

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS AO INHAME (*Dioscorea rotundata*)**

**ANA CLAUDIA OLIVEIRA SOUZA SANTOS**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**JULHO - 2011**

# **BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS AO INHAME (*Dioscorea rotundata*)**

**ANA CLAUDIA OLIVEIRA SOUZA SANTOS**

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, 2009.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Jorge Teodoro de Souza

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**JULHO - 2011**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S237

Santos, Ana Cláudia Oliveira Souza

Bactérias endofíticas associadas ao inhame (*Dioscorea rotundata*) / Ana Cláudia Oliveira Souza Santos.\_ Cruz das Almas - BA, 2011.  
- f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.  
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.

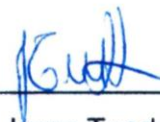
1. Inhame – Controle biológico. 2. Bactérias endofíticas - Inhame  
.I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,  
Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 635.23

Ficha catalográfica elaborada pela seção técnica da biblioteca central da  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**Ana Claudia Oliveira Souza Santos**



---

Dr. Jorge Teodoro de Souza  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
(Orientador)



---

Dra. Élide Barbosa Corrêa  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB



---

Dr. Hermínio Souza Rocha  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dissertação homologada pelo colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia  
Agrícola em \_\_\_\_\_.

Podemos facilmente perdoar  
uma criança que tem medo do escuro;  
a real tragédia da vida é quando os homens têm medo da luz.

Platão

Dedico os meus melhores resultados  
às pessoas que mais amo: minha filha Letícia,  
meu esposo Júnior, minha mãe Claudionora  
e meu irmão Ubiratan. Sem vocês, nada faz sentido...  
Com vocês, tudo é possível... Por vocês, tudo vale a pena...

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por sua presença constante na minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis.

A meus pais Ubirajara e Claudionora, pela vida, amarei sempre vocês. Mãe, muito obrigada pelo apoio incondicional, incentivo e encorajamento sempre.

Ao meu esposo Júnior, pelo amor e paciência nos meus “maus” momentos. Amo você! Graças a sua presença foi mais fácil transpor os dias de desânimo e cansaço!

À minha filha Letícia, minha fonte abundante de alegria.

Ao meu irmão Ubiratan, pela amizade e compreensão. Obrigada por você existir perto de mim!

Aos meus sogros pela ajuda no decorrer dessa caminhada

À toda minha família por ser parte da minha história.

Ao povo brasileiro, que através da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, concedeu a oportunidade de me pós-graduar.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao professor Jorge Teodoro de Souza, pela orientação, ensinamentos, aconselhamentos, amizade e por me ajudar a não desistir.

À Darcilúcia, por toda ajuda desde os primeiros passos, pela disposição e boa vontade em me socorrer nos momentos de mais desespero. Por ser mais que amiga e ter se tornado uma irmã gerada pela pesquisa.

À Lene, Jurema e ao Augusto César por me ensinarem a “caminhar” no laboratório, e por sempre estarem a disposição para solucionar minhas dúvidas nos procedimentos laboratoriais.

À amiga e velha parceira Gleyde Córdova, pela amizade sincera, pela troca de experiências, pelo companheirismo, e pelas madrugadas de estudo.

Às colegas, Elizabeth e Patrícia, pela convivência e ajuda no laboratório.

Ao colega Adailson, por toda a ajuda no laboratório, dicas na escrita e por ser sempre solícito em me ajudar.

Aos nobres colegas de turma, pela alegria da convivência.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação, em especial a professora Márcia Cazetta pelos ensinamentos, contribuições e amizade.

Aos funcionários da Pós-Graduação, em especial a Rejane Cardoso e Amália pelos bons serviços prestados.

Aos amigos funcionários da biblioteca, pelo carinho e atenção.

Aos amigos funcionários do Pavilhão dos Laboratórios de Microbiologia Agrícola, responsáveis pela limpeza, pela guarda e pelos laboratórios, pela amizade e boa convivência.

À Adriana Neves estagiaria desse projeto, pelo companheirismo na realização das atividades.

À Luana Maria, pela ajuda na parte computacional.

Aos amigos e irmãos da Igreja Batista Nova Betel que acreditaram, oraram e torceram pela realização desta obra.



Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

Muito obrigada!!!

# ÍNDICE

Resumo

Abstract

Introdução.....1

Capítulo 1: Microrganismos endofíticos e a cultura do inhame.....3

Resumo.....4

Abstract.....5

1.0 Nomenclatura (*Dioscorea spp.*).....6

1.1 Cultivo e importância sócio-econômica.....9

1.2 Bactérias endofíticas e seu uso na agricultura.....11

1.3 Aplicações de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*.....15

Capítulo 2: Densidade populacional e diversidade genética de *Bacillus*  
endofíticos associados ao inhame (*Dioscorea rotundata*).....18

Resumo.....19

Abstract.....20

Introdução.....21

Material e Métodos .....23

Resultados.....26

Discussão.....31

Considerações finais.....33

Referências.....34

## RESUMO

**Santos, A. C. O. S. Bactérias endofíticas associadas ao inhame (*Dioscorea rotundata*)**

Bactérias endofíticas habitam o interior de tecidos vegetais, sem causar danos aparentes. Desempenham funções importantes na adaptação das plantas a ambientes desfavoráveis e podem ser utilizados em processos biotecnológicos. Esse trabalho apresenta-se como base para futuros estudos com a utilização de bactérias endofíticas na promoção de crescimento e no controle biológico de doenças de plantas de inhame. O inhame é economicamente importante para o Nordeste brasileiro e inovações tecnológicas precisam ser desenvolvidas e aplicadas à cultura para aumentar sua produtividade. Foram realizados estudos para determinar as densidades populacionais e a diversidade genética de bactérias endofíticas em diferentes tecidos de plantas de inhame cultivado no Recôncavo da Bahia. Os estudos demonstraram que maiores densidades de bactérias endofíticas totais e de bactérias do gênero *Bacillus* ocorrem no interior das raízes das plantas, seguidas de caules, folhas e rizóforos. Análises de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foram conduzidas com 88 isolados de *Bacillus* endofíticos selecionados ao acaso de diversas partes das plantas. Esses estudos demonstraram que maior variabilidade genética foi encontrada em *Bacillus* endofíticos de raízes das plantas, seguidas de rizóforos, folhas e caules. Esse é o primeiro estudo sobre as bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* em inhame.

**Palavras-chave:** *Dioscoreaceae*, Densidade populacional, Diversidade genética.

## ABSTRACT

**Santos, A. C. O. S. Endophytic *Bacillus* associated with yam (*Dioscorea rotundata*)**

Endophytic bacteria inhabit the interior of plant tissues without causing apparent damage. These bacteria play important roles in the process of adaptation of plants to unfavorable environmental conditions and may be used in biotechnological processes. This study was conducted as a first step in exploiting endophytic bacteria in the biological control of diseases and promotion of growth in yam plants. This crop is economically important to the Brazilian Northeast and technological innovations need to be developed and applied in order to increase its productivity. Studies to determine the population densities and genetic diversity of endophytic bacteria in yam cultivated in the Recôncavo region of Bahia State were conducted. These studies demonstrated that higher densities of total endophytic bacteria and bacteria of the genus *Bacillus* occur in the interior of roots, followed by stems, leaves, and tubers. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis were performed with 88 randomly selected *Bacillus* isolates from different plant parts. These studies demonstrated that higher genetic diversity was found in endophytic *Bacillus* recovered from roots, followed by tubers, leaves and stems. This is the first report on endophytic *Bacillus* from yam.

**Key-words:** *Dioscoreaceae*, genetic diversity, population densities.

## INTRODUÇÃO

Inhame é o nome comum dado a várias espécies de plantas do gênero *Dioscorea*, família *Dioscoreaceae* e aos seus rizóforos amiláceos. São herbáceas trepadeiras cultivadas para o consumo dos rizóforos na África, América Latina, Ásia e Oceania. A produção mundial desse rizóforo em 2007 foi de 52 milhões de toneladas, dos quais a África produziu 96 %, sendo que a maioria dessa produção vem da África Ocidental que representa 94 %, com a Nigéria produzindo 71 %, equivalente a mais de 37 milhões de toneladas. O Brasil produz cerca de 230.000 ton de inhame anualmente com área plantada de 25.000 ha, ficando em segundo lugar em volume produzido na América do Sul, ultrapassado apenas pela Colômbia com 255.000 ton/ano. Da produção brasileira de inhame, são exportadas 4.000 ton/ano, enquanto outros países sul-americanos destinam sua produção inteiramente ao mercado interno (FAO, 2007).

A exploração do inhame não é contemplada nas políticas agrícolas, apresentando carência de apoio técnico e de crédito, normalmente destinados às monoculturas de produtos exportáveis (PEIXOTO NETO et al., 2000; RITZINGER et al., 2003). Embora esta cultura se destaque pelo seu alto valor comercial, com forte potencial no agronegócio de exportação para Europa, especialmente, França e Inglaterra e para os Estados Unidos (RITZINGER et al., 2003; SANTOS & MACÊDO, 2006).

A maior dificuldade para comercialização do inhame no exterior, basicamente está no material de baixa qualidade sanitária e colheita precoce, resultando em produto inaceitável para tal demanda (PEIXOTO NETO et al., 2000; MENDES, 2005). O aumento de pragas e doenças, assim como a baixa fertilidade dos solos tem causado declínio em algumas áreas tradicionais de produção acarretando prejuízos ao agricultor. Dessa maneira torna-se necessário a busca de alternativas de solução para tais problemas. Dentre essas alternativas está o uso de bactérias endofíticas no controle de pragas e doenças, que vem alcançando melhores resultados na produtividade de diversas culturas.

Bactérias endofíticas são aquelas que habitam o interior de um vegetal, sem causar danos ao hospedeiro (AZEVEDO et al., 2000; ARAÚJO, 2001). Em

1926 Perotti formulou a teoria de que bactérias não patogênicas residem em tecidos de plantas. Historicamente, pensava-se tratar de bactérias patogênicas, no entanto descobriu-se que esses microrganismos apresentavam efeitos benéficos sobre sua planta hospedeira (DAVISON, 1988; HOFLICH et al., 1994; HALLMANN et al., 1997; LODEWYCKX et al., 2002), ou não apresentavam nenhum efeito observável (KADO, 1992).

Entre os microrganismos endofíticos e as plantas hospedeiras ocorrem interações específicas, que se refletem principalmente em nível fisiológico. Com relação às bactérias, estas interações dependem da atividade de muitos genes, tanto da bactéria quanto da planta (QUISPEL, 1988). Apesar da ocorrência de bactérias endofíticas nas mais diversas culturas, pouco se sabe sobre sua identidade, diversidade e níveis populacionais nos diferentes tecidos. Assim sendo, estudos com microrganismos endofíticos são de grande importância devido à falta de informações para a elucidação da base biológica das interações endófitos-planta, e também por serem potencialmente vantajosos em diversos aspectos, como: controle biológico de pragas; controle de doenças; produção de metabólitos de interesse farmacológico; promoção do crescimento vegetal; vetores para a introdução de genes em plantas hospedeiras e fixação biológica de nitrogênio (SCHULZ, 2005; SELOSSE et al., 2004; STURZ et al., 2000, WELBAUM et al., 2004, MEGURO et al., 2004; SILVA et al., 2009).

Este trabalho está dividido em dois capítulos, onde o primeiro aborda aspectos da cultura do inhame, sua importância socioeconômica, além da importância do uso de microrganismos endofíticos na agricultura, principalmente as bactérias do gênero *Bacillus*. No segundo, são apresentados os resultados de um estudo sobre as densidades populacionais e diversidade genética de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* em diferentes tecidos de plantas de inhame.

---

**CAPÍTULO 1**  
**MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS E A CULTURA DO INHAME**

---

## RESUMO

### **Santos, A. C. O. S. Microrganismos endofíticos e a cultura do inhame**

O inhame é uma planta do gênero *Dioscorea*, composto de aproximadamente 600 espécies, cuja ocorrência se dá principalmente na África. Na América do Sul, são cultivadas as espécies *Dioscorea rotundata* e *Dioscorea cayennensis*. O inhame apresenta importância sócio-econômica para a região Nordeste do Brasil, devido ao seu consumo interno e potencial de exportação. Problemas fitossanitários tem prejudicado a sua produtividade, necessitando de alternativas para solucioná-los. Uma alternativa que vem trazendo bons resultados a tais problemas é o uso de bactérias endofíticas que habitam o interior de tecidos de plantas sem causar danos aparentes. Podem promover o crescimento vegetal, conferir tolerância a estresses abióticos e induzir resistência a pragas e doenças. Ocupam o mesmo ambiente de muitos fitopatógenos, favorecendo seu uso como agentes no controle biológico de patógenos. O gênero *Bacillus* está entre os mais comumente isolados. Neste trabalho foi realizada uma revisão sobre o inhame, bactérias endofíticas e o uso do gênero *Bacillus* na agricultura.

**Palavras-Chave:** *Dioscorea*, Bactérias endofíticas, *Bacillus* spp.



## ABSTRACT

### **Santos, A. C. O. S. Endophytic microorganisms and the yam crop**

Yam is a plant of the genus *Dioscorea* and has approximately 600 species that occur mainly in Africa. The species *Dioscorea rotundata* and *Dioscorea cayennensis* are cultivated in South America. Yam presents great socio-economic importance for the Northeast region of Brazil due to its potential for exportation and domestic consumption. Phytosanitary problems contribute to diminish yam productivity and alternative control measures should be employed. One of the alternatives that have been showing promising results is the use of endophytic bacteria. These bacteria inhabit the interior of plants and do not cause any apparent damage to the host. Endophytic bacteria promote plant growth and provide tolerance to abiotic stresses and resistance to pests and diseases. Because they occupy the same niche of plant pathogens, their use in biological control is advantageous. *Bacillus* is among the genera most commonly isolated. In this chapter a review of yam cultivation, endophytic bacteria and the use of the genus *Bacillus* in agriculture is done.

**Key-words:** *Dioscorea*, Endophytic bacteria, *Bacillus* spp.

## 1.0 Nomenclatura

Nos estados da Paraíba e Pernambuco chama-se inhame as espécies de *Dioscorea* que produzem rizóforos grandes (*Dioscorea rotundata*, *Dioscorea alata*) e "cará" as espécies de *Dioscorea* que produzem rizóforos pequenos. Em algumas regiões do país também chamam erroneamente de inhame o rizoma das Aráceas, conhecido como "Taro". Segundo Cereda (2002), no Sul do Brasil, a denominação para *Dioscorea* como inhame era aplicada principalmente ao gênero *Colocasia*, gerando confusão entre os técnicos, produtores e até mesmo os consumidores. Por conta disso informações técnicas, como as estatísticas de produção e custo também foram invertidas.

Assim, os nomes populares variam de acordo com o local onde é cultivado, sendo imprescindível conhecer o nome científico de cada espécie, conforme previsto no "Código Internacional de Nomenclatura Botânica" (GREUTER et al., 1994; Princípio Vº e Art. 23), e então procurar correlacioná-lo ao nome popular.

Botanicamente a espécie *Colocasia esculenta* não apresenta nenhuma semelhança com as espécies do gênero *Dioscorea*. Portanto, infere-se que a espécie *Colocasia esculenta* não é inhame nem cará, podendo receber a denominação de taro, por serem duas espécies completamente diferentes.

### **Inhame** (*Dioscorea* sp.) e **taro** (*Colocasia esculenta*)

O inhame é uma planta monocotiledônea, da família *Dioscoreaceae*, herbácea, trepadeira, pertencente ao gênero *Dioscorea*, que compreende cerca de 600 espécies (PURSEGLOVE, 1975; PEDRALLE, 2002), sendo as mais importantes por seus rizóforos comestíveis: *Dioscorea cayennensis*, *Dioscorea rotundata*, *Dioscorea alata*, *Dioscorea trifida* e *Dioscorea esculenta*. A espécie *Dioscorea cayennensis* é a mais importante na Região Nordeste. De acordo com Santos (1996), a planta apresenta raiz tuberosa, alongada, de cor castanho-clara; caule volúvel, cilíndrico, tênue, com cerca de 3 mm de diâmetro, glabro, esparsamente aculeado; folhas opostas e raramente alternadas, lâmina ovalada a sub-oblonga, com sete a nove nervuras principais, base mais ou menos

cordiforme com cerca de 7 cm de comprimento e 4,5 cm de largura; flores dióicas, dispostas em espigas masculinas solitárias, simples ou compostas. Apresenta rizóforos cilíndricos e de tamanho variável, geralmente de 1 a 10 kg (Figura 1).

O taro pertence à família *Araceae*, cujos representantes são caracterizados pelo tipo de inflorescência em espádice, com as flores masculinas no ápice e as femininas na base. As folhas são formadas por grandes limbos aveludados, de formato cordiforme, com nervuras bem visíveis e salientes na face abaxial, pecíolo longo e carnudo. O caule é modificado em rizoma feculento, constituindo a parte comestível da planta e as raízes são abundantes e do tipo fasciculadas (SANTOS E PUIATTI, 2002), (Figura 1).

Para contornar o problema da nomenclatura, durante o primeiro Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Cará em 2001, foram propostas e aprovadas, em Assembléia Geral, as denominações de Inhame para *Dioscorea* e Taro para *Colocasia esculenta*, uniformizando os termos brasileiros com a denominação internacional (PEDRALLI, 2002; CEREDA, 2002).



Foto: Carlos Alberto Simões do Carmo

**Figura 1:** **A** - Rizomas de taro (*Colocasia esculenta*); **B** - Rizofóro de inhame (*Dioscorea sp.*); **C** - Planta de taro (*Colocasia esculenta*); **D** - Planta de inhame (*Dioscorea sp.*)

## 1.1 Cultivo e importância sócio-econômica do inhame

Os inhames (*Dioscorea* spp.) são cultivados em regiões quentes dos hemisférios e aproximadamente 95 % da produção mundial ocorre na África Ocidental e Central. As demais regiões produtoras situam-se nas Índias Ocidentais, Ásia, América do Sul e América Central.

Das 600 espécies de inhame conhecidas, apenas seis são utilizadas como alimento, e *Dioscorea rotundata* e *Dioscorea cayennensis* representam as espécies mais cultivadas (CAZÉ FILHO, 2002).

Em 2004, a produção global de inhame foi de quase 47 milhões de toneladas, 96 % da produção na África. O inhame é a segunda cultura mais importante na África com a produção atingindo pouco menos de um terço do nível da mandioca (IITA, 2006). A Nigéria, sozinha, assume 70 % do que se produz mundialmente, acima de 26 milhões ton/ano, com uma produtividade média de 19.553 kg/ha. Entretanto, países como o Japão, que dispõem de maior nível tecnológico, chegam a alcançar uma produtividade superior a 22.000 kg/ha (FAO, 2007).

No cenário Sul Americano, o Brasil destaca-se como principal produtor e a produção brasileira concentra-se na região Nordeste. As regiões Norte, Sul, Centro-Sul, Oeste e Sudeste cultivam diversas espécies do gênero *Dioscorea* com finalidades farmacológicas, não sendo usados na alimentação humana (MOURA 1997). O inhame é uma cultura que vem se destacando como uma alternativa promissora para os pequenos e médios produtores, devido ao seu grande potencial de exportação e consumo interno (GARRIDO, 2003b). Apresenta grande importância sócio-econômica para a região Nordeste do Brasil, sobretudo para os estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão por constituir uma atividade agrícola muito promissora dada à excelente qualidade nutritiva e com alto valor energético (CIACCO & D'APPOLONIA, 1978; SANTOS, 2002).

O ciclo de vida do inhame consiste das seguintes fases: propágulo (sementes ou rizóforos), mudas emergentes ou plântulas, planta madura, planta senescente e rizóforos dormentes. Dependendo do tipo de material, genótipo, espécie e local de plantação, a duração do crescimento de inhame varia de 6 a 12 meses, calculados desde o tempo de dormência dos rizóforos, até o momento da

senescência das folhas (ORKWOR & EKANAYAKE 1998). A colheita pode ser realizada aos sete meses, quando é feita a "capação", ou aos nove meses, quando a planta completa seu ciclo de vida. A primeira colheita é realizada com o objetivo de se obter rizóforos para comercialização no período de entressafra e a segunda para proporcionar a produção futura de rizóforos-sementes, uma vez que as plantas, por permanecerem no campo por mais dois meses, completam seu ciclo e, conseqüentemente, produzem rizóforos-sementes (SANTOS, 1996).

O estágio de maturação é um dos fatores que influenciam decisivamente as características dos produtos hortícolas (ARTHEY, 1975). No inhame, a máxima massa seca dos rizomas é alcançada no período próximo à maturação fisiológica (MARTIN, 1976), tal como Brillouet *et al.* (1981) verificaram nas espécies *Dioscorea dumetorum* e *Dioscorea rotundata*. Por outro lado, o teor máximo de proteínas dos rizóforos de *Dioscorea cayennensis*, *Dioscorea dumetorum* e *Dioscorea rotundata* ocorre mesmo antes de sua maturação fisiológica (TRECHE & GUION, 1980). Na espécie *Dioscorea rotundata*, o maior acúmulo de amido ocorre aos seis meses após o plantio, havendo redução no oitavo mês. Essa redução é atribuída, parcialmente à diminuição da atividade fotossintética causada pelo amarelecimento e subsequente abscisão das folhas (KETIKU & OYENUGA, 1973).

Segundo Santos (2002), no estado da Bahia o cultivo ocorre na microrregião do Recôncavo, nos Municípios de Cruz das Almas, São Felipe, Maragogipe e São Felix. Contudo, os reduzidos investimentos em ciência e tecnologia têm ameaçado a posição de principal produtor do Brasil no cenário Sul Americano.

As deficiências nutricionais e aumento da incidência e severidade de doenças e pragas tem causado um decréscimo da produtividade do inhame (GARRIDO, 2003b). Mundialmente, as viroses, antracnose, nematoses e podridões de rizóforos são as doenças responsáveis pelas maiores perdas no campo e armazenamento, em cultivares suscetíveis (MOURA, 2002). A antracnose destaca-se como principal problema fitossanitário no cultivo de *D. alata* em diversas áreas de produção. Os nematóides, que interagem com fungos e bactérias, atacam os rizóforos no campo e continuam causando danos em pós-colheita. No Nordeste brasileiro, as principais doenças são as nematoses (*Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. e *Scutellonema bradys*), podridões em

rizóforos (*Penicillium sclerotigenum* e *Rhizopus oryzae*) e queima das folhas (*Curvularia eragrostidis*). Estas doenças causam reduções na produtividade, perdas em pós-colheita e desvalorização dos rizóforos para o comércio interno e externo (IITA, 2006; MOURA, 1997). Além da ocorrência de pragas e doenças outros fatores podem ser citados como responsáveis pela baixa produtividade: (i) o uso de rizóforos-sementes de qualidade agrônômica inferior (contaminação por nematóides, desuniformidade no tamanho e na maturação), (ii) manejo inadequado da cultura, (iii) baixa fertilidade do solo, (iv) o manejo inadequado do solo e da água (SANTOS, 1996).

O controle de doenças torna-se mais efetivo, econômico e ecológico, quando se utilizam diversas técnicas de forma integrada. Estudos comprovam que bactérias endofíticas podem aumentar a tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos, além de aumentarem o crescimento e desenvolvimento da planta (LAZAROVITS & NOWAK, 1997; TEIXEIRA et al., 2007).

## **1.2 Bactérias endofíticas e seu uso na agricultura**

Endofíticos, ou endófitos, são palavras derivadas do grego *endon*-dentro e *phyton*-planta, que têm causado controvérsia desde a sua criação no século XVIII (BALDANI et al., 2002; SAIKKONEN et al., 1988). Contudo, nos últimos 20 anos, este termo vem sendo bem aceito pela literatura (WILSON, 1995; SAIKKONEN et al., 1988). Assim, endófitos são todos os microrganismos capazes de colonizar, em alguma fase do seu ciclo de vida, tecidos vegetais, sem causarem danos à planta hospedeira (PETRINI, 1991) ou de forma mais prática, microrganismos isolados de tecidos vegetais desinfestados superficialmente ou isolados de partes internas das plantas (HALLMANN et al., 1997), e que não causam danos ao seu hospedeiro. Mais recentemente foram definidos como sendo todo microrganismo capaz de colonizar internamente os tecidos da planta hospedeira, sem causar danos aparentes (AZEVEDO et al., 2000).

As interações endofíticos-plantas ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras e antagônicas. Nas interações simbióticas, os microrganismos produzem ou induzem a produção de

metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens às plantas tais como: a diminuição da herbivoria, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (PEREIRA 1993; ARAÚJO, 1996; RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996). Em alguns casos, eles também podem acelerar o desenvolvimento da muda e promover o estabelecimento da planta sobre diversas condições (CHANWAY, 1997; BENT & CHANWAY 1998). Com o acúmulo de informações a respeito da interação planta/endófitos e os resultados promissores observados, tem sido verificada uma atenção especial ao estudo de bactérias endofíticas como promotoras de crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; BENT & CHANWAY, 1998) e como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997; M'PIGA et al., 1997). Assim sendo, ultimamente, tem-se investido muito em pesquisas, para disponibilizar fontes alternativas de nutrientes às plantas, e em metodologias alternativas de controle de patógenos, com enfoque no uso de microrganismos endofíticos (KUSS et al., 2007; BARROSO & NAHAS, 2008; RYAN et al., 2008; LUCON et al., 2009). Da mesma forma que fitopatógenos, as bactérias endofíticas apresentam a capacidade de penetrar na planta e se disseminar de forma sistêmica no hospedeiro, habitando de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e, ocasionalmente, pode haver colonização intracelular (KLOEPPER, 1996; HALLMANN et al., 1997; MAHAFFEE et al., 1997).

Bactérias endofíticas ocupam nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, favorecendo-as como agentes de controle biológico de doenças (FAHEY et al., 1991; HALLMANN et al., 1997; KUNOH, 2002; COOMBS et al., 2004). Assumpção 2009, em estudos com bactérias endofíticas em sementes de soja verificou eficiência no controle no crescimento de fungos fitopatogênicos. Este controle pode ocorrer principalmente devido à atuação direta sobre o patógeno no interior da planta hospedeira (PAN et al., 1997), por produção de compostos antimicrobianos (PLEBAN et al., 1995; MARCON, 2002; KUNOH, 2002; TAECHOWISAN et al., 2003), indução de resistência sistêmica (KRISHNAMURTHY & GNANAMANICKAM, 1997; LODEWYCKX et al., 2002), competição por nutrientes (MARI et al., 1996) ou produção de enzimas (quitinases ou celulasas) que degradam a parede celular de fungos patogênicos (PLEBAN et al., 1997; DOWNING & THOMSON, 2000; EL-TARABILY, 2003).



A origem, forma de penetração, colonização e transmissão de bactérias endofíticas são muito discutidas. Elas podem ser provenientes de sementes, da rizosfera, do filoplano e de material propagado vegetativamente (MCINROY & KLOEPPER, 1995a; HALLMANN et al., 1997; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998). A sua penetração pode ocorrer pelos estômatos, ferimentos, áreas de emergência laterais das raízes e podem produzir enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos vegetais, sendo este um possível mecanismo de penetração (QUADT-HALLMANN et al., 1997; SHISHIDO et al., 1999; MCCULLY, 2001). Após a sua entrada, podem se estabelecer em tecidos específicos ou colonizar sistemicamente a planta hospedeira (HUREK et al., 1994; QUADT-HALLMANN et al., 1997).

Bactérias endofíticas têm sido isoladas de raiz, nódulos, caule, folhas e frutos em uma extensa variedade de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como, cana de açúcar (CAVALCANTE & DOBEREINER, 1998), milho (FISHER et al., 1994; MCINROY & KLOEPPER, 1995b; ARAÚJO et al., 2000), videira (BELL et al., 1995), algodão (QUADT-HALLMANN et al., 1997), arroz (STOLZFUS et al., 1997), batata (REITER et al., 2002), entre outras.

O fato dessas bactérias serem capazes de colonizar os tecidos internos das plantas confere vantagens sobre outros microrganismos por poderem sobreviver em um ambiente mais uniforme onde são menos afetadas pela temperatura, potencial osmótico e radiação ultravioleta (LODEWYCKX et al., 2002). Segundo Misaghi e Donndelinger (1990), as bactérias endofíticas possuem uma íntima relação com seus hospedeiros por meio de processos coevolutivos e podem ter influência na fisiologia das plantas por mecanismos ainda não completamente esclarecidos. Além disso, sua habilidade de sobreviver dentro de tecidos vegetais com pouca ou nenhuma competição microbiana, faz delas candidatas potenciais a aplicações biotecnológicas.

Além de serem benéficas no controle de pragas e doenças (CHEN et al., 1995), vários são os exemplos da aplicação de bactérias endofíticas na produção agrícola como: aumento na produção por meio da produção de fitormônios; promoção do desenvolvimento e da proliferação das raízes (MEHNAZ et al., 2001); fixação do nitrogênio (SILVA et al., 2009); maior resistência das plantas a condições de estresse (BENSALIM et al., 1998) e na biorremediação de áreas poluídas (NEWMAN & REYNOLDS, 2005).

Ambientalmente, o uso de bactérias endofíticas específicas é preferível ao uso de pesticidas, não somente devido ao menor custo, mas por contribuir com um sistema agrícola sustentável. ZINNIEL et al. (2002) sugeriram que as bactérias endofíticas poderão ser utilizadas futuramente como produtoras de enzimas degradativas, para controlarem certas doenças de plantas ou decompor produtos úteis. No início dos anos 80, Webber (1981) foi um dos primeiros pesquisadores a relatar a importância dessas bactérias na proteção de plantas contra doenças. Posteriormente, outros benefícios foram descobertos. Pillay e Nowak (1997) e Sturtz (2000), afirmam que os efeitos na promoção de crescimento de batata, incluem aumentos na altura, na biomassa da parte aérea, do caule e da raiz e na formação de pêlos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema e na produção de tubérculos. Taghavi et al. (2009) encontraram efeitos benéficos aumentando a produção de biomassa em árvores de álamo (*Populus spp.*) utilizando bactérias endofíticas. Sugeriu-se a utilização de bactérias endofíticas para aumentar ativamente a fitorremediação de contaminantes orgânicos por degradarem compostos poluentes que são translocados através da planta (LODEWYCKX et al., 2002).

Atualmente, diversas espécies de plantas tem sua microbiota endofítica estudada e os gêneros mais comumente isolados incluem: *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* e *Enterobacter* (HALLMANN et al., 1997). Estudos têm mostrado que pelo menos 15 gêneros de bactérias são capazes de controlar doenças fúngicas ou bacterianas; destes, *Bacillus* e *Pseudomonas* têm mostrado maior potencial para o controle efetivo de doenças (REDMAN et al., 1999; POCASANGRE et al., 2000; TUNALI et al., 2000).

Bactérias do gênero *Bacillus* foram isoladas de raiz, caule e folha de mandioca (TEIXEIRA, 2004), de plantas de citrus cultivadas no estado de São Paulo e Minas Gerais (ARAÚJO et al., 2002), de raízes de beterraba açucareira (JACOBS et al., 1985), de raízes, caule e flores de plantas de algodão (MISAGHI & DONDELINGER, 1990; MONNERAT et al., 2003), hastes de milho (McINROY E KLOPPER, 1995a), de raiz e caule de café (NUNES, 2004), entre outros. Assim sendo, os estudos aqui realizados enfocam no gênero *Bacillus spp.*, o qual tem apresentado várias aplicações em diversas culturas, porém, nada referente ao inhame.

### 1.3 Aplicações de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*

Bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas e podem ser aeróbias, facultativas ou anaeróbias. São resistentes ao calor, ao frio, bem como a condições extremas de pH, a pesticidas, fertilizantes, podendo ser estocadas por longos períodos (KLOEPPER et al., 1997). Essas bactérias podem oxidar uma ampla faixa de compostos orgânicos e em alguns casos são fermentativas. A maioria delas tem exigências nutricionais simples, requerendo no máximo alguns aminoácidos ou vitaminas B como fatores de crescimento. *Bacillus* formam endósporos – característica que as coloca entre os esporulados – e apresentam a habilidade de produzir antibióticos (FREITAS & PIZZINATTO, 1997). A formação de endósporos aumenta a resistência aos fatores adversos. Dessa forma, podem ser armazenados, como inoculantes, por um período mais longo.

Há mais de 191 espécies e 4 subespécies descritas no gênero *Bacillus*, das quais muitas possuem características semelhantes a *Bacillus anthracis*. Entretanto, a grande maioria são saprófitos e não patogênicos para os animais (MELO, 1998). Esse gênero tem sido encontrado como colonizador de xilema e outros órgãos das plantas e compreende um grupo heterogêneo de bactérias quimiorganotróficas (AZEVEDO, 1988).

No âmbito da agricultura existem diversos produtos comerciais tendo, como ingrediente ativo, espécies do gênero *Bacillus*, como exemplo, *Bacillus thuringiensis* (DIPEL, Abbot Co. USA), *Bacillus sphaericus* (BIOBAC, ICI, Alemanha) e *Bacillus subtilis* (KODIAK, Gustafson Inc., USA). Estes produtos têm sido utilizados com fins de controle biológico, em vários países do mundo. Vários trabalhos têm destacado o *Bacillus subtilis* como eficiente antagonista, principalmente de fungos fitopatogênicos no solo e no filoplano (MCKEEN et al., 1986; BETTIOL & KIMATI, 1990; ARAÚJO et al., 2005; DOMENECH et al., 2004).

*Bacillus thuringiensis* tem sido a espécie de maior importância no controle de pragas agrícolas. É uma bactéria que caracteriza-se pela produção de corpos paraesporais, denominados cristais (BROBOWSKY et al., 2003) que são formados por diferentes polipeptídios, conhecidos como proteínas Cry, com atividade inseticida a diversas ordens de insetos, além de nematóides, protozoários e ácaros (GILL et al., 2003; CAPALBO et al., 2005). As espécies de *Bacillus* citadas podem ser utilizadas no controle natural de pragas das lavouras,

uma vez que são entomopatógenos com propriedades inseticidas, tornando-se um método alternativo ao uso de inseticidas químicos.

No Brasil, os meios de cultura de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (Bt) e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) mostraram-se muito tóxicos aos diferentes estádios do nematóide-do-cisto (*Heterodera glycines Ichinohe*, 1952), um dos patógenos mais prejudiciais a soja (SHARMA & NOWAK, 1998). Segundo Sharma (1998), Bt e Bti controlaram significativamente *M. incognita* em cevada, em condições de casa de vegetação. Oka et al., (1993) relatou atividade nematicida do *B. cereus* sobre ovos e juvenis, e a exposição de *M. javanica* a essa bactéria no solo inibiu a penetração do nematóide nas raízes de tomateiro. Segundo Zuckerman & DICKLOW (1993), o isolado CR-371 de *B. thuringiensis*, apresentou controle sobre nematóides fitoparasitas. Tomateiro e pimentão tratados com CR-371 apresentaram redução no número de galhas nas raízes por *M. incognita* em relação a plantas não tratadas. Em casa-de-vegetação, os mesmos autores observaram que plantas de morango tratados com CR-371 apresentavam pequenas populações de *Pratylenchus penetrans*.

Na Índia, Siddiqui e Mahmood (1993) relataram que *B. subtilis* reduziu o número de galhas nas raízes e a multiplicação do nematóide *M. incognita* raça 3 em grão-de-bico, resultando num aumento no crescimento das plantas. Na Nigéria, *B. Subtilis* também apresentou forte efeito inibitório a fungos causadores da deteriorização pós-colheita em inhame (OKIGBO, 2004). Na tabela 1 encontram-se algumas espécies de *Bacillus* endofíticos com potencial para controlar agentes fitopatogênicos.

**Tabela 01.** Bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* isoladas de tecidos vegetais saudáveis, com potencial para o controle biológico de doenças fúngicas e bacterianas\*

<b>Endofítico</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Acer sp.</i>
<i>Bacillus alcalophilus</i>	<i>Erwinia carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Botrytis cinerea</i> e <i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Batata e pêra
<i>B. cereus</i>	<i>R. solani</i> ; <i>Sclerotium rolfsii</i>	Algodão e feijão
<i>B. pumilus</i>	<i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Colletotrichum orbiculare</i> ; <i>Erwinia tracheiphila</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lacrymans</i> ; <i>R. solani</i> ; <i>Sclerotinia rolfsii</i>	Pepino, pêra, tomate, algodão, feijão
<i>B. subtilis</i>	<i>Colletotrichum orbiculare</i> ; <i>Cryphonectria parasitica</i> ; <i>E. tracheiphila</i> ; <i>Phoma tracheiphila</i> <i>P. syringae</i> pv. <i>lacrymans</i> ; <i>Pythium ultimum</i> ; <i>R. solani</i> ; <i>S. rolfsii</i>	Algodão, feijão, pepino, castanha, poncã

Fonte: Araújo (2000).

Além de todas as aplicações já citadas, bactérias do gênero *Bacillus* são também estudadas como produtoras de potentes antibióticos, como *Bacillus colistinus*, produtor da colistina; *Bacillus brevis*, produtor da tirotricina; *Bacillus licheniformis*, produtor da gramicidinas; *Bacillus polymyxa*, produtor da apolimixina, e outros (PILEGGI, 2006).

Nesse trabalho buscou-se revisar a importância de se estudar microrganismos endofíticos de plantas. Baseou-se na utilização de bactérias endofíticas e suas diversas aplicações na agricultura, buscando enfatizar o uso do gênero *Bacillus spp.*, o qual tem sido isolado de várias culturas como milho, arroz, mandioca, feijão, dentre outras. São muitas as suas aplicações buscando melhorias de produção, mas até o momento, não existe na literatura científica relatos abordando *Bacillus* endofíticos em inhame.

---

## **CAPÍTULO 2**

**DENSIDADE POPULACIONAL E DIVERSIDADE DE *Bacillus* spp.  
ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO INHAME (*Dioscorea rotundata*)**

---

## RESUMO

**Santos, A. C. O. S. Densidade populacional e diversidade genética de *Bacillus* spp. endofíticos associados ao inhame (*Dioscorea rotundata*)**

O agronegócio internacional do inhame tem apresentado um aumento expressivo, contribuindo para a expansão de áreas cultivadas. Apesar disso, a severidade de pragas e doenças e o baixo nível tecnológico empregado contribuem para a baixa produtividade dessa lavoura. Esses aspectos tornam necessárias buscas por alternativas tecnológicas para o aumento da produção. Uma dessas alternativas é o uso de bactérias endofíticas para a promoção de crescimento e controle de pragas e doenças. Esse trabalho teve como objetivo estudar a densidade populacional e a diversidade genética de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* em diferentes tecidos das plantas de inhame. As densidades populacionais de bactérias totais e *Bacillus* spp. foram determinadas por meio de diluições seriadas e plaqueamento em meio TSA e em meio semi-seletivo para *Bacillus*, respectivamente. As densidades populacionais de bactérias totais variaram de  $2 \times 10^3$  a  $1,5 \times 10^7$  enquanto que as de *Bacillus* spp. variaram de  $6,0 \times 10^1$  a  $1,8 \times 10^4$ . Foram obtidos aleatoriamente, 88 isolados de *Bacillus* para estudos de diversidade, sendo 48 de folhas, 28 de rizóforos, 11 de raízes e 1 de caule. Estudos de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) permitiram o agrupamento dos isolados em 28 grupos genéticos: 10 de raízes, 15 de rizóforos, 1 de caule e 2 de folhas. Esse estudo representa o primeiro relato sobre a densidade e diversidade de *Bacillus* em diferentes tecidos de plantas de inhame e constitui-se no primeiro passo para a exploração desses microrganismos em aplicações tecnológicas para o cultivo de inhame.

**Palavras-chave:** Diversidade genética, *Bacillus* spp., *Dioscorea rotundata*, RAPD.

## ABSTRACT

**Santos, A. C. O. S. Population densities and genetic diversity of endophytic *Bacillus* spp. associated with yam (*Dioscorea rotundata*)**

The yam international agribusiness has shown a significant increase, contributing to the expansion of cultivated areas. Nevertheless, the occurrence of pests and diseases and low technological level employed contribute to the low productivity of this crop. These aspects make the search for technological alternatives to increase production necessary. One alternative is the use of endophytic bacteria to promote growth and control pests and diseases. This work aimed to study the population density and genetic diversity of endophytic bacteria of yam. Population densities of total endophytic bacteria and *Bacillus* spp. were determined by serial dilutions and plating onto TSA and semi-selective medium for *Bacillus*, respectively. Population densities of total endophytic bacteria ranged from  $2 \times 10^3$  to  $1.5 \times 10^7$  while *Bacillus* populations ranged from  $6.0 \times 10^1$  to  $1.8 \times 10^4$ . Eighty-eight randomly selected *Bacillus* isolates were used for studies of diversity, with 48 from leaves, 28 from roots, 11 from tubers, one from stem. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis allowed the grouping of isolates into 28 genetic groups: 10 among the root isolates, 15 from tubers, 1 from stem and 2 from leaves. This study represents the first report on the density and diversity of *Bacillus* spp. in yam and constitutes the first step towards the exploitation of these microorganisms in technological applications for yam cultivation.

**Key-words:** Genetic diversity, *Bacillus* spp., *Dioscorea rotundata*, RAPD.



## INTRODUÇÃO

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções cruciais na manutenção dos ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares (MYERS, 1996). Apesar de sua importância, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (PACE, 1997). Este fato se deve em parte aos métodos de isolamento e identificação usados, pois até recentemente, para identificação de uma espécie bacteriana era necessário obter uma cultura pura e, nesta identificação utilizavam-se características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

Atualmente um maior número de organismos tem sido identificado e tantos outros reclassificados pelo uso de técnicas de identificação e classificação molecular, muitas delas permitindo a identificação de organismos não cultiváveis (KIRCHOFF et al., 1996; UEDA et al., 1995).

Dentre os microrganismos associados a plantas, encontram-se as bactérias endofíticas. Essas bactérias ocorrem em muitas, se não em todas as plantas cultiváveis, e sua diversidade tem sido amplamente relatada nos últimos anos. Bactérias endofíticas colonizam os espaços intercelulares dos tecidos vegetais, sem causar danos externos visíveis (AZEVEDO et al., 2000). A teoria de que bactérias não patogênicas residem em tecidos de plantas foi formulada por Perotti em 1926 (HALLMANN et al., 1997). Porém, estudos sobre a colonização de tecidos internos de plantas saudáveis por bactérias datam de 1870, com os trabalhos de Pasteur e outros pesquisadores (HOLLIS, 1951). Os primeiros relatos consideraram as bactérias endofíticas como contaminantes resultantes da desinfestação superficial incompleta ou como patógenos fracamente virulentos (HOLLIS, 1951). Historicamente, pensava-se tratar de bactérias patogênicas, no entanto descobriu-se que esses microrganismos apresentavam efeitos benéficos sobre a planta hospedeira (DAVISON, 1988; HALLMANN et al., 1997; HOFLICH et al., 1994; LODWYCKX et al., 2002), ou não apresentavam nenhum efeito observável (KADO, 1992).

Pesquisas demonstraram que bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas e reduzir os sintomas de doenças causadas por diversos patógenos (HALLMANN et al., 1997). Os efeitos na promoção de crescimento incluem aumentos na altura, na biomassa da parte aérea, do caule e da raiz e na formação de pêlos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema e na produção de tubérculos em batata (PILLAY & NOWAK, 1997; STURTZ, 2000). Os principais mecanismos pelos quais as bactérias endofíticas promovem o crescimento de plantas são a fixação de nitrogênio (BODDEY & DOBEREINER, 1995) e o controle biológico de fitopatógenos, seja este pelo antagonismo direto à microflora deletéria ou pela indução de resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997). As bactérias endofíticas podem também promover o crescimento de plantas pela produção de hormônios vegetais ou de substâncias análogas (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1991).

O nicho ecológico ocupado pelas bactérias endofíticas favorece o controle biológico de patógenos e pragas. Metabólitos produzidos por essas bactérias inibem ou matam uma variedade de agentes causadores de doenças e pragas de plantas sendo eficientes agentes de biocontrole de diversos patógenos, tanto de origem fúngica quanto bacteriana (HALLMANN et al., 1997; BENHAMOU et al., 2000; SESSITSCH et al., 2004; STROBEL, 2006). Nos tecidos internos da planta essas bactérias podem teoricamente, competir por nutrientes e espaço com os patógenos, bem como produzir substâncias tóxicas a estes organismos ou ainda, induzir a planta a desenvolver resistência às doenças (M'PIGA et al., 1997).

Existe um grande interesse na utilização de microrganismos endofíticos como ferramentas na promoção de crescimento de plantas e no biocontrole de fitopatógenos. Esse interesse se dá pela necessidade de buscar alternativas viáveis ao uso de agroquímicos e a sua utilização indiscriminada que levam a contaminação ambiental, dos alimentos, dos consumidores, e a seleção de populações resistentes a patógenos e aos produtos químicos.

Como um primeiro passo no uso racional de bactérias endofíticas em culturas de interesse agrícola no Recôncavo da Bahia, objetivou-se nesse trabalho, estudar as densidades populacionais e a diversidade de bactérias do gênero *Bacillus* em diferentes tecidos de plantas de inhame de cultivos comerciais. Deu-se ênfase às bactérias do gênero *Bacillus* por essas serem

frequentemente relatadas como agentes de controle biológico de diversas culturas de importância econômica (MUSSON, 1994; AZEVEDO, 2000; BARRETTI, 2001).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta do material vegetal e isolamento de bactérias endofíticas**

As coletas foram realizadas na região do Batatã, abrangendo os Municípios de Cruz das Almas, Maragogipe e São Felipe, áreas consideradas importantes na produção de inhame no estado da Bahia. As plantas coletadas foram mantidas em caixas térmicas e transportadas para o laboratório de microbiologia agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Utilizou-se um total de 13 plantas. As quais foram medidas e separadas em raiz, rizóforo, caule e folhas, sendo lavadas em água corrente e preparadas para processamento. De cada uma dessas partes foram pesados 1 g, sendo que de rizóforos foram retiradas amostras às profundidades de 0-1 cm, 1-3 cm e mais que 3 cm a partir da casca, e de caules as amostras foram retiradas de 50 e 100 cm a partir do colo das plantas. As amostras foram desinfestadas superficialmente por imersão em álcool 70 % por 1 min seguido por imersão em hipoclorito de sódio 1 % por 1 min e lavagem em água destilada esterilizada por três vezes. A eficiência do processo de desinfestação foi confirmada por meio do plaqueamento de uma alíquota de 100 µL da água utilizada na última lavagem. Utilizou-se apenas as amostras que não apresentaram nenhuma contaminação nessa fase.

Após a desinfestação superficial o material foi macerado em almofariz de porcelana contendo 9 mL de solução salina (NaCl 0,85 %) estéril. Após esse procedimento fez-se a diluição seriada, onde alíquotas de 1 mL foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 9 mL da solução salina estéril até se obter a diluição  $10^{-5}$ . De cada diluição foram retiradas alíquotas de 100 µL, semeadas em placas de Petri com auxílio de uma alça de Drigalsky contendo os meios TSA (Trypticase Soy Agar), composto por 5 g de Peptona; 15 g de Triptona; 15 g de NaCl; 15 g de ágar e água destilada para 1 L e meio semi seletivo para *Bacillus*,

composto por 1,3 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,37 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,07 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g de  $\text{FeCl}_3$ ; 1 g de glicose; 1 g de extrato de levedura e 15 g de ágar e água destilada para 1 L, para o semeio de bactérias endofíticas totais e *Bacillus* spp., respectivamente. Antes do semeio de *Bacillus* spp., os tubos das diluições seriadas, após terem sido utilizadas para plaqueamento em meio TSA, passaram por um choque térmico em banho-maria a 80 °C por 10 min (SNEATH, 1986). Foram feitas três repetições para cada diluição e as placas foram incubadas em temperatura ambiente e as unidades formadoras de colônias (UFC) determinadas 48 h após o semeio. Os resultados são apresentados em UFC/g de peso seco. Colônias representativas das diluições em meio semi-seletivo para *Bacillus* foram repicadas para placas de Petri e preservadas em glicerol 20 % a -20 °C para estudos subsequentes.

### **Extração de DNA Genômico**

Os isolados preservados foram cultivados em meio semi seletivo para *Bacillus* spp. e incubados a temperatura ambiente por 24 h. Duas colônias foram transferidas para microtubos tipo Eppendorff de 1,5 mL esterilizados contendo 200 µL de solução tampão de lise celular (NaOH 0,05 M, SDS a 0,25 %). Os microtubos foram aquecidos em banho seco a 100 °C por 20 min. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 10.000 rpm por 3 min em microcentrífuga e o sobrenadante foi diluído 20 vezes em água MilliQ autoclavada e conservados a -20 °C para as reações de PCR.

### **PCR para determinação de *Bacillus* spp.**

Para determinar se os isolados selecionados em meio seletivo eram *Bacillus* foi realizada uma reação da polimerase em cadeia utilizando um par de primers específicos para *Bacillus* spp. - B-K1/F 5' TCA CCA AGG CRA CGA TGC G e B-K1/R 5' CGT ATT CAC CGC GGC ATG (WU et al., 2006). Esses primers produzem em reações positivas um fragmento de 1114 pb. As reações de

amplificação foram feitas em um volume final total de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 10 mM de tampão da Taq pH (8,3), 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200 mM de cada dNTP, 40 pmol de cada primer, 1 U da Taq polimerase e 3,0  $\mu\text{L}$  de DNA. As condições de termociclagem foram às seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguidos de 25 ciclos iniciais com temperatura de 94 °C por 3 min, 64 °C por 3 min, 72 °C por 2 min com extensão final de 72 °C por 10 min. O produto amplificado foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 1%, 70 V por 30 min. Foi utilizado um marcador de 100 pb. Em seguida foi realizada a fotodocumentação do gel.

### **Diversidade genética por meio de RAPD**

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 15  $\mu\text{L}$ , contendo 10 mM de tampão da Taq pH (8,3), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200 mM de cada dNTP (Promega), 40 pmol de primer (Operon Technologies), 1 U de Taq polimerase e 1,8  $\mu\text{L}$  de DNA. Os primers decâmeros: D7 (TTGGCACGGG), M12 (GGGACGTTGG) e M13(GGTGGTCAAG) foram utilizados neste trabalho para obtenção dos marcadores RAPD. Esses primers foram selecionados por produzirem um distinto e consistente padrão de bandas em bactérias (KEEL et al., 1990). As amplificações foram efetuadas em termociclador PTC-100 (MJ Research) com as seguintes condições de termociclagem: 94 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, anelamento de primers a 35 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 90 s. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 min a 72 °C. Após o período de amplificação, foram adicionados a cada amostra 1 $\mu\text{L}$  de corante de corrida (azul de bromofenol 0, 25 % e glicerol 30 % em água MilliQ). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (2%) contendo brometo de etídio (10 mg/ml) submerso em tampão TAE (Tris-Acetato 90 mM e EDTA 1 mM). O DNA ladder de 100 pb foi utilizado como marcador de peso molecular. A separação eletroforética foi de 3 h a 80 V. Ao término da corrida, os géis foram fotografados em transiluminador de UV e fotodocumentados. A presença ou ausência de bandas geradas pela análise de RAPD foram convertidas em uma matriz de dados binários (1 para presença e 0 para ausência de um particular tamanho de banda no gel), que foi usada para

calcular o coeficiente de similaridade de Jaccard. As análises de agrupamento com o método Neighbor-joining e análise de bootstrap com 1000 reamostragens foram realizadas com o programa FreeTree (HAMPL et al., 2001). O dendograma foi editado e visualizado no TreeView (PAGE, 1996).

## RESULTADOS

### Densidade populacional de bactérias endofíticas em inhame

As densidades de bactérias endofíticas totais e de bactérias do gênero *Bacillus* foram estudadas em diferentes tecidos vegetais de plantas de inhame de cultivos comerciais pelo plaqueamento em meio semi-seletivo. As maiores densidades populacionais de bactérias totais foram encontradas em raízes, seguidas de caules, folhas e rizóforos (Tabela 1). As densidades populacionais em raízes ( $1,5 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>) foram 7500 X maiores que as densidades encontradas em profundidades maiores que 3 cm a partir da casca dos rizóforos ( $0,0002 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>), que corresponderam às menores densidades observadas. As densidades encontradas no caule de plantas de inhame foram maiores quando as amostras foram coletadas a 50 cm a partir do colo da planta e 1,5 X menos bactérias totais foram encontradas quando as amostras foram coletadas 100 cm a partir do colo das plantas. Amostras de folhas tiveram densidades intermediárias, com 2 X menos bactérias que amostras de caule coletadas 50 cm a partir do colo e 0,25 X mais bactérias que amostras de rizóforos coletados de 0-1 cm da casca. Quanto mais próximas da casca, maiores foram as densidades de bactérias totais em rizóforos. Amostras de rizóforos coletadas a profundidades de 0-1 cm, apresentaram densidades 200 X maiores que amostras coletadas a profundidades de 1-3 cm e essas foram 2 X maiores que as densidades encontradas em profundidades superiores a 3 cm a partir da casca.

As maiores densidades de bactérias do gênero *Bacillus* spp., á semelhança do que ocorreu para bactérias totais, ocorreram nas raízes, seguidas de caule,

folhas e rizóforos (Tabela 1). Em nenhuma das amostras foram recuperados isolados do gênero *Bacillus* em tecidos de caule coletados a 100 cm do colo das plantas (Tabela 1). A diferença entre a maior (raízes) e a menor densidade (rizóforos a partir de 3 cm da casca) foi de 300 X. Amostras de caule coletadas a 50 cm do colo apresentaram densidades 2,3 X menores que amostras de folhas. Os rizóforos apresentaram populações decrescentes de *Bacillus* a partir da casca (Tabela 1). De modo geral, as densidades de *Bacillus* variaram menos que as densidades de bactérias totais.

**Tabela 1** - Populações de bactérias totais e de *Bacillus* spp. observadas em raízes, caules, folhas e rizóforos de inhame cultivados em solos do Recôncavo Baiano.

Parte vegetal <sup>1</sup>	Bactérias Totais (UFC.g <sup>-1</sup> )	<i>Bacillus</i> spp. (UFC.g <sup>-1</sup> )	<i>Bacillus</i> (%)
Raíz	1 x 10 <sup>7</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	0,12
Caule (50 cm)	3x 10 <sup>5</sup>	9x 10 <sup>2</sup>	0,26
Caule (10 cm)	2 x 10 <sup>5</sup>	0	0,00
Folha	1x 10 <sup>5</sup>	4x 10 <sup>2</sup>	0,32
Rizóforo (0-1 cm)	4 x 10 <sup>5</sup>	3x 10 <sup>2</sup>	0,05
Rizóforo (1-3 cm)	4 x 10 <sup>3</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>	3,02
Rizóforo (>3 cm)	2 x 10 <sup>3</sup>	6x 10 <sup>1</sup>	3,62

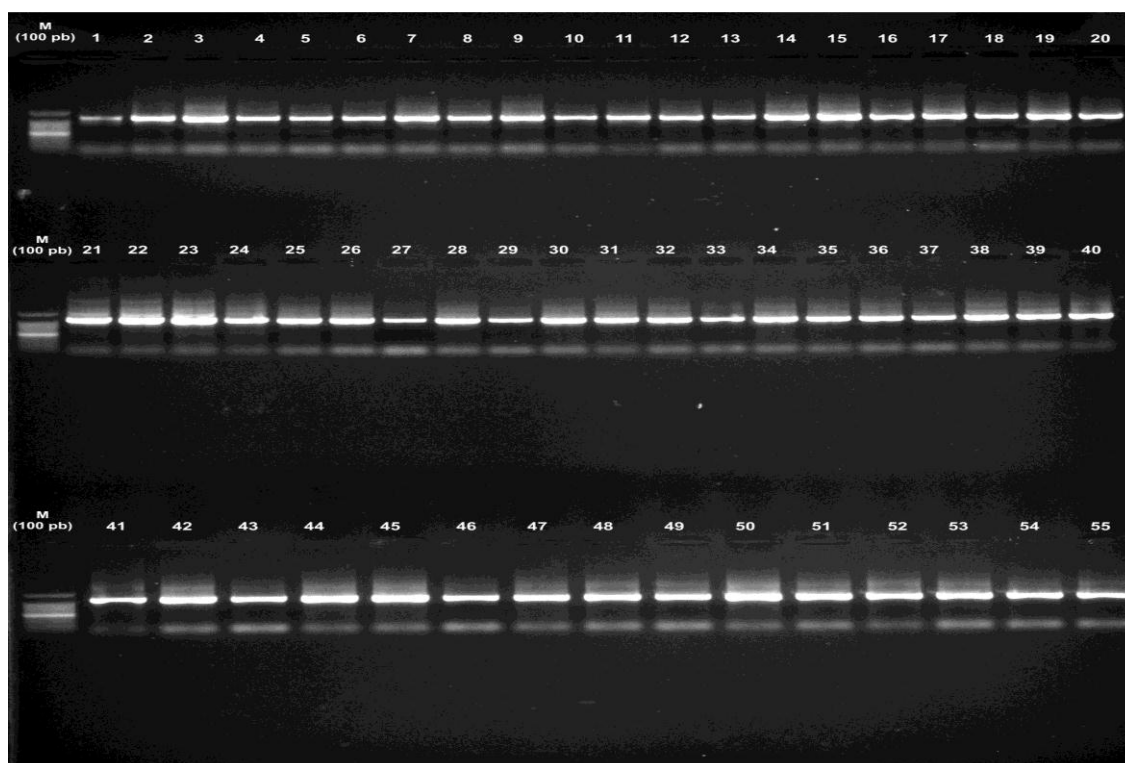
<sup>1</sup> As densidades populacionais em cada parte vegetal são resultantes de 13 repetições e as densidades são apresentadas por grama de peso seco.

As bactérias do gênero *Bacillus* representaram, em média, 1 % das bactérias endofíticas totais de diferentes partes de plantas de inhame. As maiores porcentagens de *Bacillus* foram encontradas em rizóforos com profundidades maiores que 3 cm (3,62 %), seguido de rizóforos com profundidades 1-3 cm (3,02 %), folhas (0,32 %), caules a 50 cm (0,26 %), raiz (0,1 %) e rizóforo com profundidades 0-1 cm (0,05 %).

## Diversidade genética de *Bacillus* spp. endofíticos de inhame

### Confirmação do gênero *Bacillus*

Dentre os 88 isolados selecionados ao acaso para o estudo de diversidade genética, todos foram amplificados por uma reação de PCR específico para o gênero *Bacillus* (Figura 1). Visto que esses isolados foram obtidos por plaqueamento em meio semi-seletivo, observa-se que houve uma boa correspondência entre o método de isolamento utilizado e a identidade dos isolados.

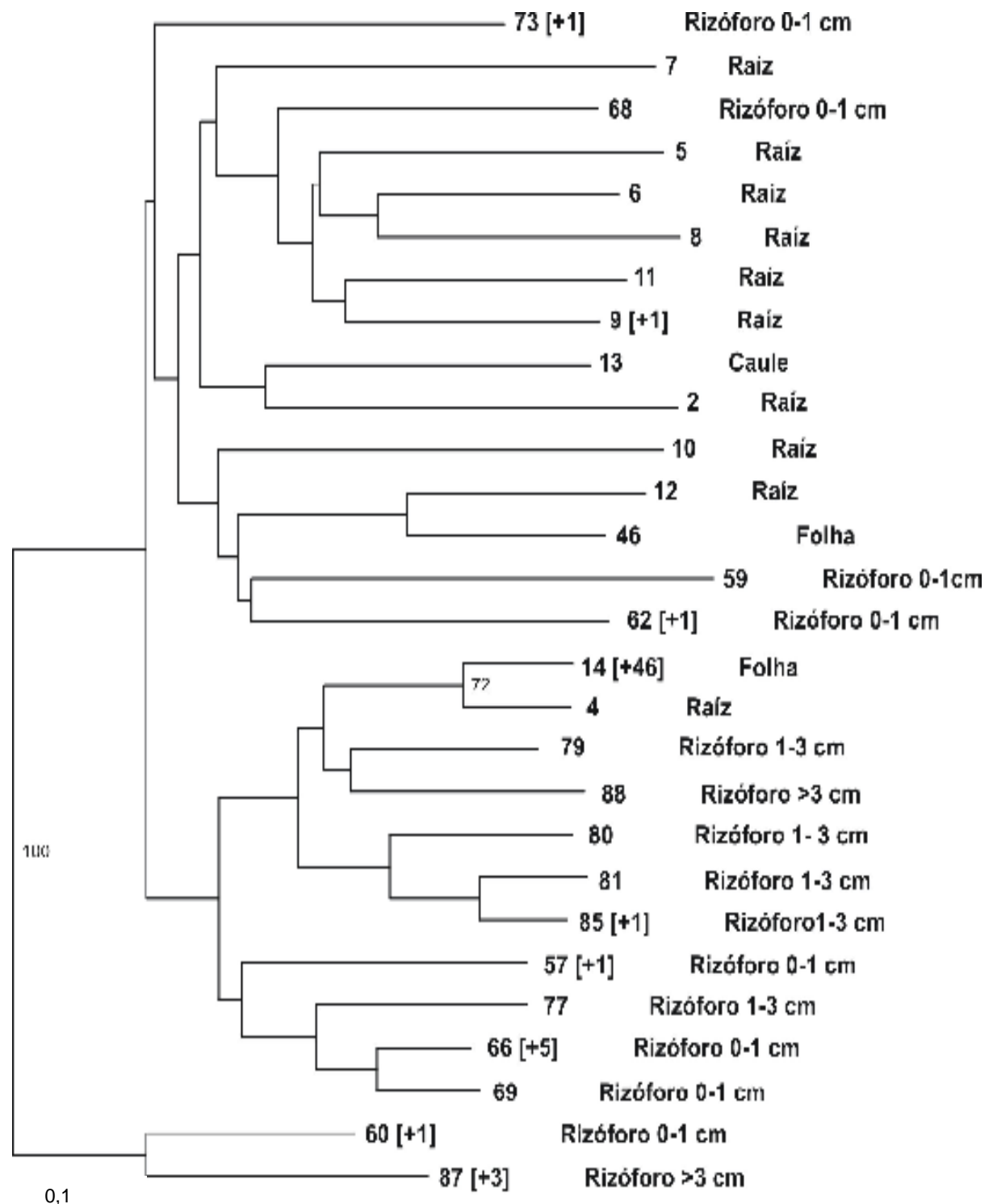


**Figura 1.** Foto representativa para alguns isolados do produto específico de 1114-pb obtido para isolados do gênero *Bacillus* de inhame (M) marcador de peso molecular de 100 pb.



### **Análise da diversidade de *Bacillus* por PCR-RAPD**

Para o estudo de diversidade genética por meio de RAPD foram utilizados 3 primers decâmeros e 88 isolados de *Bacillus* endofíticos obtidos de inhame. A amplificação do DNA com os 3 primers gerou um total de 85 bandas, sendo 34 dessas polimórficas. Por meio do agrupamento utilizando-se o método de Neighbor-Joining e coeficiente de Jaccard, foram obtidos 28 grupos RAPD (Figura 2). Dentre esses isolados, 11 foram obtidos de raízes, 28 de rizóforos, 1 de caules e 48 de folhas. Apesar do maior número de isolados ter sido obtido de folhas, esses órgãos apresentaram uma baixa diversidade genética, com apenas 2 grupos RAPD, seguidos de caule, de onde obteve-se apenas 1 isolado. A maior diversidade genética foi encontrada em raízes e rizóforos, com 10 e 15 grupos RAPD, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Dendrograma de isolados do gênero *Bacillus* spp. de inhame baseado em marcadores RAPD. Os coeficientes de similaridade de Jaccard foram agrupados por meio do método Neighbor-Joining. Os grupos finais foram definidos com base em 100 % de similaridade. A análise de bootstrap foi feita com base em 1000 repetições e os valores iguais ou maiores que 70 % são mostrados. A escala indica 10 % de similaridade.

De maneira geral, os isolados de raiz agruparam-se com similaridades entre 60 e 100 %, enquanto que os isolados de rizóforos agruparam-se com similaridades variando entre 45 e 100 % (Dados não apresentados). Verifica-se também que, se considerada a razão entre o número de grupos e o número de isolados analisados, as raízes apresentam uma maior diversidade que os rizóforos.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho estudaram-se as densidades populacionais e a diversidade genética de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* em diferentes tecidos de inhame. Estudos semelhantes para essa cultura não foram encontrados na literatura científica.

Em termos quantitativos, populações endofíticas nativas de bactérias totais encontradas em diferentes espécies plantas oscilaram entre  $10^4$  e  $10^6$  UFC/g de matéria fresca de raiz e caule de algodão e milho-doce;  $6,0 \times 10^3$  e  $4,0 \times 10^4$  UFC/g de tecido de xilema em alfafa;  $1,0 \times 10^2$  e  $7,0 \times 10^2$  UFC/g de tecido de xilema em galhos de citros;  $10^3$  e  $10^6$  UFC/g de raiz de beterraba-açucareira; e  $10^3$  e  $10^5$  UFC/g de raiz de mudas de pinus (JACOBS et al., 1985; McINROY e KLOEPPER, 1995a; SHISHIDO et al., 1999). Os resultados aqui encontrados com inhame para bactérias endofíticas totais foram semelhantes, variando de  $2 \times 10^3$  a  $1,5 \times 10^7$  (Tabela 1). Por outro lado, populações endofíticas nativas de *Bacillus* spp. parecem não ter sido avaliadas em trabalhos científicos até o momento, embora inoculações de plantas de milho com *Bacillus* endofíticos tenham mostrado níveis de colonização variando de  $1,6 \times 10^5$  a  $3,8 \times 10^5$  (RHITU et al., 2007).

O fato de se ter encontrado maiores densidades de bactérias totais e *Bacillus* spp. nas raízes das plantas deveu-se, provavelmente, a migração dessas bactérias do solo para as raízes. Estudos anteriores relataram maiores populações de bactérias na raiz que em qualquer outra parte da planta

(SUBRAHMNYAM et al., 1983; KLOEPPER et al., 1989; LAMB et al., 1996;). Isolados com maior habilidade na utilização de exsudatos radiculares possuem vantagem competitiva na colonização de raízes (SILVA et al. 2003; QUEIROZ et al., 2006). Talvez a atração das bactérias para o interior das plantas também dependa da habilidade de utilização de exsudatos radiculares, mas não existem dados sobre o papel dos exsudatos em colonização endofítica.

As densidades de bactérias totais e de *Bacillus* spp. observadas em rizóforos foram as menores (Tabela 1). Curiosamente, as proporções de *Bacillus* em relação a bactérias totais foram inversamente proporcionais no interior desses órgãos. Futuros estudos deverão ser conduzidos para a elucidação dessa questão.

Com exceção dos rizóforos, as populações de bactérias totais e de *Bacillus* spp. foram maiores nos órgãos das plantas mais próximos do solo, pois essas bactérias endofíticas provavelmente originaram-se no solo, como sugerido anteriormente.

Alguns autores têm comparado a comunidade bacteriana interna e externa de plantas de algodão (HALLMANN et al., 1997) e batata (STURZ, 2000) e, quase todas as bactérias endofíticas, também foram encontradas na rizósfera. Por outro lado, no presente estudo, observou-se que os isolados dos diferentes órgãos de plantas de inhame tenderam a agrupar-se. Além disso, nenhum isolado de qualquer dos órgãos das plantas foi obtido em outro órgão (Figura 2). Isso indica que existe uma preferência de colonização dos diferentes órgãos das plantas por isolados específicos de *Bacillus*. Os isolados de folhas formaram dois grupos relacionados a isolados de raízes, enquanto que os isolados de rizóforos e raízes tenderam a formar grupos separados, porém alguns dos isolados de rizóforos agruparam-se com os de raízes. Alguns autores demonstraram a influência do genótipo do hospedeiro na colonização de raízes ou outras partes de plantas por bactérias endofíticas ou da rizosfera (SMITH et al., 1999; ADAMS & KLOEPPER, 2002). Nesse trabalho observou-se que existem genótipos de bactérias específicos nas diferentes partes de plantas de inhame.

Bactérias endofíticas podem conferir ao seu hospedeiro características como maior tolerância a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, suprimento de nitrogênio e produção de reguladores de crescimento vegetal, e aumento da resistência contra patógenos e pragas (HALLMANN et al.,

1997; BENT & CHANWAY, 1998; MARCON, 2002; TAECHOWISAN et al., 2003). Além disso, há relatos de bactérias endofíticas capazes de degradar poluentes em ambientes contaminados (NEWMAN & REYNOLDS, 2005; HALLMANN et al., 1997; KUNOH, 2002; COOMBS et al., 2004; M'PIGA et al., 1997).

Em conclusão, esse estudo mostrou que bactérias endofíticas de inhame ocorrem em todos os órgãos das plantas e que as maiores densidades foram encontradas nas raízes, tanto de bactérias totais quanto de *Bacillus*. Os estudos de RAPD mostraram que isolados do gênero *Bacillus* diferem nas diferentes partes de plantas de inhame.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente trabalho é o primeiro a analisar a densidade populacional e a diversidade genética de bactérias endofíticas em inhame. O trabalho constitui-se no primeiro passo para a realização de futuros estudos utilizando bactérias do gênero *Bacillus* para promoção de crescimento e controle de patógenos do inhame, como fungos e nematóides. Os próximos estudos deverão também tratar da identificação dos isolados por métodos moleculares e a determinação da atividade dos isolados selecionados quanto a sua capacidade de promover crescimento e controlar doenças do inhame.

## REFERÊNCIAS

ADAMS P. D. ; KLOPPER, J. W. . Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Soil**, v. 240, n. 1, p. 181-189, 2002.

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

ARAÚJO, W. L. et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639- 1645, 2005.

ARAÚJO, J. M., SILVA, A. C., AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). Brazilian **Archives of Biology Technology**, v.43, p.447-451, 2000.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros**. 1996. 85f. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/USP, Piracicaba, 1996.

ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

ARTHEY, V.D. **Quality of horticultural products**. New York: John Wiley, 1975. 228 p.

ASSUMPÇÃO, L. C. ET AL. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n.5, p.503-510, maio 2009.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, 2000.

AZEVEDO, J. L., Microrganismos endofíticos, In: MELO, J. L. **Ecologia microbiana**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1988. cap. 4, p. 117-137.

BALDANI, J. I. et al. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Orgs.). **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 433.

BARRETTI, P. B. **Isolamento e seleção de bactérias endofíticas com potencialidade para o biocontrole de enfermidades do tomateiro**. 2001. 38 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p.529-535, 2008.

BELL, C. R. et al. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 46-53, 1995.

BENHAMOU, N. et al. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica*, *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p. 45-56, 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.

BENSALIM, S.; NOWAK, J.; ASIEDU, S.K. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. **American Journal of Potato Research**, v.75, p.145-152, 1998.

BETTIOL, W. ; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 8, p. 1165-1174, 1990.

BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. **Fertilizers Research**, v. 42, p. 241-250, 1995.

BRILLOUET, J.M.; TRECHE, S.; SEALY, L. Alterations in cell wall constituents of yams *Dioscorea dumetorum* and *D. rotundata* with maturation and storage conditions. Relation with post-harvest hardening of *D. dumetorum* yam tubers. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 6, p. 1964-1967, 1981.

BOBROWSKI, V. L. et al. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 843-850, 2003.

CAPALBO, D.M.F.; VILAS-BÔAS, G.T.; SUZUKI, M.T. *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnología Ciencia e Desenvolvimento**, n. 34, p. 78-85, 2005.

CAVALCANTE, V.A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p23-31,1988.

CAZÉ FILHO, J. Clonagem do inhame (*Dios corea* sp. ) por métodos biotecnológicos. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002. João Pessoa, PB. **Anais ...** João Pessoa: Emepa, 2002. v.1, p.113-126.

CIACCO, C.F.; D'APPOLONIA, B.L. Baking studies with cassava and yam flour. Biochemical composition of cassava and yam flour. **Cereal Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 402-411, 1978.

CHANWAY, C. P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, Bethesda, v. 43, p. 99- 112, 1997.

CHEN, C. et al. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, San Diego, v. 5, p. 83-91, 1995.

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

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio/Technology**, v.6, p.282-286, 1988.

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

DOMENECH, J. et al. *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. *ballota*: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. **Forest Ecology and Management**, Victoria, v. 194, n. 1-3, p. 293-303, June 2004.

EI-TARABILY K. A. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.257-266, 2003..

FAHEY, J. W. et al. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. London: Springer-Verlag, 1991. p.401-411.

FAO. **Faostat**. Disponível em: <<http://www.Fao.org>> . Acesso em: mar. 2007.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; SUTTON, B.C. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. From England, Majorca and Switzerland. **New Phytologist**, v. 127, p.133-137, 1994.

FREITAS, S.S. ; PIZZINATTO, M.A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathol.**, v. 23, p. 36-41, 1997.



GARRIDO, M. da S. et al. Novas tecnologias para a produção do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) na Estado da Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 6, n.1, p.19-22, 2003b.

GILL, M. I. S. et al. Pluronic F-68 enhanced shoot regeneration in micropropagated *citrus* Rootstock and *Passiflora* species. **Acta Biotechnology**, Weinheim, v. 23, n. 4, p. 349-358, 2003.

GREUTER, W. et al. **International code of botanical nomenclature** (Tokyo Code). Berlin: Koeltz Scientific Books, 1994. 91p.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.10, p.895-914, 1997.

HAMPL, V.; PAVLICEK, A.; FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.731-735, 2001.

HOFLICH, G.; WIEHE, W.; KUHN, G. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. **Experientia**, v.50, p.897-905, 1994.

HOLLIS, J. P. Bacteria in healthy potato tissue. **Phytopathology**, Madison, v. 41, p. 350-367, 1951.

HUREK, T. et al. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 1913-1923, 1994.

IITA. **Annual report of the International Institute of Tropical Agriculture**. Ibadan, Nigeria, 2006.

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

KADO, C.I. Plant pathogenic bacteria. In: BALOWS, A. et al. (Eds.). **The procaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. p.660-662.

KEEL, C. et al. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root of tobacco. **Symbiosis**, v. 9, p.327-342, 1990.

KETIKU, A.O.; OYENUGA, Y.A. Changes in the carbohydrate constituents of yam tuber (*Dioscorea rotundata* poir.) during growth. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 24, n. 4, p. 367-373, 1973.

KIRCHOFF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biol. Biochem.**, n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacteria for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, p. 39-43, 1989.

KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v. 46, p. 406-409, 1996

KLOEPPER, J. W. et al. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance - historical precedence. **Phytopathology**, v. 87, p. 136-137, 1997

KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKHAM, S. S. Biological control of sheath blight of rice: induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp. **Current Science**, v.72, p.331-334, 1997.

KUNOH, H. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 249-252, 2002.

KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotrófi cas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.1459-1465, 2007.

LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1112-1120, 1996.

LAZAROVITS, G. ; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **Hortic. Sci.**, v. 32, p. 188-192, 1997.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 21, p. 583-606, 2002.

LUCON, C. M. M. et al. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p.225-232, 2009.

MAHAFFEE, W.F. et al. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89b-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22. In: M.H. RYDER, ; STEPHENS, P. M.; BOWEN, G. D. **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria**. Melbourne, Australia : CSIRO, 1997. p.180.

MANKAU, R. ; PRASAD, N. Possibility and problems in the use of a sporozoan endoparasite for biological control of plant parasitic nematodes. **Nematropica**, v. 2, p. 7-8, 1972.

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

MARTIN, F.W. Tropical yams and their potentiall. Washington: USDA, 1976. 40 p. (USDA. Agriculture handbook, 495).

MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de Citrus spp. e interação com *Xylella fastidiosa***. 2002. 91f. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/USP, Piracicaba, 2002.

McCULLY , M. E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologists't view. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.983-990, 2001.

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

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

McKEEN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, v.76, p.136-139, 1986.

MEGURO, A et al. Induction of disease resistance in tissue-cultured seedlings of mountain laurel after treatment with *Streptomyces padanus* AOK-30. **Actinomycetologica**, Tokyo, v.18, p.48-53, 2004.

MEHNAZ et al. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.110-117, 2001.

MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1998. p.117- 137.

MESQUITA A. S. Inhame - *Dioscorea cayennensis* Lam. – e taro – *Colocasia esculenta* (L.) Schott. - Cenários dos mercados brasileiro e internacional. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO, 2. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2002. v. 1, p. 215-238.

MENDES, R. A. **Cultivando inhame ou Cará da Costa**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. 26p. (Circular técnica, n. 4).

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

MONNERAT, R.G. et al. **Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 2003. (Comunicado técnico, 98).

MOURA, R. M. Doenças do inhame. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, p. 463-471.

MOURA, R. M. Problemas fitossanitários do inhame no Nordeste e proposta para um sistema integrado de controle. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002, João Pessoa. **Anais ...** João Pessoa: UFPB, 2002. p.68-72.

M'PIGA, P. et al. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, p.301-320, 1997.

MUSSON, G. **Ecology and effects of endophytic bacteria in plants**. 1994. 114f. Thesis (Ms) - Auburn University, Auburn, 1994.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 2764-2769, 1996.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.6-8, 2005.

NUNES, F.V. **Isolamento e identificação de bactérias endofíticas do café (*Coffea arabica* e *Coffea robusta*) e seu potencial biotecnológico**. 2004. Dissertação (Mestrado) - USP/Interunidades, São Paulo, 2004.

OKA, Y.; CHET, I. ; SPIEGEL, Y. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, p. 115-126, 1993.

OKIGBO, R. N. Biological control of postharvest fungal rot of yam (*Dioscorea* spp.) with *Bacillus subtilis*. **Mycopathologia**, v. 159, p. 307–314, 2005.

ORKWOR, C.C.; EKANAYAKE, I.J. Growth and development. In: ORKWOR et al. (Eds.). **Food yams: advances in research**. Ibadan: NRCRI ; IITA, 1998. p. 39-62.

PACE NR., A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-40, 1997.

PAGE, R. D. M.; TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PAN, M.J. et al. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* race 4 by endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **Journal of phytopathology**, v. 145, p. 479-486, 1997.

PEDRALLI, G. Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 1., João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: Emepa, 2002. v.1, p.308-311.

PEIXOTO NETO, P.A.S. et al. **Inhame: o Nordeste fértil**. Maceió, AL: EDUFAL, 2000. 88p.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. p.179-197.

PEREIRA, J. O. 1993. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais**. 1933. 104f. Tese (Doutorado) - ESALQ, Piracicaba, SP, 1933.

PILEGGI, S.A.V. **Isolamento e caracterização de Microrganismos Endofíticos por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**, 2006. 161f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PILLAY, V. J.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 354-361, 1997.

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, p. 665-672, 1995.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters of Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 284-288, 1997.

POCASANGRE, L. et al. Survey of banana endophytic fungi from central America and screening for biological control of the burrowing nematode (*Radopholus similis*). **Infomusa**, v. 9, p. 3-5, 2000.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops: monocotyledons**. New York: J. Wiley & Sons, 1975. 607 p.

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

QUEIROZ, L.P.; CONCEIÇÃO, A. A. ; GIULIETTI, A.M. Nordeste semi-árido: caracterização geral e lista das espécies fanerógamas, In: GIULIETTI, A. A. ; CONCEIÇÃO, A.A.; QUEIROZ, L.P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro**. Recife: Associação de Plantas do Nordeste, 2006. v. 1, p. 15-40.

QUISPEL, A.. Bacteria-plant interaction in symbiotic nitrogen fixation. **Physiologia Plantarum**, v.74, p.783-90, 1988.

RAI, R. et al. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a Tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 853–858, 2007.

REDMAN, R. S. et al. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. **Plant Physiology**, v. 119, p. 795- 804, 1999.

REINHOLD-HUREK, B. ; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization and perspectives to study their function. **Crit. Rev. Plant Sci.** v. 17, p. 9-54, 1998.

REITER, B. et al. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2261-2268, 2002.

RITZINGER, C. H. S. P. et al. **Aspectos fitossanitários da cultura do inhame**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 39p.

RODRIGUES, K.F.; DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesq. Agropec. Bras**, v. 31, n. 12, p. 905-909, 1996.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p.1-9, 2008.

SAIKKONEN, K. et al. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-33, 1998.

SANTOS, E. S.; MACÊDO, L. S. **Tendências e potencialidades da cultura do Inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil**. João Pessoa, PB: Emepa, 2006.

SANTOS E.S. **Inhame (*Dioscorea* spp): aspetos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996.

SANTOS, E. S. dos; PUIATTI, M. **Cultura do taro (*Colocasia esculenta*)**. João Pessoa: EMEPA-PB, UFV, SEBRAE, 2002. 9 p.

SANTOS E. S. Manejo sustentável da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO, 2. 2002. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2002. v. 1, p. 181-195.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SELOSSE, M. A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 327, n. 7, p. 639-48, 2004.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 4, p. 239-249, 2004.

SHARMA, V. K.; NOWAK J. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p.528-536, 1998.

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

SIDDIQUI Z. A.; MAHMOOD I. Biological control of *Meloidogyne incognita* race 3 and *Macrophomina phaseolina* by *Paecilomyces lilacinui* and *Bacillus subtilis* alone and in combination on chickpea. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 16, p. 215-218, 1993.

SILVA, A. da et al. Estudo químico do fungo *Pestalotiopsis* sp. isolado do fruto de *Gustavia* cf. *elliptica*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza - Ce. **Anais...** . Fortaleza: SBQ, 2009.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO. R. S. ; MOUNTEER A.; Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potencial biocontrole agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 1, p. 42-46, 2003.

SILVA, M. F. et al. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-acucar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n.11, p.1437-1443, nov. 2009

SMITH, K. P.; GOODMAN, R. M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37,p.473-491,1999.

SNEATH, P. H. A. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: SNEATH, P. H. et al. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1986. v. 2, p. 1104-1139.

STOLTZFUS, J. R. et al. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant Soil**, v. 194, p. 25-36, 1997.

STROBEL, G. A. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 240-244, 2006.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

SUBRAHMANYAN, P.; REDDY, M. N.; RAO, A. S. Exudation of certain organic compounds from seeds of groundnut. **Seed Science and Technology**, v. 11, n. 2, 267- 272, 1983.

TAECHOWISAN, T. et al. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **WORD J. Microb. Biot.**, Dordrecht, v. 19, p. 381-385, 2003

TAGHAVI S. et al.. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 748-757, feb. 2009.

TEIXEIRA, M. A. et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.43-49, 2007.

TEIXEIRA, M.A. **Diversidade de bactérias endofíticas de mandioca (*Manihotis esculenta* Crantz) coletada de diferentes regiões do Brasil**. 2004. 102f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TRECHE, S.; GUION, P. The nutritional potential of some tropical tuber crops in the Cameroons. **Agronomie Tropicale, Yaound**, Cameroons, v. 34, n. 2, p. 127-137, 1980.

TUNALI, B. et al. Antagonistic effect of endophytes against several root-rot pathogens of wheat. In: DURUM WHEAT IMPROVEMENT IN THE MEDITERRANEAN REGION, 2000, Zaragoza, Spain, . **Proceedings of a Seminar...** Zaragoza, Spain: New Challenges, 2000. p. 381-386.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI; T. et al. Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1414-1417, 1995.

WEBBER, J. A natural control of dutch elm disease. **Nature**, v.292, p.449-451,1981.

WELBAUM, G. et al. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 23, p.175–193, 2004.

WILSON, D. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, p. 274-276, 1995.

WU, D. et al. Metabolic complementarity and genomics of the dual bacteriel symbiosis of sharpshooters. **PloS Biology**, Washington, v. 4, p. 1079 - 1092, 2006.

ZINNIEL, D. K. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2198- 2208, 2002.



ZUCKERMAN, B. M.; DICKLOW, M.; ACOSTA, N. A strain of *Bacillus thuringiensis* for the control of plant-parasitic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, p. 41-46, 1993.