6,67% a 31,03%; no entanto, não mostrou nenhuma atividade contra *R. Solani* sp. *Variovorax* sp. é um importante gênero de bactérias que já foi avaliado como promotor de crescimento de plantas e cujo genoma já foi sequenciado (HAN et al., 2011).

Os testes de atividade antagônica utilizados neste estudo sugerem que o complexo fenômeno da supressividade de doença não pode ser simplesmente atribuído a um único táxon bacteriano ou grupo, mas sim ser regido por consórcios microbianos. Apesar do fato de que estirpes de bactérias carecem de atividade contra alguns patógenos quando testadas sozinhas, estas podem atuar de forma sinérgica quando parte de um consórcio microbiano (MENDES et al., 2011). Isto sugere que os endófitos que apresentaram uma pequena percentagem de inibição ainda podem ser utilizados em conjunto com outras estirpes devido ao seu conhecido potencial como promotores no crescimento da planta.

O sobrenadante dos isolados 7 (*Bacillus* sp.), 8, 9 e 10 (*Burkholderia* sp.) apresentou uma elevada percentagem de inibição, variando de 71,43% a 100%. A análise filogenética das seqüências do gene 16S DNAr revelou que as estirpes de *Burkholderia* sp. número 9 e 10 mostraram seqüências estreitamente relacionadas (Figura 3.4). Todos os isolados apresentaram valores semelhantes de percentagem de inibição de ambas as técnicas - extração com metanol e precipitação com sulfato de amônio - o que sugere que o composto ativo(s) pode ser precipitado com ambos os métodos e são provavelmente de origem peptídica.

Em muitos processos metabólicos bacterianos, bactérias segregam algumas proteínas ou lipopeptídeos ativos, o que poderia controlar os patógenos causadores de doenças de plantas. Kang et al. (2004), analisando o isolamento e caracterização de uma estirpe *Burkholderia* (MSSP) que segrega um composto antifúngico contra *S. sclerotiorum*, descobriram que o principal modo de ação do isolado

de *Burkholderia* sp. no seu estudo parecia ser o antagonismo pela produção de 2-hidroximetil-cromano-4-ona.

Nenhum dos sobrenadantes da estirpe do gênero *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *Variovorax* sp. e *Agrobacterium tumefaciens* ou *Rhizobium* sp. mostraram qualquer atividade contra *Xanthomonas* sp. e *Pseudomonas* sp. estudadas. Contudo, dois dos três isolados pertencentes a *Burkholderia* sp. e *Bacillus* sp. exibiram atividade antimicrobiana contra pelo menos um isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ou *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Além disso, *Burkholderia* sp. mostrou atividade apenas contra *Xanthomonas* sp. e *Bacillus* sp. contra ambas as bactérias fitopatogênicas utilizadas neste estudo.

Berić et al. (2012) estudou 203 isolados de *Bacillus* para o antagonismo contra várias bactérias fitopatogênicas e constatou que nenhum dos sobrenadantes das estirpes de *Bacillus* mostraram qualquer atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e outras, o que difere dos resultados encontrados neste estudo. No entanto, a maioria deles exibiram atividade antimicrobiana muito forte contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, com zonas de inibição variando de 4 a 12 mm, resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Monteiro et al. (2005) relataram que lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* R14 são eficazes no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas. Lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* são lineares ou de natureza cíclica e podem ser divididos em três famílias, iturin, fengycin e surfactina. Eles frequentemente contêm alguns resíduos de aminoácidos, que são únicos e, normalmente, não são encontrados em proteínas, com elevada estabilidade ao pH, de calor, e de protease (KAVITHA et al., 2005).

Além disso, existem algumas proteínas que também têm efeito inibitório. Uma proteína secretada por *B. subtilis* SO113 foi relatada por ter uma atividade antimicrobiana de largo espectro contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, incluindo sete raças do patógeno, na China (LIN et al., 2001). No nosso estudo, provavelmente, a estirpe 7 (*Bacillus* sp.) produz ambas as moléculas, que podem ser responsáveis pela atividade antagonista. Muitas cepas do gênero *Bacillus* e/ou seus metabólitos são estudados visando um método alternativo ou complementar na proteção de plantas em comparação ao método químico de controle (PENGNOO et al., 2000; ABANDA et al., 2006).

O sobrenadante dos isolados 9 e 10 (*Burkholderia* sp.) apresentou atividade antibacteriana apenas contra *Xanthomonas* sp. e variando de acordo com o método de extração utilizado; o isolado 9 mostrou alta atividade, mas apenas quando o sobrenadante foi extraído com precipitação com sulfato de amônio; no entanto, o isolado 10 mostrou baixa atividade, apenas com extração com metanol (Figura 3.3). Isto sugere que a molécula responsável pela atividade antibacteriana do isolado 9 é provavelmente uma proteína; e, possivelmente, a molécula responsável pela atividade antibacteriana do isolado 10 é um lipopeptídeo. Isso será confirmado em estudos futuros, utilizando a técnica de cromatografia líquida. Ficou claramente demonstrado e confirmado que *Bacillus* sp. estão entre os microrganismos mais eficazes no controle de vários patógenos causadores de doenças nas plantas e provaram serem potencialmente úteis para serem utilizados como agentes de biocontrole (NAGORSKA et al., 2007).

Embora, em certos casos, a mistura de diferentes estirpes não tem efeito sinérgico, a aplicação do/a inoculação com uma mistura de bactérias promotoras do crescimento de plantas pode abrir novas perspectivas para o biocontrole e estratégias de bioinoculação. *Trichoderma virens* GL 21, por exemplo, aplicado como uma formulação granular, em combinação com *Burkholderia cepacia* BC-1 ou *B. ambifaria* BC-F aplicada como um tratamento de semente melhorou significativamente a supressão de murchidão do pepino causado por *Rhizoctonia solani* quando comparado a aplicações individuais desses microrganismos (ROBERTS et al., 2005). Assim, para aumentar a eficácia de biocontrole e consistência no desempenho, a utilização de várias estirpes do mesmo microrganismo antagonista, ou uma combinação de diferentes espécies de biocontrole deve ser levada em consideração (ALABOUVETTE; LEMANCEAU, 1998; GUETSKY et al., 2002). Esta combinação pode ser estudada no futuro com nossos isolados de *Burkholderia* e *Bacillus* que apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana.

Embora os ensaios de antagonismo *in vitro* nem sempre proporcionam os mesmos resultados *in vivo* (FREITAS; PIZZINATTO, 1991), este estudo é de fundamental importância uma vez que reduz o número total de bactérias a serem testadas nas condições de campo, tal como sugerido por outros autores (LUCON; MELO, 1999). Além disso, pesquisas com bactérias endofíticas

proporcionam uma nova oportunidade para a descoberta de novas linhagens com potencial biotecnológico para serem utilizadas como inoculante microbiano.

### 3.5 CONCLUSÃO

Dentre as bactérias endofíticas isoladas de plantas de soja, uma estirpe de *Bacillus* sp.(7) e três de *Burkholderia* sp. (8, 9 e 10) demonstraram a atividade antagonista mais relevante e significativa em relação aos agentes patogênicos utilizados neste estudo. Os resultados preliminares de extração e/ou precipitação dos compostos ativos responsáveis pela atividade antagonista dos isolados que pertencem ao gênero *Bacillus* e *Burkholderia* sugerem que eles podem ser de origem peptídica. Este aspecto será investigado por meio de técnicas de cromatografia e análise de espectrometria de massa.

Estes isolados podem ser considerados candidatos potenciais para estudos *in vivo* e, posteriormente, serem utilizados no desenvolvimento de inoculantes visando a proteção das culturas.



## 3.6 REFERÊNCIAS

- ABANDA-NKPWATT, U.; KRIMM, L.; SCHREIBER, W.; SCHWAB, D. Antagonism of aldehydes and epiphytic bacteria from strawberry leaf surfaces against the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* *in vitro*, **BioControl**, 51.279–291, 2006.
- ALABOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P. Joint action of microbials for disease control. In: Hall FR, Menn JJ (eds) Biopesticides: use and delivery. **Humana, Totowa, NJ**, pp 117-135, 1998.
- ARANTES, S. A. C. M.; LOVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L. Efeito da calagem e do glyphosate na atividade microbiana de diferentes classes de solos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, p. 19-28, 2007.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.
- BERG, G.; HALLMANN, J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T.N. **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer, p. 53–67, 2006.
- BERIC, T.; KOJIC, M.; STANKOVIC, S.; TOPISIROVIC, L.; DEGRASSI, G.; MYERS, M.; VENTURI, V.; FIRA, D. Biocontrol of Phytopathogenic Bacteria by *Bacillus* sp. **Food Technol. Biotechnol.** 50(1) 25–31, 2012.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento Safra Brasileira de Grãos**, v. 1 - Safra 2013/14, n. 10 - Décimo Levantamento, Brasília, p. 1-85, jul, 2014.
- DALAL, J.; KULKARNI, N. Antagonistic and Plant Growth Promoting Potentials of Indigenous Endophytic Bacteria of Soybean (*Glycine max* (L) Merrill). **Current Research in Microbiology and Biotechnology** 1(2): 62-69, 2013.
- DAWNSON, R. M. C.; ELLIOTT, D. C.; JONES, K. M. **Data for Biochemical Research**, 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford Univ. Press, London, 1969.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.; BALDAN, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. In: **Embrapa-SPI**, Brasília. 1995.
- FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Circular Técnica 48, Embrapa, Londrina, PR, p. 1-9, 2007.
- FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol, **Annu. Rev. Phytopathol.** 43. 337–359. 2005.
- FREITAS, S.S.; PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v.17, p.105-112, 1991.

- GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology** 92:976–985, 2002.
- HAN, J.I.; CHOI, H.K.; LEE, S.W.; ORWIN, P.M. Complete genome sequence of the metabolically versatile plant growth-promoting endophyte *Variovorax paradoxus* S110. **J.Bacteriol.** 193:1183–1190, 2011.
- HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 52, 384–387, 1989.
- HUNG, P.Q.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). **Omonrice**, v. 12, p. 92-101, 2004.
- HYNES, R.K.; BOVETCHKO, S.M. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **Soil Biol Biochem** 38:845-849, 2006.
- JAMALIZADEH, M.; ETEBARIAN, H.R.; AINIAMI, H.; ALIZADEH, A. Biological control of gray mold on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN74-1). **Phytoparasitology** 36:23–29, 2008.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969-976, 1970.
- KANG, J.G.; SHIN, S.Y.; KIM, M.J.; BAJPAI, V. Isolation and anti-fungal activities of 2-hydroxymethyl-chroman-4-one produced by *Burkholderia* sp. MSSP. **J Antibiot** 57: 726–731, 2004.
- KAVITHA, S.; SENTHILKUMAAR, S.; GNANAMANICKAM, S.S.; INAYATHULLA, M. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. **Process Biochem** 40:3236–3243, 2005.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v. 273, p. 91–99, 2005.
- LIN, D.; XU, Q.; LIU, Y.Z.; WEI, J.M. The antibacterial effect of the secreted peptide from *Bacillus subtilis* SO113 and separation and purification of the antibacterial peptides. **J Agric Biotechnol** 9:77–80, 2001.
- LUCON, C.M.M.; MELO, I.S. Seleção de rizobactérias antagônicas a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, em tubérculos de batata. **Summa Phytopathologica**, v.25, p.132-136, 1999.
- MELNICK, R.L.; SUAREZ, C. BAILEY, B.A.; BACKMAN, P.A. Isolation of endophytic endospore forming bacteria from *Theobroma cacao* potential biological control agents of cacao diseases. **Biol Control** 57:236–245, 2011.

MONTEIRO, L.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 23-29, 2005.

NAGORSKA, K.; BIKOWSKI, M.; OBUCHOWSKJI, M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. **Acta Biochim Pol** 54:495–508, 2007.

PENGNOO, C.; KUSONGWIRIYAWONG, L.; NILRATANA, M. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*, **BioControl**, 45. 245–256, 2000.

Pimenta RS, Silva JFM, Coelho CM, Morais PB, Rosa CA. Integrated control of *Penicillium digitatum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis crataegensis* and sodium bicarbonate on oranges. **Braz J Microbiol** 41:404–410, 2010.

ROBERTS, D.P.; LOHRKE, M.S.; MEYER, S.L.F.; BUYER, J.S. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soil-borne diseases of cucumber. **Crop Prot** 24:141–155, 2005.

TAGHAVI, S.; GARAFOLA, C.; MONCHY, S.; NEWMAN, L; HOFFMAN, A.; WEYENS, N.; BARAC, T.; VANGRONSVELD, J.. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. **Appl Environ Microbiol** 75:748–757, 2009.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Appl Environ Microbiol** 68: 6210–6219, 2002.

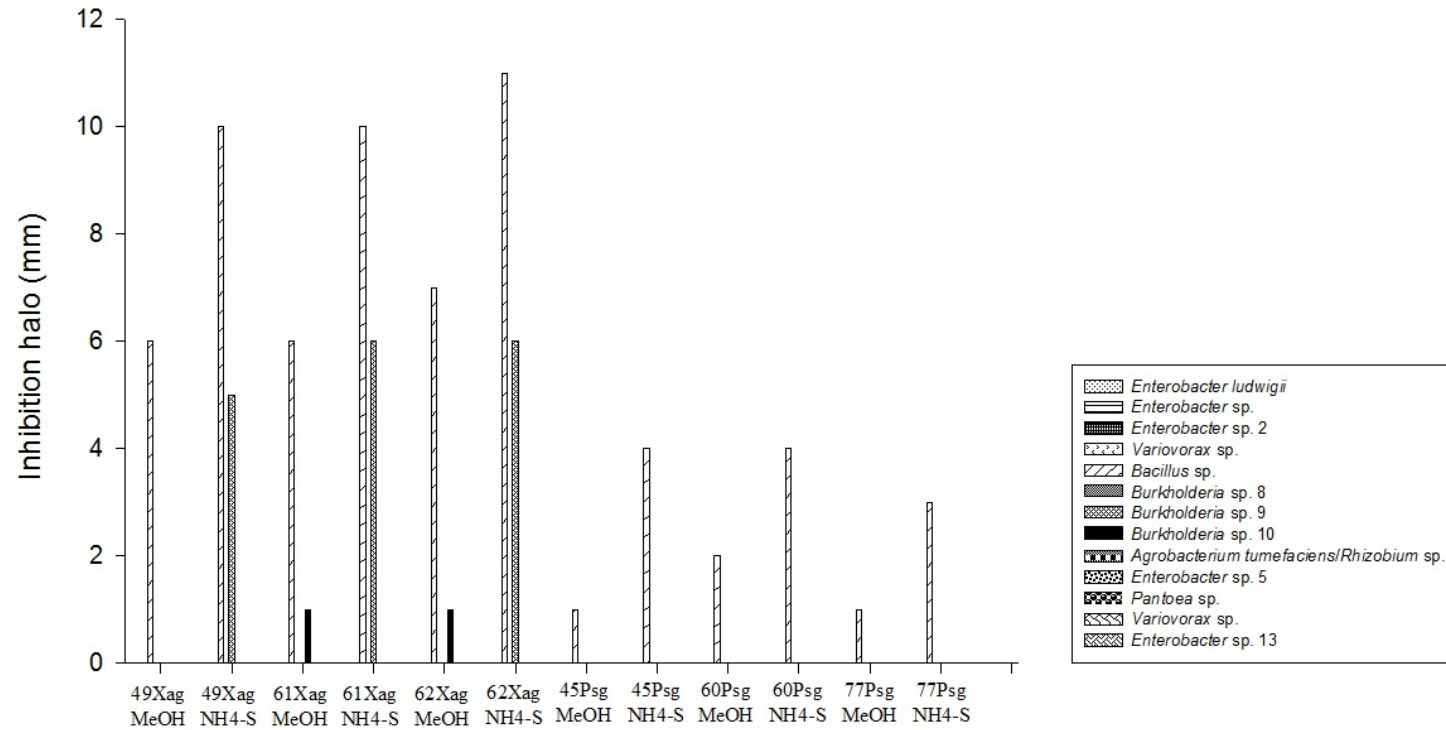
**Tabela 3.1** - Atividade antifúngica *in vitro* de bactérias endofíticas de soja contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phomopsis sojae*.

Isolado	Possível gênero	Cultivar	Tecido	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>P. sojae</i>
1	<i>Enterobacter ludwigii</i> (99%)	C	Raiz	++	-
2	<i>Enterobacter</i> sp. (99%)	C	Raiz	+	-
3	<i>Enterobacter</i> sp. (99%)	C	Raiz	+	-
4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (97%)/ <i>Rhizobium</i> sp. (96%)	GR	Caule	+	-
5	<i>Enterobacter</i> sp. (97%)	GR	Folha	+	-
6	<i>Variovorax</i> sp.	C	Raiz	++	-
7	<i>Bacillus</i> sp. (95%)	C	Caule	+++	-
8	<i>Burkholderia</i> sp. (99%)	C	Raiz	+++	+++
9	<i>Burkholderia</i> sp. (99%)	C	Raiz	+++	-
10	<i>Burkholderia</i> sp. (99%)	C	Raiz	+++	+++
11	<i>Pantoea</i> sp. (93%)	GR	Folha	+	-
12	<i>Variovorax</i> sp. (88%)	GR	Folha	++	-
13	<i>Enterobacter</i> sp. (95%)	GR	Raiz	+	-

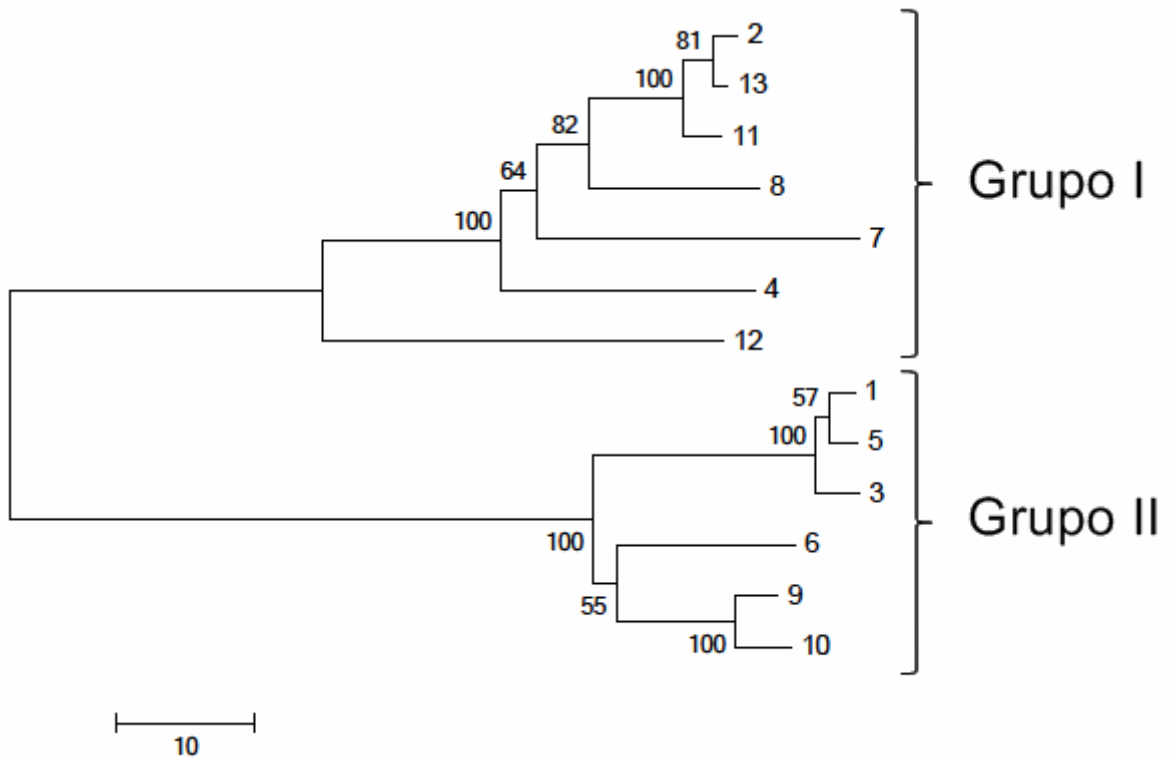
Atividade de antagonismo: Classificação dos isolados de acordo com o tamanho do halo, em que: (-) ausência de halo ou ausência de inibição; (+) halo pequeno (1-2 mm), pouca atividade; (++) halo médio (3-5 mm), atividade mediana; (+++) halo grande (superior a 5 mm), alta atividade. Cultivares: C - soja convencional não transgênica; GR - soja transgênica resistente ao glifosato.



**Figura 3.3** – Atividade antagonista do sobrenadante de bactérias endofíticas extraído com metanol (MeOH) e precipitado com sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>-S) contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 49, 61 e 62 (49Xag, 61Xag e 62Xag) e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 45, 60 e 77 (45Psg, 60Psg e 77Psg).



**Figura 3.4** – Árvore filogenética obtida pelo método do algoritmo *neighbor-joining* construída utilizando as sequências do gene 16S DNAr obtidas de bactérias endofíticas isoladas de diferentes tecidos de soja convencional e transgênica resistente a glifosato. Os valores em cada ramo representam porcentagens de 1.000 réplicas *bootstrap*.

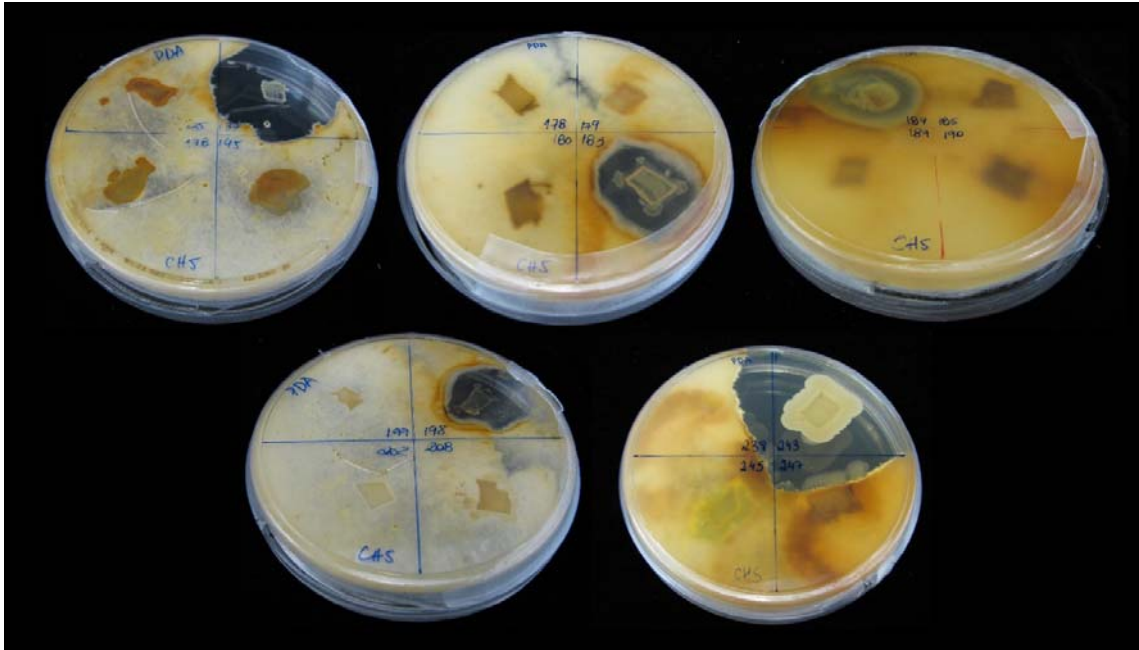


## **APÊNDICES**



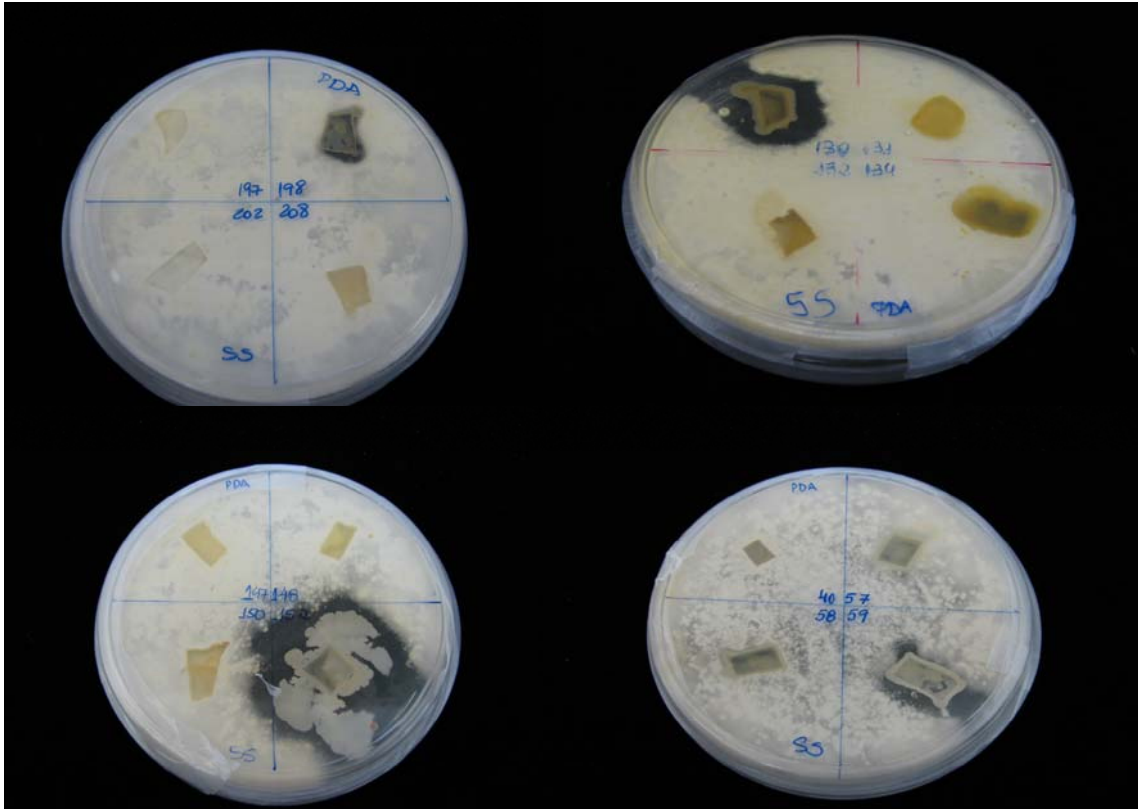
## APÊNDICE A

Teste preliminar de antagonismo das bactérias endofíticas isoladas de soja contra *Phomopsis sojae*.



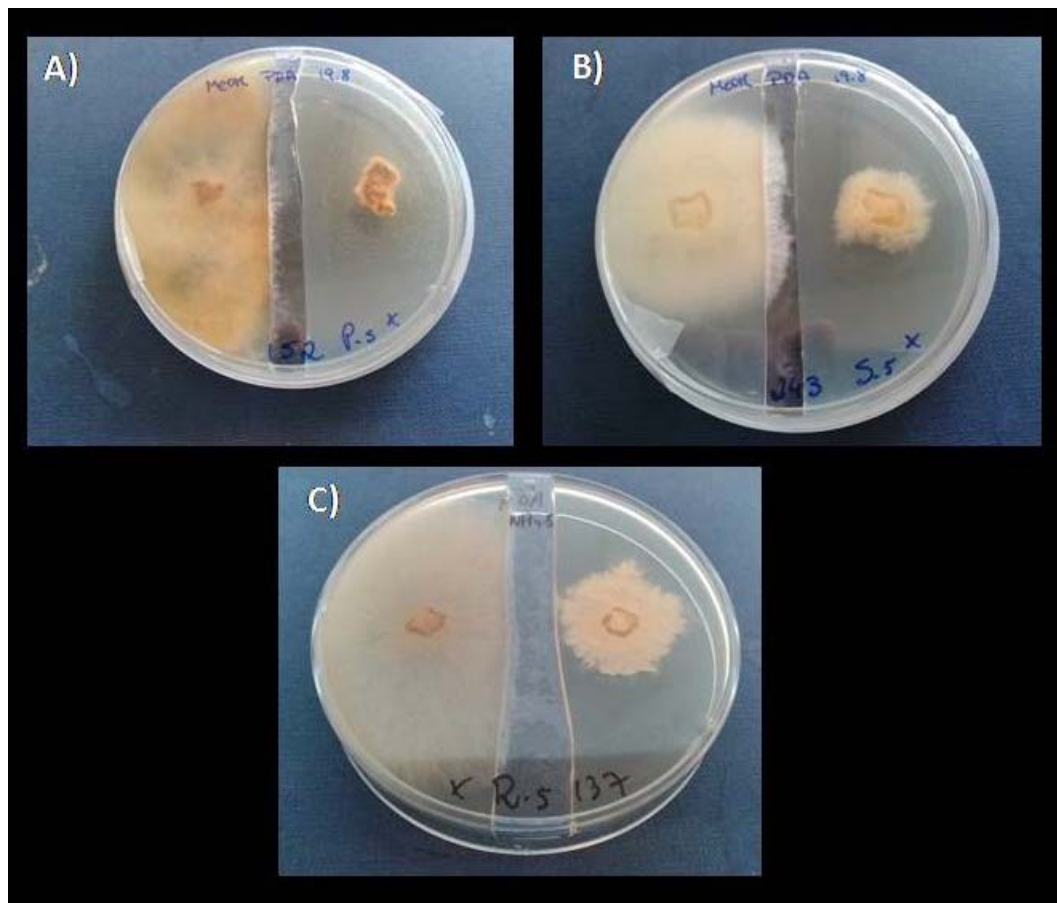
## APÊNDICE B

Teste preliminar de antagonismo das bactérias endofíticas isoladas de soja contra *Sclerotinia sclerotiorum*.



## APÊNDICE C

Teste de antagonismo do sobrenadante das bactérias endofíticas isoladas de soja contra os patógenos fúngicos de soja A) *Phomopsis sojae*, B) *Sclerotinia sclerotiorum* e C) *Rhizoctonia solani*.



## APÊNDICE D

Teste de antagonismo do sobrenadante das bactérias endofíticas isoladas de soja contra os patógenos bacterianos de soja A) *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e B) e C) *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

