

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PAULA CRISTIANE MACHADO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CULTURA DO PINHÃO-MANSO
(*Jatropha curcas* L.) COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia. Área de
concentração: Biotecnologia

SÃO CARLOS – SP

Agosto de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PAULA CRISTIANE MACHADO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CULTURA DO PINHÃO-MANSO
(*Jatropha curcas* L.) COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia. Área de
concentração: Biotecnologia

Orientadores: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

SÃO CARLOS – SP

Agosto de 2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M149i Machado , Paula Cristiane
Identificação molecular e caracterização bioquímica de bactérias endofíticas associadas à cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) com potencial biotecnológico / Paula Cristiane Machado . -- São Carlos : UFSCar, 2015.
100 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Bioprospecção. 2. Controle biológico. 3. Endófitos. 4. Enzimas. 5. Promoção de crescimento. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Paula Cristiane Machado, realizada em 25/08/2015:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
UFSCar

Profa. Dra. Nadja Fernanda Gonzaga Serrano
Embrapa

Dedico e ofereço

Aos meus pais José Roberto e Marionilda pelo amor, dedicação e por me incentivar e ajudar a alcançar meus sonhos, AMO VOCÊS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus que me deu diversas oportunidades e pessoas especiais que pude contar em toda esta jornada.

Aos meus pais, que sempre primaram pela minha educação, Obrigado Sr. José Roberto e Sra. Marionilda por, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre estarem presentes e sou muito grata e feliz por isto.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela oportunidade, confiança e pelo privilégio de fazer parte de sua equipe de pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Clóvis Wesley de Souza pela colaboração e amizade.

À minha irmã Marielli participou desta conquista e principalmente agradeço pelos dois anjos Davi e Miguel, que alegam meu dia-a-dia, sou muito feliz por ter vocês.

Ao meu Namorado Júnior pelo amor, paciência, carinho em todos os momentos de dificuldade e felicidade. Obrigada pelo companheirismo.

Aos técnicos, funcionários, professores e amigos do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, pela amizade e convivência durante toda a etapa do projeto.

A Prof. Dra. Maria Carolina Quecine e Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", Departamento de Genética, ESALQ/USP, pela contribuição no desenvolvimento deste projeto e pelo conhecimento adquirido.

Ao técnico José Antônio da Silva (Zezo) do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", Departamento de Genética, ESALQ/USP, pela amizade e serviços técnicos prestados.

A todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", Departamento de Genética, ESALQ/USP, pela amizade e convivência durante todo o tempo em que estive lá.

A Prof. Dra. Tsai Siu Mui pela oportunidade do aprendizado adquirido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e por contribuir com o desenvolvimento deste trabalho na parte de genômica.

A Dra. Fabiana Cannavam do CENA/USP que auxiliou na etapa de identificação molecular dos isolados bacterianos com muito carinho e paciência.

A todos os funcionários do CENA/USP, que sempre se empenharam em me ajudar com tudo o que precisei nesta jornada.

As Me. Bruna Durante Batista e Maria Carolina Silva que pelo apoio na execução dos trabalhos.

As minhas amigas Thaís Botamede, Larissa Marila, Fernanda Pinheiro e Ana Luiza Nardin pelo apoio e carinho.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-PPGBiotec da UFSCar, pela contribuição na minha formação.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS ENDOFITICAS ASSOCIADAS À CULTURA DO PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.) COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

RESUMO

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.), pertencente à família das Euforbiáceas é uma planta geneticamente próxima a mamona (*Ricinus communis*, L.), originária da América Central e atualmente está distribuída em todas as regiões tropicais do globo. No Brasil esta cultura tem recebido especial atenção como uma alternativa para o fornecimento de óleo vegetal como matéria-prima para fabricação do biodiesel, devido ao potencial biotecnológico de suas sementes. Vários estudos foram desenvolvidos sobre variabilidade genética do *J. curcas* visando adaptações climáticas e produtividade; porém poucos estudos foram dedicados a análise da comunidade microbiana associada a essa espécie vegetal. O interior da planta é habitado por micro-organismos endófitos que podem ser isolados dos tecidos vegetais desinfectados superficialmente e que não causam danos aparentes a planta hospedeira. Este grupo de micro-organismos apresenta a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos diretos, tais como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção do ácido indol acético (AIA) e por mecanismos indiretos, como antagonismo a fitopatógenos. Além disso, os micro-organismos endofíticos são considerados promissores para a bioprospecção de enzimas. O presente trabalho teve como objetivo, a caracterização de setenta e duas bactérias endofíticas, associadas à cultura do pinhão-mansão, com potencial para promoção de crescimento vegetal e produção de enzimas. Desse total de isolados testados 40% apresentaram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio atmosférico, 43% solubilizaram fosfato inorgânico, 69% produziram AIA, para o teste de antagonismo 36% dos isolados apresentaram alguma atividade antagonista para os fungos fitopatogênicos *Alternaria alternata*, 12% *Ceratocystis paradoxa*, 22% *Fusarium proliferatum* e (24%) e *F. Verticillioides*. Com relação atividade enzimática 16% dos isolados avaliados apresentaram atividade amilolítica, 29% celulolítica, 29% lipolítica, 20% esterolítica, 46% pectinolítica (18% poligalacturonase e 43% pectato liase) e 37% proteolítica. De uma coleção de setenta e dois isolados bacterianos, vinte e cinco foram identificados por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, abrangendo sete diferentes gêneros: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Curtobacterium*, *Enterococcus*, *Microbacterium*, *Promicromonosporaceae* e *Sanguibacter* foram isolados como bactérias endofíticas de pinhão-mansão.

Palavras-chaves: Bioprospecção, controle biológico, endófitos, enzimas, promoção de crescimento.

MOLECULAR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH THE CULTIVATION OF JATROPHA (*Jatropha curcas* L.) WITH BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL

ABSTRACT

The *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.), which belongs to the the family of Euphorbia is a plant genetically close to the Castor Plant (*Ricinus communis* L.), coming from Central America and being currently distributed in all tropical regions of the globe. In Brazil, this crop has received special attention as an alternative for the supply of vegetable oil as a raw material for biodiesel manufacturing, due to the biotechnological potential of its seeds. Several studies aimed at climatic adaptations and productivity have been developed on genetic variability of *J. curcas*; but few studies have been developed focusing on the analysis of the microbial community associated with this species. The interior of the plant is inhabited by endophyte microorganisms, which can be isolated from disinfected surface and do not put on risk the plant tissues of the host plant. This group of microorganisms has the ability to stimulate the growth of plants by direct mechanisms, such as/biological fixation of nitrogen, solubilization of inorganic phosphate indole acetic acid production (AIA) and indirect mechanisms, such as the antagonism towards phytopathogens. Moreover, endophytic microorganisms are considered promising for bioprospecting of enzymes. The aim of this study was to perform the characterization of seventy-two endophytic bacteria associated with the *J. curcas* plants, with potential for promoting plant growth and enzyme production. Of this total of tested isolates 40% showed positive results for fixation of atmospheric nitrogen, 43% solubilized inorganic phosphate, 69% have produced AIA, 36% showed some antagonistic activity to phytopathogenic fungi *Alternaria alternata*, 12% for *Ceratocystis paradoxa*, 22% for *Fusarium proliferatum* and 23% for *Fusarium verticillioides*. Regarding enzymatic activity, 16% of the isolates evaluated showed amyloid activity, 29% endoglycolytic, 29% lipolytic, 20% esterase, 46% pectinolytic (18% poligalacturonase and 43% pectato lyase) 37% proteolytic. From a collection of seventy two bacterial isolates, twenty-five were identified by means of the partial 16S rDNA gene embracing seven different genres: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Curtobacterium*, *Enterococcus*, *Microbacterium*, *Promicromonosporaceae* and *Sanguibacter* were isolated as endophytic bacteria of *Jatropha*.

Keywords: Bioprospection, biological control, endophytes, enzymes, plant growth promoting

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a metodologia para avaliação massal de antagonismo *in vitro* dos isolados bacterianos endofíticos do pinhão-mansó em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado 1, 2, 3, e 4 representam os isolados bacterianos e o disco com letra “X” no centro da placa Petri representa o fungo testado40
- Figura 2.** Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a metodologia para avaliação massal de antagonismo *in vitro* dos isolados bacterianos endofíticos do pinhão-mansó em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado “Y” representa o isolado bacteriano selecionado na etapa anterior (Figura 1) e o disco com letra “X” na outra extremidade da placa Petri representa o fungo testado.....41
- Figura 3.** Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em meio NFb semi-sólido inoculado com o isolado endofítico (cód. 36A) 47
- Figura 4.** Representação do diâmetro dos halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por isolado bacteriano positivo, inoculado em quadruplicada com o isolado endofítico (cód. 4)48
- Figura 5.** Soluções para a construção da curva padrão com diferentes concentrações de AIA comercial (Sigma) (ARAÚJO et al., 2014)..... 49
- Figura 6.** Atividade antagônica dos isolados bacterianos endofíticos contra os fungos fitopatogênicos *Alternaria alternata*, *Ceratocystis. paradoxa*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium verticillioides* 50
- Figura 7.** A) Atividade antagônica do isolado endofítico do pinhão-mansó (cód 55A) *versus* o fungo fitopatogênico *C. paradoxa*. B) controle: fungo *C. paradoxa* sem nenhum isolado bacteriano50
- Figura 8.** Atividade enzimática dos isolados endofíticos51

Figura 9. Testes semi-quantitativos de produção de enzimas hidrolíticas por bactérias endofíticas isoladas do pinhão-mansão. A) Produção de celulase; B) Produção de lipase; C) Produção de pectinase; D) Produção de protease52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados estatísticos da atividade amilolítica de bactérias endofíticas.....	53
Tabela 2. Dados estatísticos da atividade celulolítica de bactérias endofíticas	54
Tabela 3. Dados estatísticos da atividade esterolítica de bactérias endofíticas.....	55
Tabela 4. Dados estatísticos da atividade lipolítica de bactérias endofíticas	56
Tabela 5. Dados estatísticos da atividade pectinolítica (poligalacturonase) de bactérias endofíticas	57
Tabela 6. Dados estatísticos da atividade pectinolítica (pectato liase) de bactérias endofíticas	58
Tabela 7. Dados estatísticos da atividade proteolítica de bactérias endofíticas	59
Tabela 8. Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequências parciais do gene 16S rDNA de bactérias endofíticas isoladas do pinhão-manso com as sequências obtidas no banco de dados <i>GenBank</i> através da ferramenta <i>BLASTn</i>	60
Anexo A. Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados de bactérias endofíticas do pinhão-manso.....	97
Anexo B. Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados de bactérias endofíticas do pinhão-manso: testes de antagonismo.....	99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A cultura do pinhão-manso.....	17
2.2 Potencial biotecnológico da cultura do pinhão-manso	18
2.3 Micro-organismos endofíticos.....	21
2.4 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas.....	22
2.4.1 Fixação biológica de nitrogênio	23
2.4.2 Solubilização de fosfato.....	24
2.4.3 Produção de ácido indol acético.....	25
2.4.4 Controle biológico de fitopatógenos por bactérias endofíticas	26
2.5 Fungos fitopatogênicos	29
2.6 Produção de enzimas por bactérias endofíticas.....	32
2.7 Estudos da diversidade genética microbiana	34
2.7.1 Análise do gene 16S rDNA para estudos de diversidade em comunidades bacterianas.....	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Isolados bacterianos endofíticos	37
4.2 Promoção de crescimento vegetal.	37

4.2.1	Fixação biológica de nitrogênio	37
4.2.2	Solubilização de fosfato inorgânico	38
4.2.3	Produção de ácido indol acético (AIA)	38
4.2.4	Atividade antagônica contra fungos fitopatógenos	39
4.2.4.1	Técnica do pareamento direto <i>in vitro</i>	40
4.3	Produção de enzimas.....	42
4.3.1	Atividade amilolítica.....	42
4.3.2	Atividade celulolítica	42
4.3.3	Atividade lipolítica e esterolítica	43
4.3.4	Atividade pectinolítica.....	43
4.3.5	Atividade proteolítica	43
4.3.6	Índice enzimático e análise estatística	44
4.4	Identificação molecular dos isolados bacterianos	44
4.4.1	Extração de DNA das bactérias endofíticas	44
4.4.2	Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR.....	45
4.4.3	Purificação do DNA, Sequenciamento de regiões 16S rDNA e análise das sequências	45
4.4.4	Identificação dos isolados bacterianos.....	46
5	RESULTADOS	47
5.1	Promoção de crescimento vegetal	47
5.1.1	Fixação biológica de nitrogênio	47
5.1.2	Solubilização de fosfato inorgânico	47
5.1.3	Produção de ácido indol acético (AIA)	48

5.1.4 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos	49
5.2 Produção enzimática	51
5.2.1 Atividade amilolítica.....	53
5.2.2 Atividade celulolítica	54
5.2.3 Atividade esterolítica	55
5.2.4 Atividade lipolítica.....	56
5.2.5 Atividade pectinolítica.....	57
5.2.6 Atividade proteolítica	59
5.3 Identificação dos isolados bacterianos endofíticos.....	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Jatropha curcas* L., popularmente conhecida como pinhão-mansão é uma planta arbustiva pertencente à família das Euforbiáceas. O gênero *Jatropha*, ao qual o pinhão-mansão pertence, possui, entre herbáceas e arbustivas, em torno de 160 espécies, das quais muitas produzem óleo e o pinhão-mansão é a espécie mais estudada (MUNCH e KIEFER, 1989).

De acordo com Heller (1996), acredita-se que esta planta seja nativa da América Central e atualmente está distribuída em todas as regiões tropicais do globo. Somente nas últimas três décadas passou a ser estudada agronomicamente (SATURNINO et al., 2005), devido a sua utilização na indústria de cosméticos; inseticidas; uso medicinal e produção de biodiesel.

No Brasil, após a criação do Programa Brasileiro de Biodiesel (PNPB) no ano de 2002 pelo governo federal (GOLDEMBERG; NIGRO; COELHO, 2008), o pinhão-mansão foi incluído como alternativa para fornecimento de matéria-prima para esse fim. Esta escolha se baseia na expectativa de que a planta possua alta produtividade de óleo, tenha baixo custo de produção por ser perene e seja resistente ao estresse hídrico, o que seria uma vantagem significativa principalmente na região semi-árida do país (BELTRÃO et al., 2008).

A bioprospecção e caracterização de linhagens microbianas estão sendo cada vez mais estudadas como forma de localizar, avaliar e explorar essa diversidade existente em determinados nichos com o objetivo de buscar recursos genéticos e bioquímicos para fins agrícolas e biotecnológicos (LACAVA e AZEVEDO, 2014). Nesse sentido, tem havido crescente interesse no estudo de micro-organismos endofíticos para avaliar a sua ocorrência, potencial de colonização e a utilização destes em processos de promoção de crescimento vegetal e controle biológico de doenças que afetam culturas agrícolas (HALLMANN et al., 1997; AMORIM e MELO 2002; SHIOMI et al., 2008; CASTRO, et al., 2014).

Micro-organismos endofíticos são aqueles que colonizam o interior das plantas sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais saudáveis como raízes, ramos, folhas, frutos e sementes e que não causam danos à planta hospedeira (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007).

Bactérias endofíticas podem beneficiar as culturas vegetais por meio de mecanismos de promoção de crescimento e algumas são capazes de apresentarem

mais de um mecanismo (AHMAD, AHMAD e KHAN, 2008). A promoção direta de crescimento vegetal por essas bactérias envolve o aumento da disponibilização de nutrientes que ocorre pela fixação biológica de nitrogênio (BODDEY e DÖBEREINER, 1995); solubilização de fosfato mineral entre outros nutrientes (FREITAS; BANERJEE; GERMIDA, 1997) e o fornecimento de substâncias como reguladores do crescimento de plantas como ácido indol acético (AIA), giberelinas, citocininas, etileno, aminoácidos (GONZALEZ-LOPEZ et al., 2005). A promoção indireta do crescimento por esse grupo de micro-organismos ocorre pela supressão de micro-organismos patogênicos na rizosfera e nos tecidos internos da planta; pela produção de β -1,3-glicanase (FRIDLENDER; INBAR; CHET, 1993), antibióticos (RAAIJMAKERS; WELLER; THOMASHOW, 1997), ácido cianídrico (OWEN E ZDOR, 2001) e sideróforos (PIDELLO, 2003). A promoção de crescimento vegetal pela diminuição da incidência de doenças pode ocorrer ainda pela inibição direta do crescimento do patógeno (OWEN e ZDOR, 2001) e pela indução de resistência sistêmica da planta (FRIDLENDER; INBAR; CHET, 1993; NANDAKUMAR et al., 2001).

O uso de enzimas é uma realidade cada vez mais presente nos diferentes setores industriais e consiste em uma alternativa importante aos processos bioquímicos convencionais. As enzimas podem ser obtidas a partir de fonte animal, vegetal e microbiana; sendo as de origem microbiana as mais utilizadas atualmente, devido ao rápido crescimento dos micro-organismos e facilidade de manipulação genética (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além disso, a produção de enzimas por micro-organismos assegura um potencial ilimitado de suprimentos e ainda possibilita a criação de novos sistemas enzimáticos, o que é mais difícil de obter-se em fontes animais e vegetais (JESUS et al., 1999; ALVES et al., 2002).

Tendo em vista o potencial econômico da cultura do pinhão-manso, o presente trabalho visou caracterização de bactérias endofíticas com potencial de promoção de crescimento vegetal e produção de enzimas de interesse biotecnológico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A cultura do pinhão-manso

A espécie *Jatropha curcas* L., popularmente conhecida como pinhão-manso, é uma planta arbustiva pertencente à família das Euforbiáceas, sua origem ainda não é bem definida. Acredita-se que a *Jatropha* seja originária da América Central, porém vegeta espontaneamente em diversas regiões do Brasil (HELLER, 1996; BELTRÃO, 2005).

De acordo com Cortesão (1956) e Peixoto (1973), sua distribuição geográfica é bastante vasta devido à sua rusticidade, resistência a pragas e a longas estiagens, se adaptando a uma gama muito variável de condições edafoclimáticas, desde o Nordeste até os estados de São Paulo e Paraná. Segundo estes autores o pinhão-manso se desenvolve bem tanto nas regiões tropicais secas como nas zonas equatoriais úmidas, assim como nos terrenos áridos e pedregosos, podendo suportar longos períodos de seca. Segundo Heller (1996), a planta está predominantemente presente em regiões onde a precipitação média anual é de 300 a 1.000 mm; no entanto, Foidl et al., (1996), relatam que a cultura do pinhão-manso pode ser encontrada em condições de precipitação média anual variando de 250 a 3.000 mm. Apesar de ser uma planta pouco exigente em relação a condições climáticas e adaptado a condições marginais de solos (degradados e pouco férteis), o pinhão-manso deve ser preferencialmente cultivado em solos profundos, bem estruturados, pouco compactados, drenados e preferencialmente, pouco argilosos (HELLER, 1996; ARRUDA et al., 2004; SATURNINO et. al., 2005). Dependendo das condições climáticas o controle mecânico de plantas daninhas é essencial (ACHTEN et al., 2010; BROUZOS, 2013). O controle de pragas é também uma prática determinante para alcançar rendimentos aceitáveis.

A planta de pinhão-manso é uma árvore pequena ou arbusto de grande porte que pode atingir uma altura de até 5m. Os ramos contêm látex, possui tronco com aproximadamente 0,20 cm de diâmetro, caule liso, de lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente, possui floema com longos canais que se estende até as raízes. Suas folhas são esparsas e brilhantes, largas e alternas, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior (CORTESÃO, 1956; BRASIL, 1985).

Normalmente, cinco raízes são formadas a partir de sementes, sendo uma central (raiz pivotante) e quatro periféricas. A vida útil da planta *J. curcas* pode chegar a mais de 50 anos (HENNING, 2009).

O fruto do pinhão-mansão é cápsular ovoide, a capsula trilocular é carnuda e amarelada, formada por um pericarpo ou casca dura e lenhosa e em cada uma das três cavidades existe uma semente preta. As sementes têm de 1,5 a 2,0 cm de comprimento e 1 a 1,3 cm de largura, apresentam teor de óleo variando entre 33 e 38 % e representam entre 53 e 79 % do peso do fruto (SATURNINO et al., 2005). Os teores podem ser de: 33% a 34% pela extração mecânica; 38% a 40% pela extração mecânica e química e 58% a 60% pela extração de óleo somente de albúmen (OLIVEIRA, 2009).

De acordo com Purcio e Drummond (1986) e Carnielli (2003), esta planta é uma excelente produtora de óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em óleo diesel. Além desta aptidão para produção de biodiesel, o pinhão-mansão, por ser perene, é uma planta de fácil cultivo, com baixos custos de produção e possível de ser cultivada economicamente em quase todas as regiões brasileiras. Acredita-se, por isso, que esta planta seja altamente promissora como fonte energética renovável sob ponto de vista econômico e social.

2.2 Potencial biotecnológico da cultura do pinhão-mansão

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa nº 4, de 14 de janeiro de 2008, autorizou a inscrição, no Registro Nacional de Cultivares, da espécie *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão), possibilitando sua exploração comercial no Brasil (ROSCOE, 2008).

Atualmente, a *J. curcas* vem sendo estudada para aplicações biotecnológicas, por exemplo, a produção de enzima por fermentação em estado-sólido (SSF), a partir de torta da semente sem óleo (MAHANTA; GUPTA; KHARE, 2008). Outra vantagem do cultivo desta planta, é que pode ser feito em solos contaminados com metais pesados, degradados ou estéreis após correção com matéria orgânica (KUMAR et al., 2008), além da sua utilização potencial no controle de pragas agrícolas (GEORGES et al., 2008). O subproduto principal da extração do óleo, a torta, é um fertilizante rico em azoto, potássio, fósforo e matéria orgânica, tendo também efeito nematicida. Quando desintoxicada pode também ser usada como

ração animal, contendo 57% de proteína. A casca dos pinhões pode ser usada como carvão vegetal e matéria-prima para papel (ÉGUIA, 2006). Frequentemente o pinhão-manso também é usado para demarcar limites (cerca viva), pois não é consumida pelos animais e apresenta grande longevidade. A sua grande tolerância à falta de água e a presença de raízes laterais perto da superfície faz com esta planta seja bastante interessante para combater a erosão de solos.

Na medicina doméstica, aplica-se o látex da planta como cicatrizante hemostático e também como purgante. As raízes são consideradas diuréticas e antileucêmicas e as folhas são utilizadas para combater doenças de pele. São eficazes também contra o reumatismo e possui poder anti-sifilítico. As sementes são utilizadas como purgativo, verificando-se casos de intoxicação em crianças e adultos quando as ingere em excesso, o que pode ser perigoso e até fatal. Atribui-se as propriedades tóxicas do pinhão a uma globulina, a curcasina e também ao ácido jatrófico, sendo sua toxicidade igual ou superior a ricinina. A ingestão de uma única semente fresca pode causar tanto vômito e diarreia (PEIXOTO, 1973). Uma possível atividade antitumoral também tem sido investigada, uma proteína denominada de curcina, purificada das sementes de *J. curcas*, pode ser utilizada como agente de destruição celular (LUO et al., 2006).

A madeira do pinhão-manso pode ser utilizada como material carburante de fornalhas, assim como as cascas dos frutos (DUKE, 1983; HELLER, 1996; GÜBITZ et al., 1999; HENNING, 2000; SWOT, 2002; ARRUDA et al., 2004; ACKOM e ERTEL, 2005; SATURNINO et al., 2005); porém, o uso mais difundido na atualidade é do óleo extraído da semente para fins combustíveis.

Com a iniciativa do Programa Brasileiro de Biodiesel, a nova orientação da agricultura energética é no sentido de produzir matérias primas para o biodiesel, ou seja, os óleos vegetais, além do álcool (ACCARINI, 2006). O biodiesel é um combustível obtido a partir de óleos vegetais ou gordura animal, os quais são submetidos a uma reação química, na presença de um catalisador e um álcool (GERPEN; KNOTHE, 2004). Os óleos vegetais destacam-se pelo fato de não possuírem enxofre, produzindo combustíveis menos agressivos ao meio ambiente. Comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas (ACCARINI, 2006). Além disso, pode reduzir em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre (SOUSA, 2006). É importante

frisar que o biodiesel pode ser usado em qualquer motor de ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação, podendo se tornar um importante produto para exportação e para a independência energética nacional, associada à geração de emprego e renda nas regiões mais carentes do Brasil.

Dentre as alternativas encontra-se o pinhão-manso é uma oleaginosa promissora como matéria-prima para a obtenção de óleo destinado à produção de biodiesel (DURÃES e LAVIOLA, 2010). Em cultivos comerciais, a produtividade média é de 5 t ha⁻¹, com a cultura estabelecida e em condições favoráveis, ou seja, com disponibilidade de água e nutrientes, e cerca de 32% deste valor pode ser convertido em óleo vegetal (aproximadamente 1600 L ha⁻¹) (TEIXEIRA, 2005). Comparativamente, no caso da mamona (*Ricinus communis*), a produtividade média, nas mesmas condições anteriormente citadas para o pinhão-manso, é de 1,5 t. ha⁻¹, podendo, aproximadamente 48% desse total ser convertido em óleo, ou seja, cerca de 720 L. ha⁻¹, embora o teor de óleo da mamona seja maior (aproximadamente 16% a mais), a produtividade do pinhão-manso, nestas condições, é de quatro a cinco vezes superiores, em toneladas por hectare, que a mamona, tornando esta cultura competitiva economicamente frente às outras oleaginosas (MIRAGAYA, 2005).

Contudo são necessários mais estudos sobre essa cultura, baseando-se na expectativa de que a planta possua alta produtividade de óleo, tenha baixo custo de produção, seja perene, e resistente ao estresse hídrico; porém, a pesquisa da cultura do pinhão-manso está apenas iniciando no Brasil (SATURNINO et al., 2005). Embora o cultivo da planta apresentar vantagens aparentes, o pinhão-manso não tem sinalizado resultado expressivo nos lugares aonde vem sendo cultivado (CASTRO; DEVIDE; ANACLETO, 2008; ALTENBURG et al., 2009). A falta de melhoramento genético aparece como barreira para a otimização da produtividade, sendo necessário fixar caracteres relacionados aos cultivares melhorados, tais como aumento da produtividade, resistência a doenças, precocidade, porte anão, etc.

2.3 Micro-organismos Endofíticos

Diversas definições de endófitos estão descritas na literatura. Originalmente o termo endófito descrito por De Bary, (1866), refere-se a qualquer micro-organismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. Outra definição, proposta por Hallmann et al., (1997), sugere que endófitos podem ser considerados micro-organismos que são isolados de tecidos vegetais desinfetados superficialmente ou do interior destes, e que não causam aparentemente danos às plantas hospedeiras. Mais recentemente, Mendes e Azevedo (2007), definiram micro-organismos endofíticos da mesma maneira como outros autores (HALLMANN et al., 1997;. AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO e ARAÚJO 2007), mas dividiu os endófitos em dois tipos, sendo: tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, como fungos micorrízicos e bactérias simbiotes fixadoras de nitrogênio.

Estes micro-organismos podem ser encontrados em diferentes órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos, raízes, frutos, sementes e flores, sendo a comunidade microbiana endofítica representada, principalmente, por diferentes espécies de fungos e bactérias (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO e ARAÚJO 2007; LACAVA e AZEVEDO, 2013). Sua penetração nos vegetais dá-se por aberturas naturais ou artificiais, tais como: estômatos, ferimentos causados por instrumentos agrícolas, microferimentos nas raízes ocasionados pelo atrito destas com as partículas do solo, etc., disseminando de maneira sistêmica ou restrita a diversas partes da planta, habitando de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e em alguns casos pode ocorrer colonização intracelular (HALLMANN et al., 1997; AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO e ARAÚJO 2007; LACAVA e AZEVEDO, 2013).

Os micro-organismos endofíticos são fontes potenciais de produtos naturais, bioativos e quimicamente novos, para a exploração na medicina, na agricultura e na indústria (STROBEL e DAISY, 2003; TEJESVI et al., 2007).

Geralmente as plantas possuem uma microbiota endofítica característica importante para sua sanidade e manutenção (AZEVEDO, 1999; AZEVEDO e ARAÚJO 2007). As bactérias endofíticas trazem muitos benefícios às plantas, como o controle biológico (VERMA et al., 2001; AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO e ARAÚJO 2007; LACAVA e AZEVEDO, 2014), feito por meio da competição de

nutrientes ou com a produção de toxinas nocivas aos patógenos (ARAÚJO et al., 2002). Além disso, elas são capazes de produzir ácido indol acético (AIA), solubilizar fosfato e realizar a fixação biológica do nitrogênio (JAMES e BALDANI, 2012; QUECINE et al., 2012; LACAVA e AZEVEDO, 2013). O potencial para a promoção de crescimento da planta, controle biológico de pragas e doenças e produção de enzimas é relatado em diversos trabalhos (LACAVA e AZEVEDO, 2013; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014; LACAVA e AZEVEDO, 2014). Na íntima relação entre endófito e planta hospedeira também pode ocorrer produção de enzimas extracelulares que podem ser purificadas para uso em diferentes indústrias (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004), dentre elas as proteases, lípases e amilases etc. Além disso, é importante conhecer a diversidade genética de bactérias endofíticas, não somente para compreender seu papel na interação com a planta hospedeira, mas também para sua aplicação biotecnológica (DI CELLO et al., 1997).

2.4 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas

A utilização de micro-organismos promotores de crescimento vegetal é uma das alternativas para a agricultura moderna enfrentar o desafio de promover o aumento da produção de culturas gerando sustentabilidade; (LUZ et al., 2006). Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) estimulam o crescimento da planta por meio de efeitos biofertilizantes e bioestimulantes, aumentam a resistência a doenças, melhoram a habilidade da planta de resistir aos estresses (STURZ e NOWAK, 2000; QUECINE et al., 2012; LACAVA e AZEVEDO 2014; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014).

Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal podem estimular o crescimento das plantas por meio de mecanismos diretos como produção de substâncias ou metabólitos análogos a hormônios vegetais, como giberelinas, auxinas e citocininas (BUCHENAUER, 1998; CATTELAN e HARTEL, 2000; QUECINE et al., 2012; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014) e por mecanismos indiretos; como antagonismo contra fitopatógenos pela produção de moléculas bioativas produzido pelo micro-organismos antagônico (AZEVEDO et al., 2000; PEIXOTO NETO et. al., 2003; LACAVA e AZEVEDO 2014; GRIFFIN et al., 2014).

O conhecimento dos hormônios promotores de crescimento vegetal é de extrema importância, pois favorecem o crescimento ou alteram mecanismos fisiológicos da planta hospedeira, beneficiando a colonização desta por alguns micro-organismos em detrimento de outros (QUECINE et al., 2012; LACAVA e AZEVEDO, 2013; MUNEEES e KIBRET, 2014).

O estudo dessas interações, micro-organismos-planta, permite a exploração para o aumento na produtividade agrícola e industrial, além de um melhor entendimento da ecologia microbiana e ambiental (OLIVEIRA, 2009).

Bactérias endofíticas já foram isoladas a partir de diversas espécies de plantas (QUECINE et al., 2012; SILVA et al., 2012; BOTTA et al., 2013; JI; GURURANI; CHUN, 2014); em alguns casos, eles podem estimular o crescimento do hospedeiro por meio de diversos mecanismos, incluindo o controle biológico, a indução de resistência sistêmica à fitopatógenos, fixação biológica de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento e aumento de nutrientes minerais ou captação água (RYAN et al., 2008; AZEVEDO e ARAÚJO , 2007; VENDAN et al., 2010).

2.4.1 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio, depois do C, H e O é o elemento mais demandado pelos vegetais, sendo o elemento mais abundante do planeta e, em sua forma molecular (N_2) constitui quatro quintos da atmosfera terrestre (NELSON; COX, 2002), é utilizado na síntese de proteínas vegetal e ácidos nucleicos, incluindo DNA. No entanto, a maior fonte de nitrogênio na natureza, o nitrogênio atmosférico, não é assimilável por grande parte dos seres vivos (CHUBATSU et al., 2012; JI; GURURANI; CHUN, 2014).

O nitrogênio é o elemento mineral que as plantas exigem em maiores quantidades, sendo indispensável à vida, uma vez que participam na constituição de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas (TAIZ e ZEIGER, 2009). A atmosfera é a mais importante fonte de nitrogênio, onde cerca 78% do ar atmosférico são constituídos por nitrogênio livre na forma de gás, porém a maioria dos seres vivos é incapaz de aproveitá-lo no seu metabolismo na forma atmosférica (N_2) (MARENCO e LOPES, 2011). As principais fontes de nitrogênio no solo para a planta são: os materiais de origem vegetal e animal (matéria orgânica), fertilizantes industriais, sais

de amônio e nitrato trazidos da atmosfera pelas chuvas e fixação biológica de nitrogênio (TAIZ e ZEIGER, 2004; MUNEES e KIBRET, 2014).

Na natureza, somente um pequeno número de micro-organismos, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, são capazes de reduzir nitrogênio atmosférico a amônia. O processo biológico responsável pela redução do nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3) é denominado de fixação biológica de nitrogênio (FBN), (EADY e POSTGATE, 1974; FRANCHE et al., 2009). Essa reação é catalisada por uma enzima denominada enzima nitrogenase que é encontrada em todos os organismos diazotróficos. As bactérias fixadoras de nitrogênio conseguem quebrar a tripla ligação do N_2 , por meio da adição de um complexo enzimático denominado dinitrogenase (MORGANTE, 2003). Deste modo, são incorporados íons H^+ abundantes nas células das bactérias a esta amônia, ocorrendo à transformação em íons NH_4^+ , que serão distribuídos para a planta e incorporados na forma de nitrogênio orgânico (HUNGRIA et al., 1997).

A utilização das bactérias diazotróficas pode representar uma grande estratégia para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos, e pode suprir parcialmente as necessidades de N requeridas por diversas culturas, reduzindo, dessa forma, o uso de fertilizantes nitrogenados com diminuição de custos para o produtor e a reduzir a poluição ambiental (CONCEIÇÃO et al., 2009; MOREIRA et al., 2010).

2.4.2 Solubilização de fosfato

O fósforo é um elemento essencial para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas, pois melhora todo o sistema radicular e, conseqüentemente a parte aérea (GONÇALVES et al., 2000). Os solos são ricos em fósforo, tanto nas formas orgânicas como inorgânicas (RANNO; SILVA; MALLMANN, 2007; MARTINAZZO et al., 2007; RHEINHEIMER et al., 2008; MUNEES e KIBRET, 2014), porém, apenas uma pequena parte encontra-se disponível às plantas. A utilização de processos biológicos está entre as possíveis medidas para evitar a deficiência nutricional de fósforo está utilização de processos microbiológicos para aperfeiçoar o aproveitamento do fosfato, cuja maior reserva mineral ocorre nas rochas, ou na forma não disponível para as plantas (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; LACAVA e AZEVEDO, 2013; QUECINE et al., 2014).

As bactérias solubilizadoras de fosfato participam do ciclo do fósforo facilitando a conversão de formas insolúveis para solúveis (GUPTA; PANWAR; JHA, 2013; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014), tornando-o disponível para a planta (GYANESHWAR et al., 2002). Nesse sentido, a utilização de micro-organismos solubilizadores de fósforo é uma alternativa viável ao uso da adubação convencional para o melhor aproveitamento do fósforo já existente no solo (SILVA FILHO; VIDOR, 2001; QUECINE et al., 2012; LACAVA e AZEVEDO 2013; MUNEES e KIBRET, 2014; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014).

2.4.3 Produção de ácido indol acético

O termo regulador de crescimento é normalmente empregado para compostos naturais (fitohormônio e substâncias naturais de crescimento) ou sintéticos (hormônio sintético e regulador sintético) que exibem atividade no controle do crescimento e desenvolvimento da planta (CASTRO; SANTOS; STIPP, 2012).

Os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico) são substâncias orgânicas que desempenham funções na regulação do crescimento em plantas (TAIZ e ZEIGER, 2009). Bactérias endofíticas são capazes de produzir metabólitos secundários, que possuem substâncias capazes de promover o desenvolvimento das plantas. Dentre estes metabólitos secundários, destaca-se a produção de fitohormônios, como auxinas, citocinas e giberelinas (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009; BRADER et al., 2012).

As auxinas, do grego 'crescer', são uma classe de fitohormônios capazes de afetar o crescimento vegetal e, podem ser produzidos por plantas em ápices foliares, meristemas, frutos e sementes em desenvolvimento, (TAIZ e ZAIGER, 2009), bactérias (BAREA et al., 1976) e fungos (DVORNIKOVA; AKRIABIN; SUVOROV, 1970). A principal auxina encontrada em baixas concentrações nas plantas é o ácido indol acético, conhecido pela sigla AIA. O principal efeito das auxinas é a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento (KRIKORIAN, 1991). Entretanto, altas concentrações de hormônios podem causar a inibição da alongação celular afetando o desenvolvimento das raízes em algumas culturas (BROEK et al., 1999).

A habilidade de sintetizar auxinas é amplamente distribuída entre bactérias associadas com plantas (KOCHAR; UPADHYAY; SRIVASTAVA, 2011; LÓPEZ-VALDEZ et al., 2011; BATISTA, 2012; ETESAMI; ALIKHANI; HOSSEINI, 2015). A produção microbiana de ácido indol acético (AIA), principal é em muitos casos, dependente do aminoácido triptofano e realizada sob diversas vias biossintéticas (Patten e Glick et al., 1996)

Diversos gêneros de bactérias associadas às plantas produtoras de AIA isoladas endofiticamente e relacionadas ao estímulo de crescimento vegetal têm sido descritas pertencentes aos seguintes gêneros: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Xanthomonas* podendo promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios (QUECINE, BATISTA, LACAVA, 2014; LACAVA e AZEVEDO, 2013; CASTILLO et al., 2015).

2.4.4 Controle biológico de fitopatógenos por bactérias endofíticas

O controle natural e biológico de pragas e doenças que afetam plantas cultivadas ganhou muita atenção nas últimas décadas como uma forma de reduzir o uso de agrotóxicos na agricultura. O biocontrole tem sido frequentemente utilizado em países tropicais, como o Brasil, e é apoiada pelo desenvolvimento de pesquisa básica e aplicada local. Neste contexto, os endófitos tropicais têm atraído uma atenção especial para desenvolver suas funções para o controle de doenças de insetos pragas e de plantas (LACAVA e AZEVEDO, 2014). A utilização de micro-organismos com ação de biocontrole e/ou promoção de crescimento vem sendo apontada como alternativa viável para sistemas de produção agrícolas ecológica e economicamente sustentáveis (COMPANT et al., 2005; SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2009).

Os micro-organismos endofíticos colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, o que permite seu uso como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997; AZEVEDO et al., 2000). Esse controle biológico pode ocorrer principalmente devido a atuação direta sobre o patógeno no interior da planta hospedeira, por antagonismo, e/ou por competição por nutrientes (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007; LACAVA e AZEVEDO 2014; ARAÚJO et al., 2014).

Geralmente, bactérias e fungos endofíticos desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta ao meio. Embora, possam ser confundidos com patógenos latentes, estudos têm demonstrado que, em muitos casos, existe uma importante interação simbiótica com o hospedeiro, a qual envolve a produção de compostos que diminuam a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou conferem resistência a fitopatógenos, além da produção de fitoreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal. Por sua vez, os endófitos encontram na planta um habitat com nutrientes e com menor competição com outros micro-organismos (AZEVEDO et al., 2000; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004; AZEVEDO e ARAÚJO 2007; LACAVA e AZEVEDO 2014).

A capacidade de sobreviver dentro do vegetal é uma vantagem para os micro-organismos endofíticos, já que não estão expostos as adversidades ambientais e encontram pouca ou nenhuma competição, tornando-os candidatos a testes para controle biológico (MISAGHI e DONNDELINGER, 1990; AZEVEDO et al., 2000).

Com o acúmulo de informações a respeito da interação planta-endófitos, tem sido dada uma atenção especial ao estudo de micro-organismos endofíticos como agentes de controle biológico de inúmeras doenças e pragas (HALLMANN et al., 1997; M'PIGA et al., 1997; AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO e ARAÚJO 2007; LACAVA e AZEVEDO 2014).

Muitos processos biológicos ocorrem no campo da fisiologia, bioquímica e microbiologia, que tem potencial para dar as condições biotecnológicas no controle de doenças agrícolas (PINOTTI e SANTOS, 2013). A ação de micro-organismos endofíticos com potencial de biocontrole pode ser direta ou indireta. A ação direta destaca a interação entre o agente de biocontrole e o agente fitopatogênico, tal como a inibição do agente fitopatogênico. O biocontrole pode ser classificado em quatro categorias: (1) antibiose, (2) competição por espaço e nutrientes, (3) parasitismo, e (4) de indução de resistência sistêmica (HANDELSMAN e STABB, 1996). A ação indireta de biocontrole pode ser a simples ocupação de espaço por um endófito no interior de uma planta hospedeira que impede que um fitopatógeno se estabeleça (GRIFFIN, 2014).

O biocontrole por antibiose se dá por meio da produção de antibióticos por estes micro-organismos endófitos, mas também se aplica a qualquer composto metabolizado capaz de matar, inibir o crescimento ou a reprodução de micro-

organismos fitopatogênicos: tais como a produção de enzimas que degradam a parede celular destes fitopatógenos (GRIFFIN, 2014).

Normalmente, o mecanismo mais importante de controle biológico de doenças é por meio da indução de resistência sistêmica (IRS). Neste tipo de controle, a penetração ativa do micro-organismo endofítico induz a planta hospedeira a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno ou alteram a morfologia vegetal. Estas alterações morfológicas e fisiológicas podem incluir aumento da parede celular por deposição de lignina e glucanas e aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas, dificultando a entrada do patógeno e o seu desenvolvimento na planta hospedeira (PEIXOTO NETO et al., 2003).

Diferentes linhagens de bactérias endofíticas, pertencentes a diferentes filos do domínio Bactéria, apresentam atividade antagonista contra diferentes organismos fitopatogênicos e por isso representam importante e inexplorada fonte de agentes para biocontrole e manejo integrado de doenças e pragas agrícolas (SESSITSCH; REITER; BERG, 2004; BERG et al., 2005; INIGUEZ et al., 2005; SCHULZ e BOYLE, 2005; CAZORLA et al., 2007; LIU et al., 2007; ASSUMPÇÃO et al., 2009). Várias espécies de *Bacillus* são antagonistas de fungos fitopatogênicos podendo ser usadas em programas de controle biológico (ANGONESE et al., 2009; SCHISLER et al., 2004; WILHELM et al., 1998, WULFF et al., 2002).

Estudos com o intuito de avaliar a atividade biológica de micro-organismos endofíticos, a fim de se obter novos compostos bioativos vêm sendo conduzidos e resultados muito promissores têm sido alcançados; principalmente com potencial para o biocontrole de microrganismos fitopatogênicos (WIJEINGUE et al., 2010; SANCHEZ e REBOLLEDO, 2010; ROSA et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2013; LAVACA e AZEVEDO, 2013; LACAVA e AZEVEDO, 2014).

2.5 Fungos fitopatogênicos

Micro-organismos, tais como fungos, bactérias e vírus são responsáveis por ocasionarem doenças em plantas. (PERNEZNY et al., 2014). Os micro-organismos fitopatogênicos normalmente interagem com o hospedeiro, invadindo seus tecidos, gerando o processo infeccioso, e ao colonizar a planta, retiram desta todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (BATISTA et al., 2007).

Fungos fitopatogênicos, em especial, são responsáveis por perdas consideráveis em culturas economicamente importantes, cerca de 85% das doenças das plantas são causadas por fungos, ocasionando sérias doenças e, dependendo do fitopatógeno, ocasionam lesões nos órgãos de reserva (frutos, sementes, etc.), no caule, nas raízes, no sistema vascular (xilema), tombamento de plântulas ou plantas bem desenvolvidas, podendo levar as plantas a morte (PERNEZNY et al., 2014). Essas doenças propiciam queda de produção e, conseqüentemente, prejuízos financeiros para os produtores (BUENO e FISHER, 2006), além de estar associados à indução do apodrecimento de frutas e verduras pós-colheita, diminuindo o conteúdo nutricional e aproveitamento destes alimentos (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 2014).

Os fungos fitopatogênicos são identificados, em sua maioria, pelos sintomas que provocam e pelos sinais presentes no hospedeiro, que são facilmente observados em campo, tais como manchas foliares, podridões, ramos secos, exsudações, entre outros (BATISTA et al., 2007).

Entre as principais doenças causadas por fungos que podem causar prejuízos à cultura de pinhão-mansão destacam-se o agente etiológico *Oidium* sp., responsável por formar uma cobertura branca nas folhas, caule, flores e frutos e, também, ocasionar a seca do broto terminal da muda; *Colletotrichum gloeosporioides*, que causa a mancha das folhas; *Phakopsora jatrophiicola*, agente da ferrugem das folhas; e *Alternaria* sp. que provoca a queda prematura de folhas (DIAS et al., 2007). Em estudos realizados por Neves e Pereira (2009), foram encontrados os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Alternaria*, *Rhizoctonia* e *Penicillium* associados a sementes de *J. curcas*.

Nas análises de sementes de pinhão-mansão avaliadas por Kobayashi et al., (2011), foram detectados: *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, além das espécies de *Fusarium* sp. Já Gaviria e Bedoya (2008)

relatam a presença de *Fusarium* sp e *Rhizoctonia* sp. em frutos, ramos e folhas de pinhão-mansão cultivadas na Colômbia.

A associação de fitopatógenos com sementes pode afetar, de forma severa, a qualidade fisiológica e sanitária dessas. Muitos desses fungos afetam a germinação das sementes e podem ser transmitidos à progênie resultante, podendo se estabelecer no campo de cultivo e causar redução na qualidade e produtividade das Culturas (JULIATTI; BIANCO JUNIOR; MARTINS, 2011; JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 2014).

Alternaria alternata é o fungo fitopatógeno causador da mancha marrom de alternária (MMA) uma doença que provoca prejuízos na agricultura em várias culturas de interesse comercial. Segundo Kobayashi et al., (2011), é alta incidência a de *A. alternata* em sementes de pinhão-mansão, portanto, potencial para provocar processos de interferência fisiológica na planta. A ocorrência da associação de sementes de pinhão-mansão com *A. alternata* pode produzir grandes prejuízos, pelo fato de causar infecções em sementes e ser por elas transmitido (NEERGAARD 1977). Além disto, este fungo causa redução na germinação e tombamento de plântulas (ROTEM, 1995), manchas foliares e queda prematura de folhas, na cultura do pinhão-mansão (FRANCO e GABRIEL, 2008). Outras espécies vegetais cultivadas também são consideradas hospedeiras de *A. alternata* como soja (BAIRD et al., 1997), algodoeiro (PIZZINATTO et al., 2005), girassol (SALUSTIANO et al., 2005), feijão (MORAES e MENTEN, 2006), cenoura (PULZ e MASSOLA JR., 2009); oliveira (TÖFOLI et al., 2013) batata (VASCONCELOS; SILVA; CARVALHO, 2014). Nos pomares de tangerinas e híbridos das principais regiões produtoras do Brasil, a mancha marrom de alternaria sido considerada a mais séria doença fúngica. Devido seu alto grau de severidade regiões de clima úmido, que faz com que o controle seja muito difícil, ocasionou o abandono de plantios comerciais de variedades de tangerinas e híbridos altamente suscetíveis (PERES; AGOSTINI; TIMMER, 2003).

Ceratocystis paradoxa é o fungo fitopatógeno causador da podridão negra do abacaxi. O agente etiológico da podridão negra é o fungo *Chalara* (*Thielaviopsis*) *paradoxa* (De Seynes) Hoehn, cuja forma teleomórfica corresponde a *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau. (SANTOS et al., 2012). É considerado um patógeno agressivo e de difícil controle, cujo sintoma característico é o progressivo escurecimento e apodrecimento da casca e da polpa do abacaxi, inviabilizando a comercialização dos frutos, principalmente para locais distantes (FERRARI, 2009). É

uma doença pós-colheita responsável por elevadas perdas, principalmente em frutos destinados à indústria, devido ao tempo decorrido entre a colheita e o processamento (MATOS, 2005). A podridão do abacaxi também é uma doença economicamente importante em cana-de-açúcar, afetando seriamente a brotação das gemas, o desenvolvimento e o vigor dos brotos. Áreas problemáticas apresentam muitas falhas, ficando com aspecto irregular. Estas falhas podem abranger grandes extensões, exigindo em alguns casos o replantio. (CHAPOLA, 2010).

Fusarium proliferatum e *F. verticillioides* são fungos que ocasionam doenças em plântulas, raiz, colmo, espiga e em grãos de milho (AGRIOS, 2005). A doença causada pelos dois fitopatógenos apresenta os mesmos sintomas, que compreendem alteração da cor da medula passando por várias mudanças de descoloração esbranquiçada, rosa claro a salmão até tornar-se marrom. Em estádios mais avançados acontece perda da integridade do colmo formando-se cavidades no interior da medula, podendo ocorrer amadurecimento prematuro e quebra do colmo da planta (PEREIRA; CARVALHO; CAMARGO, 2005; SHURTLEFF, 1980). As espécies de *Fusarium* são comumente associadas a sementes de diversas culturas, ocasionando perda de germinação e vigor, e auxiliando, também, no complexo de patógenos que causam tombamento em plantas. Em estudos realizados por Melo et al. (2007) e Mira e Sierra (2008), foram constatada a presença de *Fusarium* sp, em sementes de pinhão-manso de diferentes procedências. Também já foi relatada a presença de *Fusarium* sp., associada à podridão seca dos ramos: pequenos ramos com folhas jovens nas pontas secam e quebram facilmente (PADILHA e MONTERROSO 1999).

F. verticillioides é descrita como hospedeira em milho (RAMOS, D. et al., 2014), porém já foi encontrado associado à podridão de raízes e sementes de pinhão-manso. (SHARMA et al., 2001; GOUR, 2006; KOBAYASTI et al., 2011)

2.6 Produção de enzimas por bactérias endofíticas

As enzimas são em sua maioria proteínas, produzidas por todos os organismos vivos, atuando como catalisadoras de reações químicas de forma seletiva como parte do processo essencial da vida, tais como digestão, respiração, metabolismo e manutenção de tecidos. Em outras palavras, são catalisadores biológicos altamente específicos sendo fundamentais para qualquer processo bioquímico (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011; NELSON e COX, 2014).

Os micro-organismos endofíticos são considerados um reservatório para novos metabolitos secundários, apresentando grande potencial para a exploração médica, industrial e agrícola, (STROBEL, 2003; LACAVA e AZEVEDO, 2013).

As enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, no entanto as enzimas de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, médica e agrícola, devido à facilidade de produção em larga escala. São também mais facilmente expressas (clonadas) em organismos de cultivo já estabelecido e não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento (GANDHI, 1997; SENA et al., 2006; COLEN, 2006). Na verdade, as enzimas de origem microbiana têm elevado interesse biotecnológico, tais como processamento de alimentos, fabricação de detergentes, têxteis e produtos farmacêuticos, terapia médica e biologia molecular (CARRIM et al., 2006; FALCH, 1991; PILNIK e ROMBOUITS, 1985; RAO et al., 1998).

Os micro-organismos transportam nutrientes por meio da membrana plasmática como compostos de baixa massa molecular. Para tal, eles secretam exoenzimas, as quais hidrolisam as macromoléculas até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana (PUTZKE e PUTZKE, 2002). Entre estas enzimas encontram-se as amilases, pectinases, xilanases, celulasas e proteases, importantes para diversos processos com promissoras aplicações industriais. Enzimas de micro-organismos endofíticos já foram estudadas, incluindo alguns com potencial aplicação na indústria, como as amilases (STAMFORD et al., 2001; STAMFORD et al., 2002), proteases (REDDY et al., 1996) e outros.

A utilização de enzimas tais como amilases, lipases, proteases, celulasas, dentre outras, é bastante ampla nas indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica, têxtil e no tratamento de resíduos (CHANDRASEKARAN, 1997). Assim sendo,

estudos com enzimas vem crescendo e moléculas com maior eficiência têm sido obtidas principalmente de micro-organismos (CASTRO et al., 2014). Zinniel et al., (2002), sugeriram que as bactérias endofíticas poderão ser utilizadas, como produtoras de enzimas degradativas, para controlar certas doenças de plantas ou decompor produtos úteis.

Como exemplo nas células vegetais, o amido é um polissacarídeo de reserva energética e muitos micro-organismos produzem amilases, que degradam esse polímero em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas celulares (PASCHOLATI, 1995). Sua aplicação industrial pode servir como aditivos em detergentes, na sacarificação de amido e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil. Assim, a busca de micro-organismos amilolíticos se justifica pelo amplo espectro de utilização de amilases em várias áreas industriais.

As lípases e esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídeos. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de micro-organismos (REED, 1975). As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas (JAEGER e EGGERT, 2002).

As principais aplicações envolvem a produção de detergentes, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produtos farmacêuticos, produção de agroquímicos, pesticidas e inseticidas (JAEGER et al., 1997). Espécies de *Bacillus* e uma variedade de gêneros tais como *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, têm se destacado na produção de lípases (SHARMA et al., 2001).

As proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas e participam em inúmeros processos fisiológicos com várias aplicações nas indústrias de detergente e de alimentos. Com intuito de diminuir a quantidade de poluentes relacionados ao tratamento de couro, a utilização de proteases se apresenta como uma saída “ambiental” na substituição da utilização de compostos tóxicos e poluentes (RAO et al., 1998). As proteases originadas de micro-organismos têm gerado maior interesse pelas indústrias, uma vez que, seu processamento pode ser realizado em grande escala no laboratório.

Considerando que o sucesso da descoberta de novos produtos consiste, principalmente, em obter e descrever novos micro-organismos torna-se imprescindível sua busca em ambientes e condições ainda pouco explorados (AZEVEDO, 1998).

Vários trabalhos descrevem bactérias endofíticas com potencial biotecnológico para a produção de enzimas isoladas de abacate (PRASAD e DAGAR, 2014); arroz (MEHDIPOUR-MOGHADDAM et al., 2010); dendê (DJAFAR; PURWADARIA; SINURAT, 2010); guaraná (TSUI, 2012; BONATELLI, 2012); jacarandá (CARRIM et al., 2006); manga (KANNAN; DAMODARAN; UMAMAHESWARI, 2015); mangue (CASTRO et al. 2014); morango (DIAS et al., 2009); plantas medicinais (JALGAONWALA e MAHAJAN, 2011; EL-DEEB; FAYEZ; GHERBAWY, 2013); pimenta (AMARESAN; JAYAKUMAR; THAJUDDIN, 2014); soja (HUNG e ANNAPURNA. 2004; ASSUMPÇÃO et al., 2009); tomate (MINOTTO et al., 2014). Dentre as enzimas líticas produzidas por micro-organismos endofíticos, destacam-se as quitinases, as β -1,3-glucanases, as celulases, lipases e proteases que são capazes de degradar constituintes das paredes de fungos fitopatogênicos (BARRAQUIO et al., 1997; CHIN-A-WOENG et al., 2003; STROBEL e DAISY, 2003).

2.7 Estudos da diversidade genética microbiana

2.7.1 Análise do gene 16S rDNA para estudos de diversidade em comunidades bacterianas

Os micro-organismos possuem uma enorme variabilidade genética que ocorreu durante a sua evolução, o que lhes confere a capacidade de adaptação a diversos ambientes. Porém, algumas regiões do seu genoma foram mantidas conservadas, permitindo seu estudo taxonômico por meio de técnicas moleculares (SEGHERS et al., 2003). Baseados na sequência dos genes ribossomais, Woese et al., (1990), sugeriram uma nova classificação dos seres vivos, até então classificados em cinco reinos (WHITAKER, 1969). Em procariontes, o gene mais analisado é o 16S rDNA (AMANN; LUDWING; SCHLEIFER, 1995), fundamental para o estudo molecular de bactérias e arqueias, onde é considerado como cronômetro evolutivo (ROSADO et al., 1997). Este gene apresenta poucas variações

nas diferentes espécies ao longo dos seus quase 1,4 Kb. É geneticamente estável e apresenta um tamanho suficiente para análises filogenéticas (SEGHERS et al., 2003). O sequenciamento do gene 16S rDNA pode permitir a identificação de microorganismos ao nível de gênero e também ao nível de espécie, e ainda possibilita fazer correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEY et al., 2000). Com sua análise é possível ainda inferir a relação evolutiva entre espécies de bactérias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar molecularmente e caracterizar bioquimicamente bactérias endofíticas isoladas da cultura do pinhão-mansão com potencial biotecnológico para promoção de crescimento vegetal e produção de enzimas. Para isso, os objetivos específicos do trabalho foram:

3.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterização bioquímica *in vitro* dos isolados bacterianos endofíticos quanto à fixação biológica de nitrogênio, síntese de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato;
- 2) Verificar a atividade antagonista *in vitro* dos isolados bacterianos contra os fungos fitopatogênicos: *Alternaria alternata*, *Ceratocystes paradoxa*, *Fusarium proliferatum* e *F.verticillioides*;
- 3) Analisar a atividades enzimáticas dos isolados bacterianos quanto à produção de: amilase, celulase, esterase, lipase, pectinase e protease;
- 4) Identificação dos isolados bacterianos por meio da técnica de sequenciamento do gene 16S rDNA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados bacterianos endofíticos

Foram utilizados setenta e dois isolados bacterianos da Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Morfologia e Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar; isolados endofiticamente da cultura de pinhão-manso de acordo com Araújo et al., (2014).

4.2 Promoção de crescimento vegetal

4.2.1 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A capacidade dos isolados em realizar o processo de FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro*. O meio de cultura NFb, livre de nitrogênio, foi preparado contendo a seguinte composição em g.L⁻¹: ácido málico, 5; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,2; NaCl, 0,1; CaCl₂.2H₂O, 0,02; KOH, 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4; e solução vitaminas, 1; pH 6,5 (DÖBEREINER et al., 1995). Foram utilizados tubos de ensaio de 20 x 70 mm, contendo 7 mL de meio de cultura NFb semi-sólido, onde as linhagens foram inoculadas com alça de platina, a partir de culturas crescidas em meio NFb semi-sólido, foram realizadas três repetições para cada isolado (QUECINE et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014). A incubação foi realizada por 96 horas a 28°C. Após esse período foi verificada a formação de película de crescimento próximo à superfície dos tubos. Esse procedimento foi realizado mais uma vez. A reinoculação sucessiva das linhagens é realizada para confirmar se o crescimento não está ocorrendo à custa de reservas de nitrogênio das células, bem como para verificar a estabilidade dessa característica das linhagens (CATTELAN, 1999). Como controle positivo foi utilizado a linhagem bacteriana do gênero *Burkholderia* sp.(BATISTA, 2012).

4.2.2 Solubilização de fosfato inorgânico

Para a análise da capacidade de solubilizar fosfato setenta e dois isolados bacterianos foram inoculados, em quadruplicada, em meio de cultura sólido contendo: 10 g.L⁻¹ de glicose; 5 g.L⁻¹ de NH₄Cl; 1 g.L⁻¹ de NaCl; 1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,8 g.L⁻¹ de CaHPO₄; 15 g.L⁻¹ de ágar; pH 7,2 a 28°C por 120 horas. A presença de halo incolor ao redor das colônias indicou a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico. Para fins semi-quantitativos, foram medidos os diâmetros dos halos claros formados ao redor de cada colônia (Dh), com auxílio de um paquímetro, e os diâmetros das colônias correspondentes (Dc). Com os dados, pôde-se calcular a razão: (Dh) / (Dc). De modo que linhagens que solubilizam mais fosfato, obtêm maiores razões e, portanto, apresentam maiores Índices de Solubilização de Fosfato (ISF) (BERRAQUERO et al., 1976). De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), a solubilização pode ser classificada como baixa (ISF<2), média (2<ISF<3) e alta (ISF>3).

4.2.3 Produção de ácido indol acético (AIA)

Para a detecção e quantificação da produção de AIA, utilizou-se a metodologia originalmente proposta por Bric et al., (1991), que foi adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2003). Os 72 isolados bacterianos foram cultivados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio tripticaseína de soja (TSB) 10% + L-triptofano (5mM) e incubadas a 28°C no escuro por 72 horas, sob agitação constante. Após este período coletou-se 2 ml da suspensão bacteriana, centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 g e 900 µL do sobrenadante foi coletado e colocados em cubetas de 1,5 ml e adicionados 400 µL do Reagente de Salkowski (2mL de FeCl₃ (0,5 mol L⁻¹) e 98 mL de HClO₄ (35%)). Após 30 minutos de incubação a 28°C foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm de absorbância. Como controle negativo utilizou-se apenas o meio de cultura TSB 10% com L-triptofano (5mM) acrescido do Reagente de Salkowski.

As leituras foram normalizadas por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas seguintes concentrações: 1, 5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL⁻¹. A coloração rosa-avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.4 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos

Para analisar antagonismos dos isolados bacterianos endofíticos contra fungos fitopatógenos foram realizados testes de antagonismo *in vitro*. Os fungos fitopatogênicos utilizados nos ensaios foram: *Alternaria alternata*; *Ceratocystes paradoxa*; *Fusarium proliferatum* e *F. verticillioides*. As linhagens fitopatogênicas foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Carolina Quecine e Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, do Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – ESALQ/USP. Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à capacidade antagonista a diferentes gêneros de fungos fitopatogênicos pelo método da cultura pareada (MARIANO, 1993; ASSUMPÇÃO et al., 2009; SILVA, 2015). Para isso, primeiramente foi realizada uma seleção massal, onde os isolados bacterianos foram repicados em forma de estrias em quatro pontos equidistantes nas extremidades das placas contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA) (figura 1) e incubadas a 28°C. Depois de 24 horas, discos de meio BDA, com as estruturas dos fungos fitopatogênicos medindo 0,5 cm de diâmetro foram depositadas no centro de cada placa. As placas foram incubadas novamente a 28°C por até 96 horas. Uma placa contendo apenas um disco com micélio do fitopatógeno no centro serviu de parâmetro para indicar o momento de avaliar a inibição (momento em que o fungo atingiu as extremidades da placa), realizada por meio de análise visual e em apenas uma repetição por isolado.

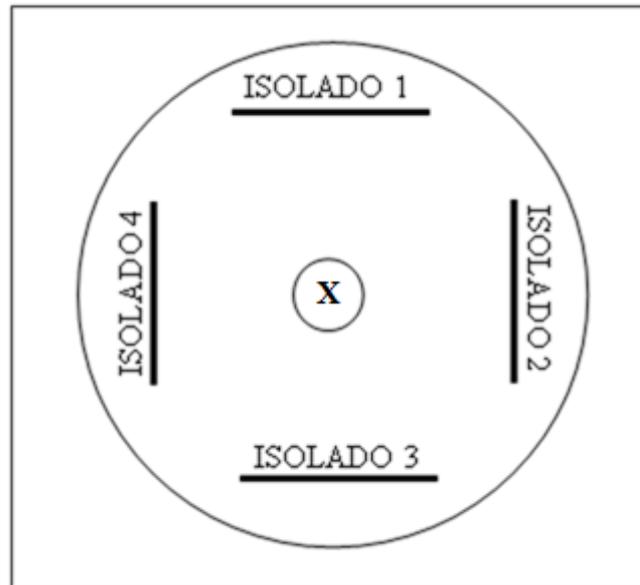


Figura 1. Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a metodologia para avaliação massal de antagonismo *in vitro* dos isolados bacterianos endofíticos do pinhão-mansão em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado 1, 2, 3, e 4 representam os isolados bacterianos e o disco com letra "X" no centro da placa Petri representa o fungo testado.

4.2.4.1 Técnica de pareamento direto *in vitro*

Para a realização deste ensaio, discos contendo cerca de 0,5 cm de diâmetro cortados de placas de Petri contendo os fungos fitopatogênicos já cultivados em meio BDA foram colocados em um dos lados de uma outra placa de Petri e, do outro lado (figura 2), os isolados bacterianos endofíticos selecionados na primeira etapa (Item 4.2.4) foram inoculados com o auxílio de um palito descartável e esterilizado, de acordo com o Método da cultura pareada ou Pareamento (MARIANO, 1993). A presença de um halo de inibição no crescimento do fungo indica isolados com atividade antagônica. A avaliação do experimento foi realizada quando o controle (placa contendo apenas o disco fúngico) apresentou o crescimento de uma extremidade a outra da placa de Petri. As placas foram incubadas por 3 a 7 dias a temperatura de 28°C, sendo o teste realizado em triplicata.

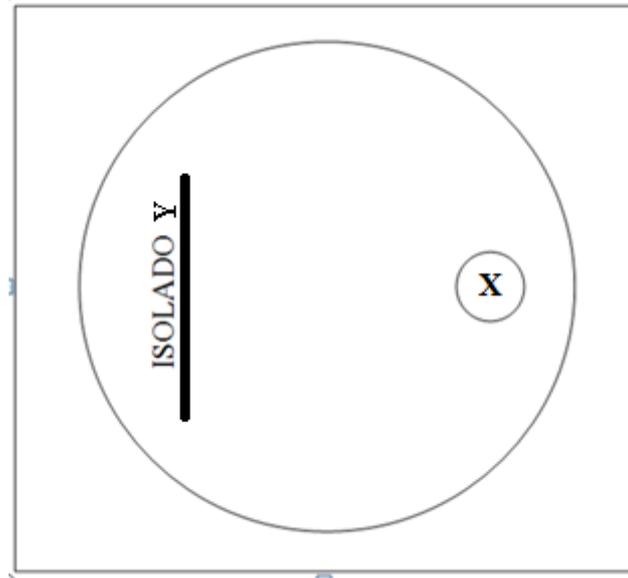


Figura 2. Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a metodologia para avaliação massal de antagonismo *in vitro* dos isolados bacterianos endofíticos do pinhão-mansão em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado “Y” representa o isolado bacteriano selecionado na etapa anterior (Figura 1) e o disco com letra “X” na outra extremidade da placa Petri representa o fungo testado.

Os isolados bacterianos que produziram bons resultados, ou seja, conseguiram inibir o crescimento do patógeno com formação de um halo entre os isolados e o micélio do fungo, foram novamente testados com os fitopatógenos, em um ensaio individual semiquantitativo.

As culturas bacterianas foram novamente repicadas em meio TSA após 48 horas de incubação a 28° C foram transferidas para 5 ml de água deionizada autoclavada, e a absorbância (550 nm) das culturas foi medida para que o ensaio fosse realizado com aproximadamente 10^8 células bacterianas/ml. Em uma extremidade da placa foram inoculados 10 μ l da solução bacteriana e, no mesmo dia, no centro da placa de Petri foi inoculado um disco de 0,5 cm de diâmetro do patógeno. As placas foram incubadas de 5 a 7 dias a temperatura de 28° C, em triplicata.

4.3 Produção de enzimas

A atividade enzimática dos isolados bacterianos foram avaliados qualitativa e semi-quantitativamente (ARAÚJO et al., 20014). Inicialmente, os isolados foram crescidos em meio tripticaseína de soja (TSB) e em seguida semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura específico para cada enzima, após o crescimento microbiano foi observado a presença ou ausência de determinada atividade enzimática, por meio de formação de halo em torno da colônia. Para análise semi-quantitativa, as colônias em placas de Petri foram suspensas em tubo cônico, tipo falcon, contendo água destilada esterilizada e eluídas na mesma densidade óptica (D.O), sendo 550 nm = 0,1 (aproximadamente 10^8 UFC). Dessa solução, foram inoculados 10 μ L na placa contendo o meio de cultura específico. Os isolados bacterianos foram analisados quanto a sua capacidade de produzir as enzimas amilases; celulasas; lípases, esterases; proteases e pectinases (pectato li ases e poligalacturonase) (ARAÚJO et al., 2014).

4.3.1 Atividade amilolítica

Os isolados foram cultivados em meio mínimo M9 contendo 200mL⁻¹ de solução estoque (64g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.7H₂O; 15g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 2,5g.L⁻¹ de NaCl; 5g.L⁻¹ de NH₄Cl); 2mL⁻¹ de MgSO₄ 1M; 0,1mL⁻¹ de CaCl₂ 1M, 10g.L⁻¹ de glicose e 15g.L⁻¹ de ágar, pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL de solução de lodo e então lavados quase que imediatamente com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de amilase.

4.3.2 Atividade celulolítica

As bactérias foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo: 200mL⁻¹ de solução estoque (64g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.7H₂O; 15g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 2,5g.L⁻¹ de NaCl; 5g.L⁻¹ de NH₄Cl); 2mL⁻¹ de MgSO₄ 1M; 0,1mL⁻¹ de CaCl₂ 1M, 10g.L⁻¹ de glicose e 15g.L⁻¹ de ágar, pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de carboximetilcelulose (CMC) a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL do corante Vermelho Congo, depois de 15 minutos as

placas foram lavadas com NaCl 5M segundo a metodologia proposta por Teather e Wood (1982). A presença de um halo amarelado ou incolor em torno da colônia após a adição de NaCl indicou a secreção de celulase.

4.3.3 Atividade lipolítica e esterolítica

As bactérias foram cultivadas em meio de Lípase/Esterase contendo: 10g.L^{-1} de Peptona; 5g.L^{-1} de NaCl; $0,1\text{g.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 15g.L^{-1} de Agar, pH 7,4 a. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 20, previamente esterilizado. Após a incubação a 28°C durante 48 horas, a formação de um halo formado por cristais ao redor da colônia bacteriana indicou a secreção de lípases. A metodologia utilizada para a avaliação da produção de esterase foi a mesma utilizada para a lípase, porém após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 80, previamente esterilizado. A formação de um halo claro ao redor da colônia bacteriana indicou a secreção de esterases.

4.3.4 Atividade proteolítica

As bactérias foram cultivadas em meio Protease contendo: 5g.L^{-1} de triptona; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de extrato de levedura; 1g.L^{-1} de glicose; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de NaCl e 15g.L^{-1} de Agar, pH 7,0. Após a esterilização adicionou-se 100 mL de leite desnatado. Após a incubação a 28°C durante 48 horas, a formação de um halo ao redor da colônia indicou a secreção de proteases.

4.3.5 Atividade pectinolítica

As bactérias foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo: 200mL^{-1} de solução estoque (64g.L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15g.L^{-1} de KH_2PO_4 ; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de NaCl; 5g.L^{-1} de NH_4Cl); 2mL^{-1} de MgSO_4 1M; $0,1\text{mL}^{-1}$ de CaCl_2 1M, 10g.L^{-1} de glicose e 15g.L^{-1} de ágar, pH 5,0 contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de pectina (v/v) a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL de lugol e em seguida efetuou-se a lavagem com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a secreção de pectinases. A metodologia utilizada para a avaliação da produção de pectato liases é a mesma utilizada para a verificação de

pectinases, ajustando somente para pH 8,0. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a secreção de pectato liases.

4.3.6 Índice enzimático e análise estatística

A atividade enzimática de bactérias endofíticas foi avaliada semi-quantitativamente; para isso, todas as bactérias foram testadas nos meios de culturas específicos, e somente as que deram resultados positivos foram analisadas semi-quantitativamente, pela medição do diâmetro do halo e da colônia com régua milímetrada sendo determinado o Índice Enzimático (IE), conforme a fórmula abaixo:

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Os maiores valores de IE indicam maior produtividade enzimática. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott, a 5% de significância.

4.4 Identificação molecular dos isolados bacterianos

4.4.1 Extração de DNA das bactérias endofíticas

Os isolados bacterianos selecionados foram crescidos em meio TSB (HIMEDIA), e incubados por 2 dias a 28°C, sob agitação (150 rpm). A cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 g por 2 minutos, e ao precipitado obtido foram adicionados 500 µL de tampão de extração (TE – Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, ambos pH 8,0), 80 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)10% e 0,5 g de sílica (0,1 mm). Em seguida, a suspensão foi agitada em homogeneizador de Células (Ação Científica) por 1 minuto a 10.000 g, e em seguida, centrifugada por 10 minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado à ele 500 µL de fenol, sendo então a suspensão homogeneizada por inversão e centrifugada nas condições anteriores. O sobrenadante foi, então, transferido para outro tubo e adicionados 500 µL de clorofórmio. A solução foi homogeneizada por inversão e

centrifugada novamente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo com 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isopropílico (5:4:1), homogeneizado, centrifugado por 7 minutos a 10.000 g e coletado. Em seguida, foram adicionados 4 µl de NaCl (5 M) e 400 µl de isopropanol. A mistura foi deixada por 5 minutos à temperatura de -20°C e centrifugada por 10 minutos a 10.000 g. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 40°C por 30 minutos e eluído em 50 µL de água deionizada esterilizada.

A integridade do DNA extraído foi avaliada por meio de gel de eletroforese em gel de agarose (0,8% p/v) a (3 volts.cm⁻¹) em tampão TEB 1x e corado com SYBR Green, utilizando o marcador molecular TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder.

4.4.2 Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada por meio da extração de DNA. Para as reações de PCR foram utilizados os *primers* RD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') e FD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (WEISBURG et al., 1991), e a reação foi realizada nas seguintes condições: 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 M de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Sinapse Inc.), Tampão 10X, num volume final de 50 µl. O gene 16S rDNA foi amplificado com desnaturação inicial de 10 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; 1 minuto a 62,5° C; 1 minuto a 72°C, e uma extensão final de 7 minutos a 72°C em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems).

O produto das reações foi analisado em gel de agarose (1% p/v) em tampão TEB 1x e corado com SYBR Green, utilizando o marcador molecular TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder.

4.4.3 Purificação do DNA, Sequenciamento de regiões 16S rDNA e análise das sequências

Os fragmentos do gene 16S rDNA foram purificados com um kit de purificação (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram sequenciadas no laboratório Genoma, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo – CENA/USP.

As sequências obtidas a partir do gene 16S rDNA foram utilizadas para identificação dos isolados nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do *Blastn*. Foram consideradas sequências com dissimilaridade menor ou igual a 3% com as do banco de dados.

4.4.4 Identificação dos isolados bacterianos

A identificação das espécies bacterianas foi baseada no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade. As sequências obtidas a partir do sequenciamento foram utilizadas para identificação dos isolados. Esta análise realizada pelo software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011), onde as sequências foram comparadas à sequências tipo com base nos resultados observados no BLASTn. As seqüências determinadas foram alinhadas e editadas usando o programa MEGA versão 5 (TAMURA et al., 2011) com o agrupamento pelo método “Neighbor-Joining” (SAITOU e NEI, 1987), usando-se “p-distance” para nucleotídeos com a opção “the pairwise gap deletion” e usando bootstrap com 10.000 repetições.

5. RESULTADOS

5.1 Promoção de crescimento vegetal

5.1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

Vinte e nove isolados bacterianos endofíticos (40% do total) foram capazes de crescer e formar película em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio (Figura 3) por duas inoculações sucessivas sugerindo a fixação biológica de nitrogênio por esses isolados bacterianos. Os resultados para todos os isolados testados estão apresentados no Anexo A1 e A2.

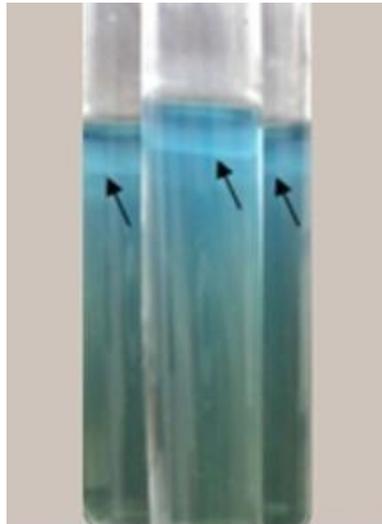


Figura 3. Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em meio NFb semi-sólido inoculado com o isolado endofítico (cód 36A)

5.1.2 Solubilização de fosfato inorgânico

Dos setenta e dois isolados bacterianos avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido contendo CaHP0_4 ; trinta e um apresentaram halo em torno das colônias (Figura 4); representando 43% do total de isolados testados e indicando o potencial de solubilização de fosfato pelos mesmos. Os resultados são apresentados no Anexo A.

De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), podemos organizar os isolados com resultados positivos para solubilização de fosfato em três classes: Isolados com

baixo potencial de solubilização ($ISF < 2$), com médio potencial de solubilização ($2 < ISF < 3$) e com alto potencial de solubilização ($ISF > 3$). Os isolados 2, 4, 63, 63B, 75 e 91 apresentaram alto potencial de solubilização ($ISF > 3$). Já os isolados 1, 36A, 41A, 41B e 54A apresentaram baixo potencial de solubilização ($ISF < 2$).

Alguns isolados apresentaram halo na seleção qualitativa, porém não foi possível quantificar devido a falta de crescimento dos mesmos. No total, foram quinze isolados nos quais o potencial de solubilização não foi possível quantificar; sendo assim, classificados como não identificados (NI).

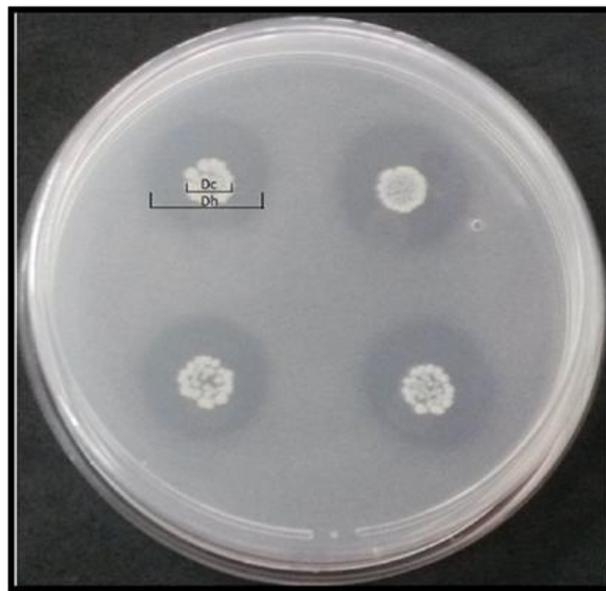


Figura 4. Representação do diâmetro dos halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por isolado bacteriano positivo, inoculado em quadruplicada com o isolado (cód 4).

5.1.3 Produção de ácido indol acético (AIA)

Dos setenta e dois isolados bacterianos avaliados para a produção de AIA, cinquenta (69% do total) foram positivos. Os valores de produção de AIA entre todos os isolados com resultados positivos variaram de $0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $84,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Anexo A1 e A2).

Os valores obtidos neste estudo foram comparados com os resultados obtidos por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas concentrações de 1, 5, 25, 50, 75 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A coloração rosa-avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas (Figura 5) (BATISTA, 2012; ARAÚJO et al., 2014).



Figura 5. Soluções para a construção da curva padrão com diferentes concentrações de AIA comercial (Sigma) (ARAÚJO et al., 2014).

5.1.4 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos

Dos setenta e dois isolados bacterianos endofíticos testados contra os fungos fitopatogênicos, vinte e seis apresentaram alguma atividade antagônica contra o fungo *Alternaria alternata*, nove contra *Ceratocystis paradoxa*, dezesseis contra *Fusarium proliferatum* e dezessete contra *F. verticillioides*, conforme demonstrado no anexo B. Para os testes semi-quantitativos os isolados bacterianos com potencial antagônico não apresentaram halo de inibição sob os fungos fitopatogênicos avaliados.

As porcentagens totais de isolados bacterianos endofíticos com potencial antagônico testados contra as quatro espécies de fungos fitopatogênicos são apresentados nas figuras 6 e 7.

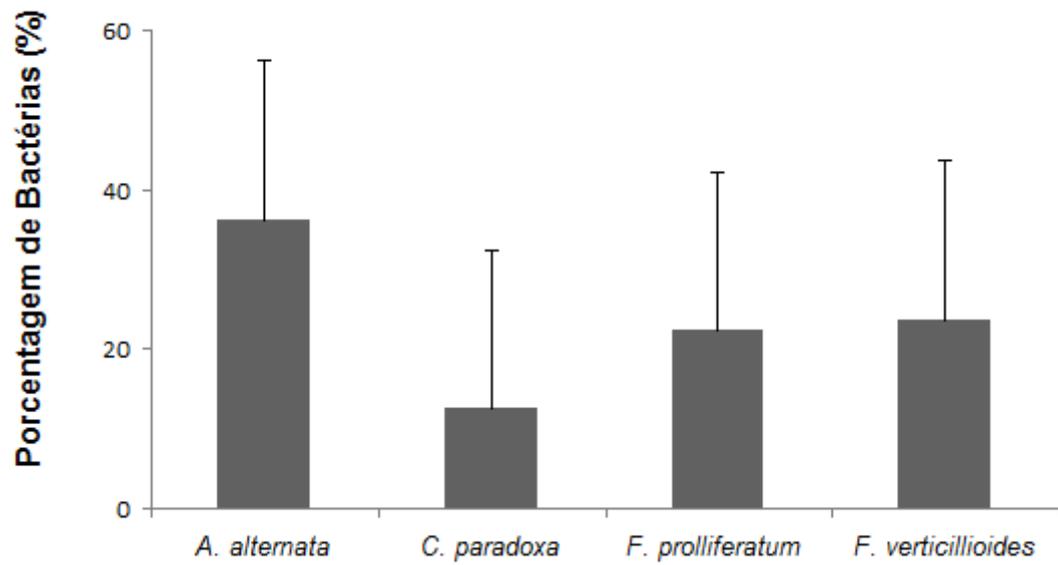


Figura 6. Atividade antagônica dos isolados bacterianos endofíticos contra os fungos fitopatogênicos *Alternaria alternata*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium proliferatum* e *F. verticillioides*.

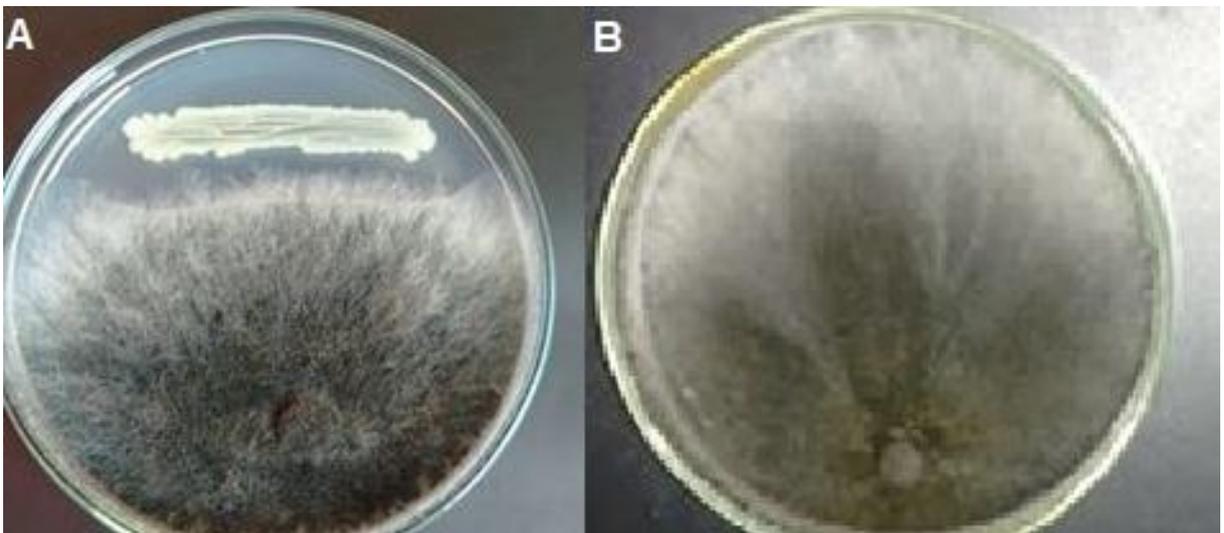


Figura 7. (A) Atividade antagônica do isolado endofítico do pinhão-mansão (cód 55A) versus o fungo fitopatogênico *C. paradoxa*. B) controle: fungo *C. paradoxa* sem nenhum isolado bacteriano.

5.2 Produção enzimática

Dos setenta e dois isolados bacterianos avaliados, dezesseis isolados apresentaram atividade amilolítica, vinte e um isolados apresentaram atividade celulolítica, quinze isolados apresentaram atividade esterolítica, vinte e dois isolados apresentaram atividade lipolítica, para atividade proteolítica treze isolados apresentaram atividade da poligalacturonase e trinta e um isolados apresentaram atividade de pectato liases e vinte e sete isolados apresentaram atividade proteolítica. As porcentagens totais de atividade enzimática de todos os isolados bacterianos endofíticos testados são apresentados na figura 8:

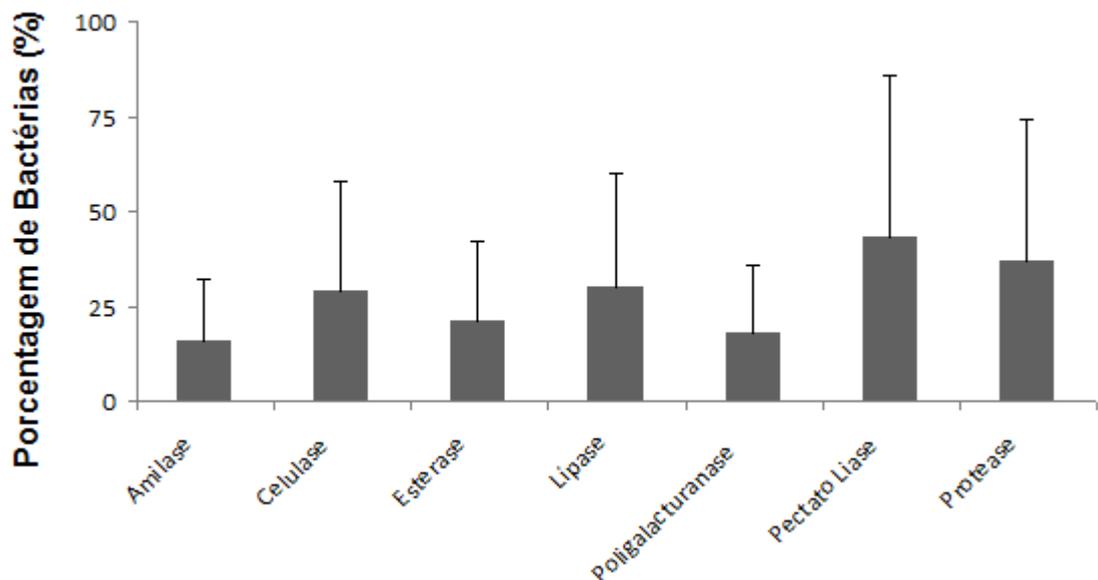


Figura 8. Atividade enzimática dos isolados bacterianos endofíticos.

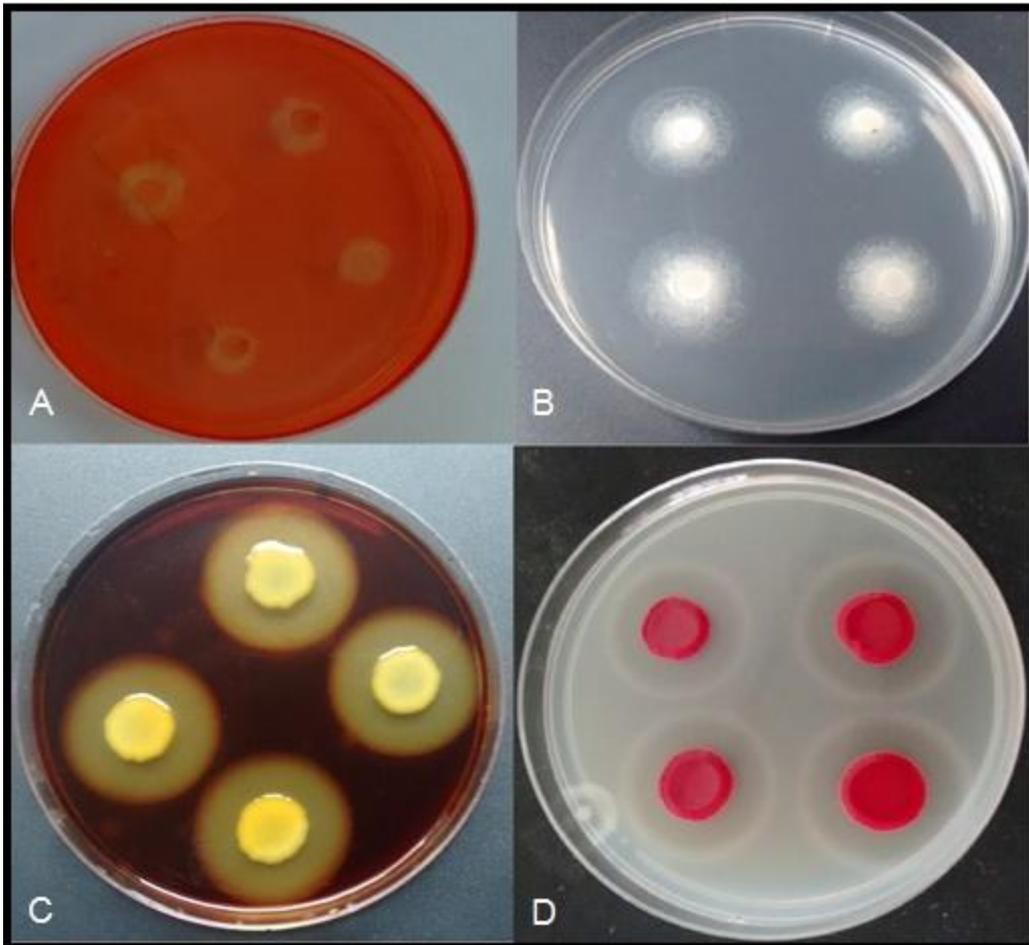


Figura 9. Testes semi-quantitativo de atividade enzimática por bactérias endofíticas isoladas do pinhão-manso: A) Produção de celulase; B) Produção de lipase; C) Produção de pectinase; D) Produção de protease.

5.2.1 Atividade amilolítica

Os dezesseis isolados bacterianos que apresentaram atividade amilolítica foram analisados em teste semi-quantitativo, por meio do cálculo do índice enzimático (IE) (figura 8). Os valores obtidos foram diferenciados estatisticamente entre quatro grupos: treze isolados apresentaram valor de 1,00 de IE; um isolado apresentou valor 1,23 de IE; um isolado apresentou valor 1,33 de IE e um isolado apresentou valor de 2,18 IE, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Dados estatísticos da atividade amilolítica de bactérias endofíticas.

Isolados	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
4	2,18	A
9	1,00	D
12	1,00	D
14	1,00	D
15	1,00	D
21	1,00	D
36A	1,00	D
41A	1,00	D
41B	1,00	D
46A	1,00	D
50	1,10	D
54A	1,00	D
55A	1,23	C
63	1,00	D
63B	1,00	D
95	1,33	B

5.2.2 Atividade celulolítica

Os vinte e um isolados que apresentaram atividade celulolítica (Figura 9a) foram analisados em teste semi-quantitativo, por meio do cálculo do IE. Os valores obtidos foram diferenciados estatisticamente entre quatro grupos: seis isolados apresentaram valores entre 1,00 a 1,03 de IE; seis isolados apresentaram valores entre 1,13 a 1,22 de IE; sete isolados apresentaram valores entre 1,30 a 1,44 de IE e dois isolados obtiveram valores de 1,62 e 1,77 de IE, conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Dados estatísticos da atividade celulolítica de bactérias endofíticas.

Isolados	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
2	1,44	B
4	1,17	C
12	1,32	B
20	1,35	B
21	1,62	A
36A	1,00	D
41A	1,33	B
41B	1,30	B
46A	1,00	D
46B	1,00	D
50	1,77	A
54A	1,03	D
55	1,00	D
55A	1,33	B
63B	1,30	B
66	1,13	C
66B	1,13	C
75	1,13	C
91	1,22	C
92	1,02	D
95	1,22	C

5.2.3 Atividade esterolítica

Os quinze isolados que apresentaram atividade esterolítica foram analisadas em teste semi-quantitativo, por meio do cálculo do IE. Os valores obtidos foram diferenciados estatisticamente entre dois grupos: oito isolados apresentaram valores entre 1,80 a 1,93 de IE e sete isolados apresentaram valores entre 1,95 a 2,08 de IE, conforme mostrado na Tabela:

Tabela 3.Dados estatísticos da atividade esterolítica de bactérias endofíticas.

Isolados	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
2	1,84	B
4	2,08	A
20	1,80	B
23	2,00	A
24	1,84	B
25	1,93	B
26	2,05	A
28	2,03	A
29	2,00	A
66	1,91	B
66B	1,92	B
73	1,83	B
75	1,95	A
78	1,93	B
79	2,05	A

5.2.4 Atividade lipolítica

Os vinte e dois isolados que apresentaram atividade lipolítica (Figura 9b) foram analisadas em teste semi-quantitativo, por meio do cálculo do IE. Os valores obtidos foram diferenciados estatisticamente entre oito grupos: dois isolados apresentaram valores de 1,16 e 1,18 de IE; dois isolados apresentaram valores de 1,43 e 1,46 de IE; quatro isolados apresentaram valores entre 1,60 a 1,76 de IE; dois isolados apresentaram valores de 1,85 e 1,94 de IE; seis isolados apresentaram valores entre 2,11 a 2,36 de IE; dois isolados apresentaram valores de 2,53 e 2,60 de IE; dois isolados apresentaram valores de 2,81 e 2,85 de IE e dois isolados apresentaram valores de 3,03 e 3,21 de IE, conforme mostrado na Tabela 4:

Tabela 4. Dados estatísticos da atividade lipolítica de bactérias endofíticas.

Isolados	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
A1	1,18	H
2	2,53	C
4	2,25	D
14	1,16	H
23	2,11	D
24	3,21	A
25	2,85	B
26	2,60	C
28	2,81	B
29	3,03	A
31	2,36	D
32	1,43	G
33	1,46	G
34	1,60	F
54A	1,76	F
66	2,14	D
66B	2,31	D
73	1,60	F
75	2,25	D
78	1,72	F
79	1,94	E
89	1,85	E

5.2.5 Atividade pectinolítica

Os treze isolados que apresentaram atividade pectinolítica (poligalacturonase) (Figura 9c) foram analisadas em teste semi-quantitativo, por meio do cálculo do IE. Os valores obtidos foram diferenciados estatisticamente entre quatro grupos: oito isolados apresentaram valor de 1,00 de IE; um isolado apresentou valor 1,15 de IE; um isolado apresentou de 1,17 de IE; dois isolados apresentaram valor 1,20 de IE e um isolado apresentou valor 2,00 de IE, conforme mostrado na Tabela 5:

Tabela 5. Dados estatísticos da atividade pectinolítica (poligalacturonase) de bactérias endofíticas.

Isolados	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
4	2,00	A
20	1,20	B
21	1,00	E
23	1,00	E
41A	1,15	D
41B	1,17	C
44	1,00	E
50	1,00	E
5A4	1,00	E
55	1,00	E
55A	1,20	B
92	1,00	E
95	1,00	E

Os trinta e um isolados que apresentaram atividade pectinolítica (pectato liase) foram analisadas em teste semi-quantitativo, por meio do cálculo do IE. Os valores obtidos foram diferenciados estatisticamente entre cinco grupos: quatorze isolados apresentaram valores entre 1,00 a 1,08 de IE; quatro isolados apresentaram valores entre 1,33 a 1,48 de IE; oito isolados apresentaram valores entre 1,58 a 1,84 de IE; quatro isolados obtiveram valores entre 2,02 a 2,22 de IE e um isolado apresentou valor 2,63 de IE, conforme mostrado na Tabela 6:

Tabela 6. Dados estatísticos da atividade pectinolítica (pectato liase) de bactérias endofíticas.

Isolados	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
A1	1,08	E
A2	1,84	C
1	1,08	E
4	2,63	A
5	1,00	E
7	1,83	C
12	1,48	D
15	1,59	C
20	2,12	B
21	2,04	B
23	1,00	E
36A	1,73	C
37	1,00	E
41A	1,33	D
41B	1,35	D
44	1,63	C
46A	1,33	D
46B	1,58	C
50	2,02	B
53	1,00	E
54A	1,00	E
55	1,00	E
55A	1,69	C
58	1,00	E
61	1,00	E
63D	1,00	E
70	1,00	E
88	1,00	E
89	1,00	E
92	1,74	C
95	2,22	B

5.2.6 Atividade proteolítica

Os vinte e sete isolados que apresentaram atividade proteolítica (Figura 9c) foram analisadas em teste semi-quantitativo, por meio do cálculo do IE. Os valores obtidos foram diferenciados estatisticamente entre seis grupos: um isolado apresentou valor 1,00 de IE; quatro isolados apresentaram valores entre 1,24 a 1,33 de IE; seis isolados apresentaram valores entre 1,14 a 1,58 de IE; cinco isolados apresentaram valores entre 1,66 a 1,87 de IE; dez isolados apresentaram valores entre 2,26 a 2,48 de IE e dois isolados apresentaram valores 2,65 e 2,81 de IE, conforme mostrado na Tabela 7:

Tabela 7. Dados estatísticos da atividade proteolítica de bactérias endofíticas

Isolados	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
A1	1,71	C
2	2,46	B
4	1,87	C
5	1,50	D
12	2,31	B
15	1,24	E
21	1,28	E
37	1,66	C
41A	1,50	D
41B	1,45	D
44	1,33	E
53	1,69	C
55	2,26	B
55A	2,81	A
58	2,48	B
61	1,58	D
63D	1,50	D
66	2,30	B
66B	2,44	B
70	1,53	D
75	2,43	B
80	1,74	C
88	2,48	B
89	2,65	A
91	2,26	B
92	1,00	F
95	2,26	B

5.3 Identificação dos isolados bacterianos endofíticos

Dentre os setenta e dois isolados endofíticos, vinte e cinco foram identificados, por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. O critério de seleção para o sequenciamento foi baseado na morfologia das bactérias, tentando abranger os diferentes aspectos fenotípicos apresentados pelas linhagens. As sequências obtidas do gene 16S rDNA foram comparadas com sequências do *GenBank* através do programa *BLASTn* (NCBI – www.ncbi.nih.gov). Na tabela 8 são apresentadas as linhagens e suas respectivas identificações de similaridade do 16S rDNA em 100% utilizando fragmentos de 600pb.

Tabela 8. Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequências parciais do gene 16S rDNA de bactérias endofíticas isoladas do pinhão-mansão com as sequências obtidas no banco de dados *GenBank* através da ferramenta *BLASTn*.

Isolado	Identificação	Similaridade (%)	Nº de Acesso
A1	<i>Bacillus</i> sp.	100%	KT003271.1
1	<i>Bacillus</i> sp.	100%	KR094815.1
5	<i>Bacillus</i> sp.	100%	LN851878.1
41A	<i>Bacillus</i> sp.	100%	CP010586.1
41b	<i>Bacillus</i> sp.	100%	CP010586.1
44	<i>Bacillus</i> sp.	100%	KT003255.1
53	<i>Bacillus</i> sp.	100%	KT222783.1
54	<i>Bacillus</i> sp.	100%	CP010586.1
55A	<i>Bacillus</i> sp.	100%	KT221512.1
58	<i>Bacillus</i> sp.	100%	KR476389.1
63D	<i>Bacillus</i> sp.	100%	KR476389.1
70	<i>Bacillus</i> sp.	100%	LN851878.1
89	<i>Bacillus</i> sp.	100%	KT221512.1
92	<i>Bacillus</i> sp.	100%	KT003255.1
63B	<i>Citrobacter</i> sp.	100%	KR190415.1
32	<i>Curtobacterium</i> sp.	100%	KP330257.1

Tabela 8. Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequencias parciais do gene 16S rDNA de bactérias endofíticas isoladas do pinhão-mansão com as sequencias obtidas no banco de dados *GenBank* através da ferramenta *BLASTn*. (continuação)

Isolado	Identificação	Similaridade (%)	Nº de Acesso
33	<i>Curtobacterium</i> sp.	100%	KC550178.1
77	<i>Enterococcus</i> sp.	100%	KT205681.1
87	<i>Enterococcus</i> sp.	100%	LN851878.1
7	<i>Microbacterium</i> sp.	100%	KP739252.1
42	<i>Microbacterium</i> sp.	100%	LN851883.1
47	<i>Microbacterium</i> sp.	100%	JX471120.1
63C	<i>Microbacterium</i> sp.	100%	KF933512.1
14	<i>Promicromonosporaceae</i> sp.	100%	FN178373.1
19	<i>Sanguibacter</i> sp.	100%	Y09657.1

6 DISCUSSÃO

A necessidade de aliar o aumento da demanda por combustíveis à preocupação com o meio ambiente levou ao interesse cada vez maior de se utilizar a biomassa disponível no planeta (SUAREZ et al., 2009). Resíduos domésticos e agroindustriais estão sendo utilizados como matérias-primas para a produção de biocombustível de primeira geração como o biodiesel e o etanol (DEMIRBAS, 2009).

O Brasil possui potencial para produzir mais de 2,5 bilhões de litros/ano de biodiesel e, juntamente com a Malásia, Indonésia, Argentina e Estados Unidos, integra o topo dos cinco países com o maior potencial para produção de biodiesel (JOHNSTON e HOLLOWAY, 2007). Nesse sentido, o pinhão-mansão tem sido considerada uma oleaginosa promissora para produção de biodiesel por alguns autores (DRUMOND et al., 2008; SATURNINO et al., 2005),

Micro-organismos endofíticos já são descritos como promotores de crescimento vegetal devido à capacidade de algumas bactérias em fixar nitrogênio atmosférico, solubilizar fosfato e produzir auxinas (VERMA et al. 2001; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004, MENDES et al., 2007; LACAVA e AZEVEDO 2013). Em um estudo realizado por Schimidt (2012), sobre ocorrência de bactérias endofíticas na cultura do pinhão-mansão identificaram oito gêneros de bactérias endofíticas: *Acinetobacter*; *Bacillus*; *Burkholderia*; *Microbacterium*; *Pseudomonas*; *Salmonella*; *Staphylococcus* e *Serratia*.

Tendo em vista que o teste de um grande número de linhagens em condições naturais (*in vivo*) é extremamente laborioso, o presente estudo foi baseado em técnicas *in vitro* para a seleção de linhagens promissoras para promoção de crescimento e produção de enzimas. Tais técnicas fornecem uma base para a seleção inicial de bactérias promotoras de crescimento de plantas e que poderão ser utilizadas testes futuros sob condições *in vivo* (CASTRO, 2011; BATISTA, 2012; SILVA, 2015).

A fixação biológica de nitrogênio é considerada o segundo processo biológico mais importante depois da fotossíntese (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; TAIZ e ZEIGER, 2009; ZAMBUDIO e FERREIRA; 2012). Alguns gêneros de bactérias são capazes de captar o nitrogênio (N₂) presente no ar (78% dos gases da atmosfera) e transformá-lo em N assimilável pelas plantas. A FBN é uma das tecnologias agrícolas que compõem os compromissos assumidos pelo Brasil na COP-15,

realizada em Copenhague em 2010, e que prevêem a redução das emissões de gases de efeito estufa entre 36,1% e 38,9%, o que significa uma redução que gira em torno de 1 bilhão de toneladas de dióxido de carbono - principal gás de efeito estufa na atmosfera (ZAMBUDIO e FERREIRA; 2012).

No presente estudo foi constatado que 40% dos isolados bacterianos endofíticos avaliados apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio (Anexo A). A formação de halo comprovando a fixação de nitrogênio foi observada tanto no meio semi-sólido de NFb de pH básico (de cor verde sem alteração do pH proposto pela metodologia) quanto no meio de cultura com o pH ácido (de cor azul indicando a acidificação do meio NFb semi-sólido) (Figura 4). A formação desta película é uma estratégia desenvolvida pelos micro-organismos para regular a concentração de oxigênio no meio, com a finalidade de manter baixa a sua tensão (BRASIL, 2005); permitindo assim, uma condição de crescimento bacteriano onde o oxigênio não influencia negativamente na sua sobrevivência; proporcionando uma melhor atividade da nitrogenase que é extremamente sensível a altas concentrações de oxigênio (PELZER, 2010). Embora seja uma metodologia que possibilite apenas qualificar as bactérias quanto a fixação biológica do nitrogênio *in vitro*, é um teste rápido e eficiente de avaliação utilizado nos laboratórios, pois em um meio livre de fonte nitrogenada e sob a condição semi-sólida, há um ambiente ideal para o desenvolvimento dos micro-organismos e para a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (SILVEIRA, 2008; ARAÚJO et al., 2014). Dentre os vinte e cinco isolados identificados, por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, dez linhagens do gênero *Bacillus* sp. (A1, 1, 5, 41A, 41B, 44, 53, 54, 63D e 92) apresentaram capacidade de fixar nitrogênio.

Este gênero já vem de forma recorrente sendo descrito na literatura como fixadores de nitrogênio; de acordo com Paz (2009), sete linhagens bacterianas de *Bacillus* isoladas endofiticamente eucalipto foram capazes de fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico; utilizando a mesma metodologia descrita no presente estudo (Araújo et al., 2014). Em trabalho realizado por Teixeira et al., (2007), foram coletadas amostras de mandiocas para o isolamento de bactérias endofíticas e verificação do potencial de FBN em três diferentes estados brasileiros (Amazonas, Bahia e São Paulo), os isolados bacterianos que apresentaram melhores índices (36%) de FBN foram das amostras coletadas no estado do Amazonas, Já Ceriolioli

et al., (2005), de oitenta e seis isolados bacterianos endofíticos isolados do milho, 88% apresentaram esta atividade mediante ao teste com meio semi-sólido de NFb.

Em trabalho realizado por Szilagyi-Zecchin et al., (2014), foram avaliados sete isolados bacterianos endofíticos associados ao milho, onde todos os isolados apresentaram resultado positivo para a formação de película em meio NFb semi-sólido, sendo um dos gêneros *Enterobacter* e seis do gênero *Bacillus*.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com resultados obtidos por Castro, (2011), onde 47% dos isolados bacterianos endofíticos isolados de plantas de manguezais apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio e foram identificadas como pertencentes às espécies *Bacillus pumilus* e *Pseudomonas agglomerans*.

Muitos endófitos são conhecidos por promoverem o crescimento da planta por meio da conversão do fósforo insolúvel nas formas solúveis (DIAS et al., 2009). Os micro-organismos solubilizadores de fosfatos desempenham importante papel no suprimento de P para as plantas. Este fato tem despertado a atenção para seu uso como inoculante comercial ou no manejo de suas populações, para maximizar a utilização do P existente no solo ou do adicionado como fertilizante. (DUARTE et al., 2014). Bactérias solubilizadoras de fosfato têm um papel importante na nutrição das plantas. Seu uso como biofertilizante nas lavouras apresenta-se como uma importante contribuição para diminuição na utilização de compostos fosforados. Porém há poucos estudos sobre a eficiência de tais bactérias neste processo e dos mecanismos envolvidos na interação destas com as plantas (BASHAN e HOLGUIM, 1998; VESSEY, 2003; CASTRO, 2011).

No presente estudo, quase metade das linhagens foram capaz de solubilizar fosfatos (42 % do total). Desses, seis isolados (2; 4; 63; 63B; 75 e 92) apresentaram índices <3. Dentre os vinte e cinco isolados identificados, por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, duas linhagens dos gêneros *Citrobacter* sp. (63B) e *Bacillus* sp. (92) apresentaram alto-índices de solubilização.

O principal mecanismo envolvido na solubilização de fósforo é a produção e liberação de ácidos pelas bactérias, sendo os ácidos láctico, itacônico, isovalérico, isobutírico e acético, os mais descritos na literatura (VAZQUEZ et al., 2000, DIAS et al., 2009; MARRA et al., 2012).

Os gêneros frequentemente descritos em processos de solubilização de fosfato tem sido pertencentes aos gêneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*,

Erwinia, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Staphylococcus*, (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; SESSITSCH; REITER; BERG, 2004; LI et al., 2008).

Bacillus é um gênero bacteriano conhecidamente descrito como endófitos que auxiliam a planta hospedeira de diferentes formas, sendo uma delas a oferta de fósforo solúvel por meio de sua solubilização (KANG et al., 2009, PÉREZ-GARCÍA et al., 2011). Andrade (2012), relata seis diferentes espécies de *Bacillus* sp. capazes de solubilizar fosfato de cálcio com índices de solubilização variando de 0,42 a 2,28. Em outro estudo, Dias et al., (2009) analisaram endofíticos isolados de morango, principalmente *Bacillus subtilis* e de *B. Megaterium*, sendo todos capazes de solubilizar fosfato.

A atividade *in vitro* de solubilização de fosfato tem sido também documentada para linhagens de *Citrobacter* sp., este gênero pertence à família das *Enterobacteriaceae* (KAMPFER, 2003). Em estudos realizados por Reginatto (2008), uma linhagem de *Citrobacter werkmani* foi isolado endofiticamente da espécie *Vriesea friburgensis* (bromélia), com capacidade de solubilizar fosfato. Assumpção (2009) relata um alto índice de solubilização de fosfato (ISF 4,7) de uma linhagem de *Citrobacter* sp., isolada endofiticamente de sementes de soja, com índice muito próximo ao obtido no presente estudo conforme é mostrado tabela 8 (Anexo A2).

A importância dos micro-organismos solubilizadores de fosfato não está apenas no fato de contribuir para o crescimento das plantas, mas também para reduzir a necessidade ou maximizar o uso de fertilizantes manufaturados (SILVA et al., 2010). O entendimento da capacidade e da eficiência de micro-organismos em solubilizar fosfatos pode levar à seleção de linhagens com alto potencial de uso para a inoculação em plantas como biofertilizantes, substituindo ou diminuindo o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo (SILVA FILHO; NARLOCH; SCHARF, 2002; SOUCHIE et al., 2005; DIAS et al., 2009).

Os resultados dos testes de detecção da produção do ácido indol acético pelas bactérias endofíticas estão apresentados no Anexo A1 e A2.

A ação dos reguladores de crescimento, como auxinas, produzidos por bactérias endofíticas vem sendo estudada em diversas espécies de plantas (ETESAMI et al., 2015; PHETCHARAT e DUANGPAENG, 2012; LACAVA e AZEVEDO, 2013; QUECINE; BATISTA; LAVACA, 2014).

No presente estudo foi observado que 68% dos isolados endofíticos avaliados são produtores de ácido indol acético. Destacando-se a linhagem *Citrobacter* sp. (63b) com valor $84,11 \mu\text{g/mL}^{-1}$, duas linhagens de *Bacillus* sp. (isolados 54 e 92) com valores de $\mu\text{g/mL}^{-1}$ e $48,45 \mu\text{g/mL}^{-1}$ respectivamente e duas linhagens de *Microbacterium* sp. (isolados 63C e 96) com valores de $51,90 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e $56,34 \mu\text{g/mL}^{-1}$ respectivamente como maiores valores.

Vários fatores como concentração de triptofano, pH e fontes de nutrientes, podem interferir tanto na capacidade de síntese, como na quantidade de AIA produzido em meio de cultura. Cada isolado bacteriano apresenta uma concentração ótima para estimular a produção de AIA, porém, não existe uma faixa de concentração benéfica ou tóxica comum a todas as espécies vegetais (BAR e OKON; 1993; PATIL et al., 2011)

A resposta das plantas ao AIA liberado por bactérias pode variar de efeitos benéficos a deletérios, dependendo de sua concentração. Quando em baixas concentrações o ácido indol acético pode estimular o crescimento e, quando em altas concentrações pode inibir o desenvolvimento da raiz. Os níveis de AIA produzidos pelas bactérias dependem da multiplicação bacteriana, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas da rota biosintética de AIA (LAMBRECHT et al., 2000).

Assumpção (2009) relata uma linhagem de *Citrobacter* sp. produzindo $16,7 \mu\text{g/mL}^{-1}$ demonstrando tendência de aumento de todos os parâmetros avaliados, embora não tenha diferido estatisticamente do controle não inoculado e com destaque para o isolado do gênero *Pantoea* sp., com a produção de $34,9 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de AIA, promovendo significativamente o crescimento da planta. No trabalho de Rigotto (2008) uma linhagem de *C. werkmanii*, isolada endofiticamente da espécie *V. friburgensis* apresentou capacidade de sintetizar AIA em duas metodologias testadas (Bric et al., 1991; Glickmann e Dessaux, 1995).

Selvakumar et al., (2008) isolaram *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. de nódulos de kudzu (*Pueraria thunbergiana*), capazes de produzir $6,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de AIA e de promover o crescimento quando inoculadas em plântulas de trigo, evidenciado a promoção de crescimento pelo aumento no comprimento e na biomassa das raízes das plântulas. Em estudos realizados por Ali et al., (2009), os autores inocularam bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de AIA em sementes de *Vigna radiata* e avaliaram seu desenvolvimento, onde foi observado incrementos no

desenvolvimento radicular das plântulas, na ordem de 30% no comprimento das folhas, 98% no número de brotações e 14% no peso das sementes.

Em estudos realizados por Pedrinho, (2009), avaliando bactérias endofíticas promotoras de crescimento em milho foi relatada uma linhagem de *Microbacterium* sp. produzindo 97 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Pontes et al., (2015) também relatam este gênero bacteriano associadas à culturas da cevada (*Hordeum vulgare* L.) com capacidade de sintetizar o AIA.

Sabe-se que o AIA bacteriano é obtido na fase estacionária, sendo o mesmo um metabólito secundário (BRADER et al., 2014). No entanto a duração desta fase varia de espécie para espécie. Logo, para conhecer o crescimento de cada espécie e assim a sua fase estacionária, é necessário fazer uma curva de crescimento de cada isolado mediante a relação de densidade de células por tempo. Devido ao grande número de isolados para a realização deste teste, foi inviável o ajuste da leitura da fase estacionária bem como a obtenção da curva de crescimento de cada espécie, considerando que foram usados setenta e três isolados (CASTRO, 2011).

As doenças de plantas desempenham papel significativo em prejuízos causados na agricultura. Em particular, fungos são responsáveis por perdas importantes em todos os tipos de cultivos agrícolas. Além disso, não só as lavouras, mas produtos pós-colheita também sofrem com infecções fúngicas (SOUZA et al., 2014). Nesse sentido, a busca por métodos de menor impacto ambiental e à saúde humana, o controle biológico é uma das alternativas promissoras, por apresentar especificidade ao alvo, utilizar diferentes meios para atingi-lo, restringindo as chances de selecionar linhagens resistentes (SAITO et al., 2009).

Nos testes *in vitro* de antagonismos contra fungos fitopatogênicos avaliados, foi observado que nenhum dos isolados bacterianos apresentaram halo de inibição quando realizado os testes semi-quantitativos, porém na técnica de pareamento direto alguns isolados apresentaram potencial antagônico contra os fungos fitopatogênicos avaliados, com destaque para os isolados (Cód. 5, 37, 55A, 58, 61, 63D, 70, 88 e 89) apresentados no anexo B1 e B2, entre estes nove isolados que apresentaram potencial para inibir o crescimento dos quatro fungos testados: *Alternaria alternata*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium proliferatum* e *F. verticillioides*, cinco linhagens foram identificados pertencendo ao gênero *Bacillus* sp.

Dentre os gêneros mais utilizados no biocontrole, *Bacillus* sp. mesmo não sendo superior em relação à sua atividade biocontroladora, tem grande vantagem

em relação aos outros, devido à sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como a condições extremas de pH, a agroquímicos, fertilizantes e ao tempo de estocagem, permitindo, portanto, sua utilização na formulação de produtos mais estáveis e viáveis e sua aplicação no tratamento de folhas na forma de sprays (BACKMAN, WILSON & MURPHY, 1997; KLOEPPER et al., 1997). Outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000).

Em estudos realizado por Abdalla et al., (2014), encontraram vinte e sete isolados de *Bacillus* com capacidade antagônica contra o fitopatógeno *A. alternata*. Devido à produção de compostos antimicrobianos. Os gêneros de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* também foram relatados com potencial ação antagônica contra fungos fitopatogênicos (ANGONESE et al., 2009; DALAL e KULKARNI, 2013). Rhoden et al., (2013).

A atividade antagônica contra o fungo fitopatogênico *C. paradoxa* utilizando linhagens bacterianas ainda não foram descritos na literatura, destacando assim a importância do presente estudo onde nove isolados apresentaram potencial antagônico contra este fungo de grande importância agrícola. No entanto o potencial antagônico contra o *C. paradoxa* já foi relatado em ensaios com fungo endofítico versus fungo o fitopatogênico. Diversos trabalhos demonstram a capacidade antagônica do fungo do *Trichoderma* spp. contra o fungo fitopatogênico *Thielaviopsis* (forma anamórfica do fungo *Ceratocystis paradoxa*), (WIJEINGUE et al., 2010; SANCHEZ e REBOLLEDO, 2010; NASCIMENTO et al., 2013)

O gênero *Fusarium* compreende um grande grupo e heterogêneo de fungos que provoca doenças em diversas plantas, tais como a soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*), reduzindo tanto a qualidade como a quantidade dos seus produtos, sendo portanto economicamente prejudicial (MATARESE et al., 2012). De acordo com Mendes et al., (2007), bactérias endofíticas do gênero *Burkholderia*, isoladas da cultura cana-de-açúcar possuem forte capacidade de inibir o crescimento de *F. verticillioides*, e estudos *in vitro* demonstraram também a atividade antagonista da bactéria endofítica *Bacillus subtilis* contra o fungo *F. verticillioides*. (FIGUEIREDO et al., 2009). O uso de *Bacillus subtilis* foi eficiente para o controle de *F. oxysporum* em *Cicer arietinum* L. (grão-de-bico), *in vivo* (MORADI et al., 2012) e *Fusarium solani* em *Lycopersicon*

esculento L. (tomate), *in vitro* e *in vivo* (MORSY et al., 2009). Maciel et al., (2014) relatou que uma linhagem do gênero *Bacillus subtilis* (UFV3918) é promissor no biocontrole *in vivo* de *F. sambucinum*, proporcionando maior vigor às plântulas e reduzindo as perdas ocasionadas pelo patógeno. Assim, de acordo com esses autores, estes resultados mostram o efeito antagônico de bactérias endofíticas e o potencial uso desses micro-organismos como alternativa no controle biológico de doenças de plantas cultivadas e de interesse agrícola.

A produção de enzimas microbianas vem sendo considerado um dos principais setores da atual Biotecnologia industrial (ORLANDELLI et al., 2012).

O estudo do perfil enzimático, *in vitro*, da microbiota endofítica associada ao pinhão-mansão revelou que dentre as setenta e duas bactérias endofíticas isoladas do pinhão-mansão avaliadas nesse trabalho, cinquenta e cinco (75%) os isolados foram capazes de produzir algum tipo de atividade enzimática tais como: amilases, lipases, esterases, pectinases e proteases como parte do seu metabolismo secundário (Tabela 1, 2, 3, 4, 5, 6). O índice enzimático (IE) no presente trabalho variou de 1,00 a 3,21 entre todas as atividades enzimáticas dos isolados bacterianos endofíticos. Isto revela que estes micro-organismos são uma fonte com potencial para a aplicação biotecnológica em diferentes áreas, tais como: produção de detergentes, papel, fármacos, têxtil e indústria de couro; onde a utilização de enzimas é de fundamental importância (CARRIM et al., 2006).

A princípio os isolados endofíticos foram analisados individualmente, medindo-se o halo degradado em cada substrato avaliado. Este halo foi mensurado para o subsequente cálculo do índice enzimático do qual foi utilizado a expressão de índice enzimático (IE) = diâmetro do halo/ diâmetro da colônia, como mostrado em material e métodos. De acordo com Florencio; Couri; Farinas, (2013), os isolados que apresentam índice enzimático superior a 1,50 são considerados como potencial produtores enzimáticos.

No presente trabalho julgaram-se como melhores isolados aqueles que obtiveram melhores índices próximos ao valor máximo conseguido. Sendo assim para atividade amilolítica o isolado (4), para atividade celulolítica os isolados (21 e 50), para a atividade esterolítica os isolados (4, 23, 26, 28, 29, 75 e 79), para atividade lipolítica os isolados (24 e 29), para atividade pectinolítica o isolado (4) e para atividade proteolítica duas linhagens do gênero *Bacillus* sp. (55A e 89).

Poucos foram os isolados com capacidade de produzir amilase, mas destaca-se o potencial da produção de protease e pectinase dos isolados endofíticos (Figura 9c e 9d). Os resultados obtidos no presente estudo foram superiores aos relatados por Silva (2015), para atividade pectinolítica e atividade proteolítica, e inferiores para atividade amilolítica e atividade celulolítica. Já em resultados obtidos por Castro, et al., (2014), para atividade amilolítica encontraram linhagens de *Bacillus* (IE 2,70) e *Novosphingobium* (IE 2,78), para a atividade celulolítica linhagens de *Bacillus* (IE 2,58; 2,73; 2,75 e 2,80), *Curtobacterium* (IE 2,38), *Microbacterium* (IE 2,93), *Ochrobactrum* (IE 2,60 e 2,90) e *Stenotrophomonas* (IE 2,63), para atividade esterolítica uma linhagem de *Bacillus* (IE 1,85) e para atividade lipolítica uma linhagem de *Erwinia* (IE 6,83), como melhores valores sendo superiores aos encontrados no presente estudo para estas atividades enzimáticas, já para a atividade proteolítica foi relatado uma linhagem de *Curtobacterium* como maior valor (IE 2,75) sendo inferior aos apresentados no Anexo A1 e A2.

Em pesquisa semelhante, Bonatelli (2012), analisou bactérias endofíticas isoladas de folhas de guaranazeiro da Amazônia para atividade enzimática e verificou um total de 13,4% dos isolados produzindo amilases, 14,8% celulases, 19,9% lípases, 20,8% esterases, 22,7% pectinases e 44% proteases. A mesma autora verificou que celulase, amilase, lípase, esterase, pectinase e protease foram produzidas por várias bactérias tanto provenientes de plantas sintomáticas (com sintomas de antracnose) como assintomáticas (aparentemente sadias) com diferenças estatisticamente significantes para amilase, lípase, e celulase para as assintomáticas em relação às sintomáticas o que poderia indicar que elas exerçam um papel no controle da antracnose em plantas sadias. Prasad e Dagar relatam a capacidade de isolados do abacate e de uvas pretas em produzir catalase, lípase e esterase.

Vários trabalhos relatam atividades enzimáticas com diferentes isolados bacterianos com maior destaque para enzimas proteolíticas que tem grande utilidade nas indústrias de detergentes ou similares (VENUGOPAL e SARAMMA, 2006; THYS et al., 2006; GHOSH et. al. 2007; CASTRO 2014). As enzimas esterase e lípase têm a atenção de indústrias principalmente para aplicações como: tratamento de óleos e gorduras, produção de detergentes, processamento de alimentos, síntese de produtos químicos e farmacêuticos, fabricação de papel e produção de cosméticos. (HENDRICKSON, 1997; KAZLAUKAS e BORNSCHEUER, 1998).

É possível sugerir que tais gêneros possam ter grande importância no desenvolvimento da planta hospedeira, já que, boa parte dos isolados já foram relatados como atuantes na promoção de crescimento vegetal, no controle biológico de doenças de plantas, produção de auxina e solubilizadores de fosfato (ASSUMPÇÃO et al., 2009;).

Diante do exposto fica clara a importância da estratégia de cultivo no conhecimento do potencial metabólico destes micro-organismos de possível interesse aplicado. Esta planta pode conter uma extensão da diversidade microbiana ainda em grande parte desconhecida, com isso produtos como novas enzimas e antibióticos poderiam ser encontrados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos de mostraram que do total de setenta e dois isolados endofíticos do pinhão-mansão, 40% apresentaram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio atmosférico, 43% solubilizaram fosfato inorgânico e 69% sintetizaram AIA.

Os isolados endofíticas apresentaram alguma atividade antagônica contra os fungos fitopatogênicos: 36% contra o fungo *Alternaria alternata*, 12% contra o fungo *Ceratocystis paradoxa*, 22% contra o fungo *Fusarium proliferatum* e 23% contra o fungo *F. verticillioides* (24%), destacando uma linhagem do gênero *Bacillus* (55A) que possui atividade antagônica contra os quatro fungos fitopatogênicos testados.

Os testes de produção de enzimas *in vitro* revelaram que 16% dos isolados endofíticos apresentaram atividade amilolítica, 29% celulolítica, 20% esterolítica, 29% lipolítica, 46% pectinolítica e 37% proteolítica.

Vinte e cinco isolados foram identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA sendo encontrados sete gêneros: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Curtobacterium*, *Enterococcus*, *Microbacterium*, *Promicromonosporaceae* e *Sanguibacter* foram isolados como endofíticos de pinhão-mansão.

As próximas etapas desse estudo seguirão no sentido da inoculação dos isolados endofíticos, com os melhores resultados *in vitro* para promoção de crescimento, em mudas de pinhão-mansão para verificar *in vivo* o desempenho. Além disso, também poderão ser aprofundado os estudos com os isolados que tiveram os melhores desempenho para a produção de enzimas para otimização dos processos.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, S. S.; ALGAM, S. A. A.; IBRAHIM, E. A.; EL NAIM, A. M. In Vitro Screening of *Bacillus* Isolates for Biological Control of Early Blight Disease of Tomato in Shambat Soil. **World Journal of Agricultural Research**, v. 2, p.47-50, 2014.
- ACCARINI, J. H. Biodiesel no Brasil: estágio atual e perspectivas. **Revista Bahia Análise e Dados**, Salvador, v. 16, n. 1, p. 51-63, 2006.
- ACHTEN, W. M. J.; MATHIJS, E.; VERCHOT, L.; SINGH, V. P.; AERTS, R.; MUYS, B. *Jatropha* biodiesel fueling sustainability? **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 4, p. 283-291, 2007.
- ACHTEN, W. M. J.; MAES, W. H.; REUBENS, B.; MATHIJS, E.; SINGH, V. P.; VERCHOT, L.; MUYS, B. Biomass production and allocation in *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 5, p. 667-676, 2010.
- ACKOM, E. K.; ERTEL, J. An alternative energy approach to combating desertification and promotion of sustainable development in drought regions. In: FORUM DER FORSCHUNG, 18, 2005, Eigenverlag. **Anais...** Eigenverlag: BTU Cottbus, p. 74-78, 2005.
- AGRIOS, G. N.. **Plant pathology**. Burlington: Elsevier Academic, 2005. 922 p.
- ALI, B.; SABRIN, A. N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p.542-547, 2009.
- ALTENBURG, T.; HILDEGARD, D.; MATTHIAS, H.; NIKOS, N.; CHRISTINA, R.; KATHRIN, S. **Biodiesel in India. Value Chain Organization and Policy Options for Rural Development**. German Development Institute Studies. Bonn, Germany, 2009.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A. L. F.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp.* for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, 2002.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**. v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008.
- AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, p. 143-169, 1995.
- AMARESAN N., JAYAKUMAR V., THAJUDDIN N. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 13, p.247-255, 2014.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

ANDRADE, L. F. **Bactérias endofíticas de bananeira “Prata-Anã”:** Fixação de Nitrogênio, Solubilização de Fosfato de Cálcio e Produção de Ácido Indol-3-Acético. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2012.

ANGONESE, M. T.; DELLA-GIUSTINA, J.; PAIM, L. H.; PANSERA, M. R.; PAGNO, R. S.; MEZZOMO, F.; ZORZI, E.; PEREIRA, C. O. F.; RIBEIRO, R. T. S. Fungistatic effect of *Bacillus spp* on plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 97-100, 2009.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of Endophytic Bacterial Population and Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Braziliv. 68, n. 10,p. 4906-4914, 2002.

ARAÚJO, W. L.; QUECINE, M. C.; LACAVALA, P. T.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização. 1. ed. Santarém: UFOPA, v. 1, p. 257, 2014.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o Semi-Árido Nordeste. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**. Campina Grande, v. 8, n. 1, p.789-799, 2004.

ASSUMPÇÃO, L. C.; LAÇAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L. Micro-organismos endofíticos. In : MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, cap. 4, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.

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

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Org.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, p.189-207, 2007.

BACKMAN, P. A.; WILSON, M.; MURPHY, J. F. Bacteria for Biological Control of Plant Diseases. In: RECHCIGL, N. A., RECHCIGL, J. E. **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. New York: Lewis Publishers, p. 95-109, 1997.

BAIRD, R. E.; MULLINIX, B. G.; PEERY, A.B.; LANG, M.L. Diversity and longevity of the soybean debris mycobiota in a no-tillage system. **Plant Disease** v. 81, p. 530-534, 1997.

BAR, T.; OKON, Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa v. 39, p. 81-86, 1993

BARRAQUIO, W.L.; REVILLA, L.; LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v.194, p.15-24, 1997.

BAREA, J. M.; NAVARRO, E.; MONTOYA, E. Production of plant growth regulators by rhizospheric phosphate-solubilizing bacteria. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 40, p. 129-134, 1976.

BATISTA, B.D. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranzeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)** 2012. 129 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

BATISTA, T. F. C.; ALVES, K. F.; SANTOS-FILHO, B. G.; RODRIGUES, R. C.; OLIVEIRA, F. C.; TAVARES, A. E. B. Ocorrência de fungos e nematóides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de Coari (AM). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 47, p. 163-171, 2007.

BELTRÃO, N.E. de M.; SEVERINO, L.S.; BRITO, G. G.; LUCENA, A. M. A. de.; OLIVEIRA, M. I. **Pesquisas Realizadas pela Embrapa Algodão e Parceiros com o Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.)**. Campina Grande: CNPA/Embrapa, 2008. 20p. (Documentos, 199).

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiol Ecology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 215-229, 2005.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, n. 4, p. 399-406. 1976.

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.

BONATELLI, M.L. **Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose**. 2012. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

BOTTA A.L.; SANTACECILIA A.; ERCOLE C.; CACCHIO P.; DEL GALLO M. *In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, 666-674, 2013.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH. A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretária de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília: STI/CIT, 1985. 364p. (Documentos, 16).

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 Janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Secção 1, p.8. 14 Janeiro. 2005.

BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. *Jatropha*: A Smallholder Bioenergy Crop The Potential for Pro- Poor Development. **Integrated Crop Management**, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, v. 8, p. 96, 2010.

BROEK, A. V.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. Auxins upregulate expression of indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasiliense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 1338-1342, 1999.

BROUZOS, N., **Separating *Jatropha* facts from *Jatropha* fiction**. In: Eighth Annual World Biofuels Markets. Rotterdam, The Netherlands, p. 12-14, 2013.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.105, n.4, p.329-348, 1998.

BUENO, J.C.; FISCHER, I.H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 3, n.2, p. 1-9, 2006.

CARNIELLI, F. O combustível do futuro. **Boletim Informativo - UFMG**, Belo Horizonte, v. 29, n. 1413, 2003. Disponível em: <http://www.ufmg.br/boletim/bol1413/>. Acesso em: 5 de abril de 2015.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian arch. of biology and Technology**. Viçosa, v. 49, n.3, p. 353-359, 2006.

CAZORLA, F. M.; ROMERO, D.; PEREZ-GARCIA, A.; LUGTENBERG, B. J. J.; DE VICENTE, A.; BLOEMBERG, G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v. 103, p. 1950-1959, 2007.

CASTILLO, I.; OJEDA, J.; MEGÍAS, E.; MANYANI, H.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; PÉREZ-MONTAÑO, F.; BELLOGÍN, R. A.; ESPUNY M. R.; CUBO, M. T.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation of endophytic, epiphytic and rhizosphere plant growth-promoting bacteria from cultivated rice paddy soils of the Guadalquivir river marshes. **Global Advanced Research Journal of Agricultural Science (GARJAS)**, v. 4, n. 3, p. 127-136, 2015.

CASTRO, R. A.. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga - SP**. 2011. 93p. Dissertação Mestrado em Ciências (Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

CASTRO, C. M.; DEVIDE, A. C. P.; ANACLETO, A. H. Avaliação de acessos de Pinhão Manso em sistema de Agricultura Familiar. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, p. 41-49, 2008.

CASTRO, P. R. C.; SANTOS, V. M.; STIPP, S. R. Nutrição vegetal e biorregulação no desenvolvimento das plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 139, p. 9-15, 2012.

CASTRO, R. A.; QUECINE, C. Q.; LACAVA, P. T.; BATISTA, B. D.; LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; FERREIRA, A.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springerplus**, v. 3, p. 1-9, 2014.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 36p, 1999. (Embrapa Soja. Documentos, 139)

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G. Traits associated with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). **Tópicos em Ciência do Solo**, Campinas, v.1, n.1, p.231-234, 2000.

CERLIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2005. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2005.

CHANDRASEKARAN, M. Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario. **Journal Marine Biotechnology**, India, v. 5, p. 86-89, 1997.

CHAPOLA, R. G. **Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em mudas só sulco de plantio**. 2010. 77pp.

Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterizations of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 121-128, 2000.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, v. 157, p. 503-523, 2003.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; BONATTO, A. C.; HUERGO, L. F.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Nitrogen fixation control in *herbaspirillum seropedica*. **Plant Soil**, v. 356, p. 197-207, 2012.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p. 1880-1883, set, 2009.

CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica, 1956. 231p.

DALAL, J.; KULKARNI, N. Antagonistic and Plant Growth Promoting Potentials of Indigenous Endophytic Bacteria of Soybean (*Glycine max* (L) Merrill). **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v.1, p. 62-69, 2013.

DE BARY. A. Morphologie und Physiologie Pilze, Flechten, und myxomyceten. **Hofmeister's Handbook of Physiological Botany**. Vol. 2. Leipzig, 1866.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 14-34, 2009.

DI CELLO, F.; BEVININO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4485-4493, 1997.

DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPÇÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 189-195, 2009.

DIAS, L. A. dos S.; **Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.): para produção de óleo combustível**, Viçosa, Editora UFV, 2007. 40p.

DIAS A. CF, COSTA FEC, ANDREOTE FD, LACAVA PT, TEIXEIRA MA, ASSUMPÇÃO LC, ARAÚJO WL, AZEVEDO JL, MELO IS. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, p. 189-195, 2009.

DJAFAR, A.; PURWADARIA, T.; SINURAT. A. P. Isolation of endophytic bacteria from palm oil fruits and characterization of their lipases. **Microbiol Indones**, v. 4, n. 2, p. 69-74, 2013.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Washington, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; BODDEY, R. M. Nitrogen fixation in association with gramineae. **Current Perspectives in Nitrogen Fixation**, Gibson, A. H; Newton, W.E. (eds), Canberra: Aust.Acad.Sci., p. 305-312, 1981.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and Economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 771-774, 1997.

DUARTE, G.M.; CERIBELLI, M. G. A.; CARDOSO, A. M.; DORNELLES, M. S.; SOUCHIE, E. L. População de micro-organismos solubilizadores de fosfato de cálcio na rizosfera de milho transgênico e crioulo, cultivados com solo de agroecossistemas em Urutaí, GO. In: Resumos do IV Seminário de Agroecologia do Distrito Federal e Entorno - Brasília/DF. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 3, 2014.

DUKE, J. A. **Handbook of energy crops**. 1983. Disponível em <http://C:\WINDOWS\TEMP\purdue_university.htm>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2015.

DURÃES, F. O.; LAVIOLA B. **Pinhão manso: matéria-prima potencial para produção de biodiesel no Brasil**. Brasília, D.F.: Embrapa Agroenergia, 2010.

DVORNIKOVA, T. P.; SKRIABIN, G. K.; SUVOROV, N. N. Enzymatic transformation of tryptamine by fungi. **Mikrobiologiya**, Moskva, v. 39, p.42-46, 1970.

EADY, R. R.; POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature EMBO Reports**, London, v. 249, p. 805-810, 1974.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

EGUIA, M. T. J. **Pinhão manso e biodiesel**. In: SEMINÁRIO POTENCIAL DO PINHÃO- MANSO PARA O PROGRAMA NACIONAL DE BIODIESEL, Brasília - DF. Seminário. UnB, 2006.

EL-DEEB B., FAYEZ K., GHERBAWY Y. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities, **Journal of Plant Interactions**, v. 8, p. 56-64, 2013.

ENZIMAS. **Food Ingredient Brasil** n. 10, p. 40-60, 2009 Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/166.pdf>> Acesso em: 10 de abril de 2015.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

ETESAMI H.; ALIKHANI H.A., HOSSEINI H.M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. **MethodsX**, v. 2, p. 72-78, 2015.

FERRARI, J. T. Podridão negra do abacaxi. Divulgação Técnica. **Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p.49-51. 2009.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, J. E. F.; GOMES, E. A.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 522-534, 2009.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma strain*. **Enzyme Research**, volume 2012, Article ID 793708, 7p.

FOIDL, N.; FOIDL, G.; SANCHEZ, M.; MITTELBAACH, M.; HACKEL, S. *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicarágua. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 1996.

FRANCO, D. A. S.; GABRIEL, D. Aspectos fitossanitários na cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de biodiesel. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 63-64, 2008.

FRANCHE, C.; LINDSTROM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**, v. 321, p. 35-59, 2009.

FREITAS, J. R.; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.358-364, 1997.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a b-1,3 glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25: 9, 1211-1221, 1993.

GAVIRIA, L. M. G.; BEDOYA, J. F. S. Obtención de biodiesel a partir del aceite de la semilla de *Jatropha curcas* L. (piñón) y evaluación de los parámetros autoecológicos de la planta. 2008. 112 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em)–Universidad de Medellín, Medellín, 2008.

GEORGES, K.; JAYAPRAKASAM, B.; DALAVOY, S. S.; NAIR, M. G. Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from *Burkina Faso*, **Bioresour Technol.**, v. 99, n. 6, p. 2037-45, 2008.

GERPEN J. V.; KNOTHE, G. Biodiesel production. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J. (Ed.). **The biodiesel handbook**. Urbana: AOCS Press, cap. 4, p. 26-42, 2004.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 621-634, jun. 1997.

GHOSH, A.; MAITY, B.; CHAKRABARTI, K.; CHATTOPADHYAY, D. Bacterial diversity of east calcutta wet land area: possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. **Microbial Ecology**, Washington, v.54, p.452-459, 2007.

GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. **Bioenergia no Estado de São Paulo: situação atual, Perspectivas, barreiras e propostas**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008.

GONÇALVES, J. L. M.; SANTARELLI, E. G.; MORAES NETO, S. P.; MANARA, M. P. Produção de mudas de espécies ativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J. L. M; BENEDETTI, V (Ed.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicava: IPEF, p. 310-350, 2000.

GONZÁLEZ-LÓPEZ L., RODELAS B., POZO C., SALMERÓN-LÓPEZ V., MARTÍNEZ-TOLEDO M.V., SALMERÓN V. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. **Amino Acids**, v. 28, p. 363-367, 2005.

GOUR, V. K. Production practices including post harvest management of *Jatropha curcas*. In: SINGH, B.; SWAMINATHAN, R.; PONRAJ, V. (Eds.). **Biodiesel conference towards energy independence: focus on *Jatropha***. New Delhi: Rashtrapati Bhawan, p. 223-251, 2006.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, n. 37, p. 395 - 412, 2005.

GRIFFIN, M. F. Biocontrol and Bioremediation: Two Areas of Endophytic Research Which Hold Great Promise. In: Verma, V. C.; Gange A. C. (eds.), **Advances in Endophytic Research**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 231-256, 2014.

GÜBITZ, G. M. et al. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, Fayetteville, n. 67, p. 73-82, 1999.

GUPTA G.; PANWAR J.; JHA P.N. Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 252-261, 2013.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.245, p. 83-93, 2002.

HANDELSMAN J, STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **Plant Cell**, v.8, p.1855–1869, 1996

HALMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HE, R., WANG, G.; LIU X.; ZHANG, C.; LIN, F. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p.191-195, 2009.

HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L.: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. 1 ed. Roma: IPGRI, 1996. 66p.

HENDRICKSON, H.S. Lipases part A: biotechnology. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v. 284, p. 146-146, 1997.

HENNING, R. Use of *Jatropha curcas* oil raw material and fuel: an integrated approach to create income and supply energy for rural development – experiences of the *Jatropha* project in Mali, West Africa. In: INTERNACIONAL FOLKCENTER FOR “RENEWABLE ENERGY – A VEHICLE FOR LOCAL DEVELOPMENT”, 2, 2000, Denmark. **Proceedings of the...** Denmark: [S.n.], 2000. p. 1-4.

HENNING, R. K.; **The *Jatropha* System An integrated approach of rural development**. Gruebels 24, D-88138 Weissensberg, Germany. 106 p. 2009.

HUNG, P. Q.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.) **Omonrice**, v. 12, p. 92-101, 2004.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, Cibinong, v. 4, n. 1, p. 27-31, 2003.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; CARTER, H. D.; AHMER, B. M.; STONE, J. M.; TRIPLETT, E. D. W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 2, p. 169-178, 2005.

JAEGER K. E.; EGGERT T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, New York v. 13, p. 390-397 2002.

JAEGER, K. E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJAKSTRA, B. W.; SCHIMOSSEKE, K.; ZONTA, A.; REETZ, M. T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, The Netherlands, v.3, p. 3-12, 1997.

JALGAONWALA, R. E.; MAHAJAN, R. T. Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from some indigenous medicinal plants. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, n. 6, p. 1733-1741, 2011.

JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil**, v. 356, p. 1-3, 2012.

JESUS, M. F. C. P., BRANCO, R. N; SANT'ANNA JR., G.L; FREIRE, D. M. G.; SILVA JR., J.G. "*Penicillium restrictum* lipases: A comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity", **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 1999.

JI, H. S.; GURURANI, M. A.; CHUN, S.C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 69, p. 83-98, 2014.

JOHNSTON, M.; HOLLOWAY, T. A global comparison of national biodiesel production potentials. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 23, p. 7967-7973, 2007.

JULIATTI, F. C.; BIANCO-JUNIOR, R. D.; MARTINS, J. A. S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodoeiro produzidas nas regiões do triângulo mineiro e sul de Goiás. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 24-31, 2011.

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. Principais doenças de anonáceas no brasil: descrição e controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, edição especial, p. 55-64, 2014.

KÄMPFER, P. Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria. In:Development in Plant and soil science: First International Meeting on Microbial phosphate Solubilization, Salamanca, Spain, **Anais**. Netherlands, p.101-106, 2003.

KANNAN, R.; DAMODARAN, T.; UMAMAHESWARI, S. Sodicy tolerance in polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 350-359, 2015.

KANG, S. M., JOO, G. J., HAMAYUN, M., NA, C. I., SHIN, D. H., KIM, H. Y., HONG, J.K. ;LEE, I.J. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, v.31, p. 277- 281, 2009.

KAZLAUKAS, R.J. BORNSCHEUER, U.T. Biotransformation with lipases. In: (Ed.) KELLY, D.R. **Biotechnology**. New York: Wiley Weinheim VCH, 1998. p. 37-191.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KLOEPPER, J. W. Current Status and Future Trends in Biocontrol Research and Development in the U.S. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CLEAN AGRICULTURE, 1997, Japão. **Anais Simpósio**. Japão, p. 49-52, 1997.

KOBAYASTI, L.; ADORIAM, A. I.; PAIVA NETO, V. B.; ALVES, C. Z.; ZUFFO, M. C. R. et al. Incidência de fungos em semestres de pinhão-mansão. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.41, n.3, p. 385-390, 2011.

KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression, **Research in Microbiology Granada**, v. 162, p. 426-425, 2011.

KRIKORIAN, A.D. Propagación clonal in vitro. In: ROCA, W.M.; MRROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**: Fundamentos e aplicaciones. Cali: CIAT, p. 970, 1991.

KUMAR, G.P.; YADAV, S.K.; THAWALE, P.R.; SINGH, S.K & JUWARKAR, A.A. Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and *Azotobacter* - A greenhouse study, **Bioresour Technol.**, v. 99, n. 6, 2078-82, 2008.

KUNKLINSKY-SOBRAL, J. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174p. Tese (Doutorado)Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2003.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential in Agrobiological System. In: Maheshwari D. K.; Sarah M.; Aeron A. (eds.), **Bacteria in Agrobiological: Crop Productivity**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 1-44, 2013.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. In: Verma, V. C.; Gange A. C. (eds.), **Advances in Endophytic Research**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 231-256, 2014.

LAGEIRO M. M.; MOURA M. J.; REIS A.; FERREIRA M. J. C. Microbial proteases application in leather industry. **Journal of Biotechnology** v. 131, p. 211-241, 2007.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promoting of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.40, p.238-246, 2008.

LIFSHITZ, R.; KLOEPPER, J.W.; KOZLOWSKI, M.; SIMONSON, C.; CARLSON, J.; TIPPING, E.M.; ZALESKA, I. Growth promotion of canola (rape-seed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.390-395, 1987.

LIU, C. H.; CHEN, X.; LIU, T. T.; LIAN, B.; GU, Y.; CAER, V.; XUE, Y. R.; WANG, B. T. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 in vitro and identification of its antifungal components. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, p. 459-466, 2007.

LÓPEZ-VALDEZ, F.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; CEBALLOS-R AMÍREZ, J. M.; MARSCH, R.; OLALDE-PORTUGAL, V.; DENDOOVEN, L. A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily Scientia XXX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO “Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global” **Horticulturae, Mission**, v. 128, p. 499–505, fev. 2011.

LUGTENBERG B.J., KAMILOVA F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.63, p. 541–556, 2009.

LUO, M. J.; YANG, X. Y.; LIU, W. X.; XU, Y.; HUANG, P.; YAN, F.; CHEN, F. Expression, purification and anti-tumor activity of curcuma, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (Shanghai). V. 38, n. 9, p. 663-668, 2006

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 2, p. 128-134, 2006.

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R. R.; PAULITZ, T. C.; BENHAMOU, N. 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**, London, v. 50, p. 301-320, 1997.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1729-1735, 2008.

MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M. de; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R. de F.; LIMA, J.M. de; MOREIRA, F.M. de S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2011. 486p.

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

MARTINAZZO, R.; RHEINHEIMER, D. S.; GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; KAMINSKI, J. Fósforo microbiano do solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 563-570, 2007.

MASTRETTA, C. et al. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton, v. 11, n. 3, p. 251-267, 2009.

MATARESE F, SARROCCO S, GRUBER S, SEIDL-SEIBOTH V, VANNACCI G. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. **Microbiology**, v.158, n. 1, p.98–106, 2012.

MATTEI, L. F., **Programa nacional para produção e uso do biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios.** Disponível em <<http://www.sober.org.br/palestra/9/79.pdf>> acessado em 18 de Abril de 2015.

MATOS, A. P. Manejo integrado da podridão-negra do fruto do abacaxizeiro. **Abacaxi em foco**, Cruz das Almas, n.34, 2005. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br>>. Acesso em: 25 fevereiro de 2015.

MEHDIPOUR-MOGHADDAM, M.J. et al. Novel phytase and cellulase activities in endophytic *Azospirilla*. **World Applied Sciences Journal**, v. 10, p.1129-1135, 2010.

MELO, M.F.V.; SANTOS, H.O.; SILVA-MANN, R., MESQUITA, J.B. **Fungos associados a sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2007. Disponível em: www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura/46.pdf. Acesso em: 20 de fevereiro de 2015.

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

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAUJO, W.L. & RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7259-7267, 2007.

MINOTTO E, MILAGRE L.P.; OLIVEIRA M.T.; VAN DER SAND S.T. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, p. 16-23, 2014.

MINUZZI. M.D.; CAMPONOGARA, F.C.; GABRIEL, M. **A crise ambiental e a necessidade de formação de um novo paradigma ecológico**. In: Congresso Latino Americano de Sustentabilidade Socioambiental. 2012. Anais... 2012.

- MIRA, G. E. M.; SIERRA, J. F. S. **Obtención de biodiesel a partir del aceite de la semilla de *Jatropha curcas* L. (piñón) y evaluación de los parámetros autoecológicos de la planta.** 2008. 112 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental)–Universidad de Medellín, Medellín, 2008.
- MISAGHI I. J.; DONDELINGER C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v. 80, p. 808-811, 1990.
- MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 7-13, 2005.
- MORADI, H. et al. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. **Plant Omics Journal**, v.5, n.2, p.68-74, 2012.
- MORAES, H.D.; MENTEN, J.O.M. Transmissão de *Alternaria* spp. através de sementes de feijão e seu efeito sobre a qualidade fisiológica das sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 381-383, 2006.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2.ed. atual. e ampl. Lavras, UFLA, 2006. 729 p.
- MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1; p.74-99; 2010.
- MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio.** 2009. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/NetNitro.htm>>. Acesso: 08 fevereiro de. 2015.
- MORSY, E. M. et al. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v.37, n.1, p.47-57, 2009.
- MUNCH, E.; KIEFER, J.F. Purging nut (*Jatropha curcas* L.) multiple use plant as a source of fuel in the future. **Schriftenreihe der Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit**, Stuttgart, v. 209, n.1, p 32, 1989.
- MUNEES, A.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, p. 1-20, 2014.
- NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; WISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 603-612, 2001.
- NASCIMENTO, S. M. C ; CARVALHO, E. A. ; ISHIDA, A. K. N. ; OLIVEIRA, J. S. F. ; SANTOS, T. P. F . **Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Thielaviopsis paradoxa***

e *Rhizoctonia solani* 'in vitro'. In: XXXVI Congresso Paulista de Fitopatologia, 2013, São paulo. XXXVI Congresso Paulista de Fitopatologia - Supplement. Botucatu: Summa Phytopathologica, v. 39, p. 165-165. 2013.

NEERGAARD, P. **A review on quarantine for seed**. Copenhagen: CNAS, 1980.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sorvier, 2002. 975p.

NEVES, W. S.; PARREIRA, D. F. Avaliação fitossanitária de sementes de pinhão-manso provenientes dos Vales do Jequitinhonha e mucuri. **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 3, n. 2, p.17-23, 2009.

OLIVEIRA. F. A.; OLIVEIRA FILHO. A. F.; MEDEIROS. J. F.; ALMEIDA JÚNIOR. A. B.; LINHARES, P. C. F. Desenvolvimento inicial da mamoneira sob diferentes fontes e doses de matéria orgânica, **Caatinga**, v.22, n.1, p.206-211, 2009.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

OWEN. A; ZDOR, R.. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental *glycine*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.801- 809, 2001.

PADILHA, D.; MONTERROSO, D. Diagnostico preliminar de enfermedades del cultivo de tempate (*Jatropha curcas*) en Nicaragua. **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v. 51, n. 1, p. 66-69, 1999.

PATIL, N. B.; GAJBHIYE, M.; AHIWALE, S. S.; GUNJAL, A. B.; KAPADNIS, B. P. Optimization of indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from sugarcane. **International Journal of Environmental Sciences**, v.2, p.295-302, 2011.

PARK, K. H.; LEE, O. M.; JUNG, H. I.; JEONG, J. H.; JEON, Y. D.; HWANG, D. Y.; LEE, C. Y.; SON, H. J. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stresstolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. **Applied and Microbiology Biotechnology**, New York, n. 86, p. 947-955. 2010.

PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: Arsenal enzimático. In: BERGAMIN FLHO, A. KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 19, p. 343-364.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. 2009. 74 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal, 2009.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 284p.

PEIXOTO NETO, P. A de S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 70-84, 2003.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Micro-organismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PELZER, G. Q. **Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias**. 2010. 78p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.

PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho. In: H. Kimati, L. Amorim, J. A. M. Rezende, A. Bergamin Filho, L. E. A. Camargo. **Manual de Fitopatologia**, Editora Ceres, p. 477- 488. 2005.

PERES, N.A.R.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, v.87, p.750, 2003.

PÉREZ-GARCÍA, A., ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, p.187-193, 2011.

PERNEZNY, K.; ELLIOTT, M.; PALMATEER, A.; HAVRANEK, N. **Review Guidelines for Identification and Management of Plant Disease Problems: Part II. Diagnosing Plant Diseases Caused by Fungi, Bacteria and Viruses**. University of Florida Extension Publication, p. 249, 2014. <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/ed/MG/MG44200.pdf>>. acesso em 22 de abril de 2015.

PHETCHARAT, P.; DUANGPAENG, A. Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production. **Procedia Engineering**, v. 32, p. 177-183, 2012.

PIDELLO, A. The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production on the soil redox status. **Plant and Soil**, v. 253, p. 373-379, 2003.

PINOTTI, M. M. Z.; SANTOS, J. C. P. From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. **Ciência Rural** [online]. v. 43, n.10, p. 1797-1803, 2013.

PIZZINATTO, M. A.; CIA, E.; PARISI, J. J. D.; MEDINA, P. F.; FUZATTO, M. G. Associação de *Alternaria macrospora* e *A. alternata* a sementes de algodoeiro e sua ação patogênica. **Summa Phytopathologica**, v.31, p.311-318, 2005.

PONTES, M. H.; SZABO, A.; GRIFFITHS, M. D. The impact of Internet-based specific activities on the perceptions of Internet addiction, quality of life, and excessive usage: A cross-sectional study. **Addictive Behaviors Reports**. p. 19-25, 2015.

PRASSAD, M. P.; DAGAR, S. Identification and characterization of Endophytic bacteria from fruits like Avacado and Black grapes. **International Journal Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 8, p. 937-947, 2014.

PULZ, P.; MASSOLA JR., N.S. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 121-126, 2009.

PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, O. A. **Pinhão-Manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986. 7p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos** Vol. 2. Ed. da Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, 2002. 829p.

QUECINE, M. C.; ARAÚJO, W. L.; ROSSETO, P. B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P. T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 21, v.78, p. 7511-7518, 2012.

QUECINE, M.C.; BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T. Diversity and biotechnological potential of plant-associated endophytic bacteria. In: Kumar, P. Ananda.; Govil, J. N. **Biotechnology: Plant Biotechnology**, v. 2, p. 377-424, 2014.

RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 881-887, 1997.

RAMOS, D. P.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; PANIZZI, R. C.; VIEIRAR. D. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 24-31, 2014.

RAMOS, H. P.; BRAUN, G. H.; PUPO, M. T.; SAID, S. Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrimum* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immersa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 3, p. 629-632, 2010.

RANNO, S. K.; SILVA, L. S.; MALLMANN, F. J. K. Fracionamento do fósforo inorgânico em solos de várzea do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.47-54, 2007.

RAO, M. B.; TANKSALE A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPAND, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62 p. 597-635. 1998.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHOR S. E. *Biologia vegetal*, 6ª edição. **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro, Brasil, 2001. 906p.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2 ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573p.

REDDY, A. S.; NARASIMHULU, S. B.; SAFADI, F.; GOLOVKIN, M. A plant kinesin heavy chain-like protein is a calmodulin-binding protein. **The Plant Journal**, v.10, p. 9-21, 1996.

REGINATTO, T. S. C. **Diversidade de bactérias associadas a bromélias do Parque Estadual de Itapuã/RS**. 2008. 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

RHEINHEIMER, D. S.; MARTINAZZO, R.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; SILVA, L. S. Amplitude no fósforo microbiano em um argissolo em pastagem nativa submetida à roçada e à introdução de espécies forrageiras com fertilização fosfatada em deferentes épocas. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, p.561-567, 2008.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROSA, L. H.; GONÇALVES, V. N.; CALIGIORNE, R. B.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SALES, P. A.; ROMANHA, A. J.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 420-430, 2010.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; ELSAS, J.D.V. Minireview: molecular microbial ecology. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 135-147, 1997.

ROSCOE, R. **O que muda com a liberação do plantio do pinhão-manso no Brasil?** Catálogo da Indústria do Biodiesel, 2008.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria***. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1995.

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

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINEKOSKI, L.; RTOYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. O. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma spp.* no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, v. 2, p. 203-208, 2009.

SALUSTIANO, M. E.; MACHADO, J. C.; PITTIS, J. E. Patogenicidade de *Alternaria helianthi* (Hansf.) e *Alternaria zinniae* (Pape) ao girassol a partir de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p.138-143, 2005.

SANCHEZ, V.; REBOLLEDO, O. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con Agave tequilana en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagonista contra *Thielaviopsis paradoxa*. **Revista Mexicana de Micología**, v. 32, p. 11-18, 2010.

SANTOS, C. C.; OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, M. S.; TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F. J. *Influência De Trichoderma Spp. sobre o crescimento micelial de Thielaviopsis Paradoxa*. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 8, n. 4, 2012.

SANTOS, J. S.; VIANA, T. O.; JESUS, C. M.; BALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, BAHIA, BRAZIL. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 39, p. 78-85, 2015.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. et al. Cultura do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SCHIMIDT, V. A. **Ocorrência de bactérias endofíticas na cultura do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.)** 2012. 66 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SCHISLER, D. A.; SLININGER, J. P.; BEHLE, W. R.; JACKSON, A. M. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 1267-1271, 2004.

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

SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, p. 1475-1482, 2003.

SELVAKUMAR, G.; KUNDU, S.; GUPTA, A.D.; SHOUCHE, Y.S.; GUPTA, H.S. Isolation and characterization of nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of kudzu (*Pueraria thunbergiana*) and their effect on wheat seedling growth. **Current Microbiology**, v.56, p.134-139, 2008.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do Semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, jul./dez. 2006.

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.

SHODA, M. Review: Bacterial Control of Plant Diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SILVA, M. C. S. **Bioprospecção e caracterização de micro-organismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.)**. 2015. 78p. Dissertação Mestrado em Ciências (Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

SILVA FILHO, S. N. G.; NARLOCH, C.; SCHARF, F. Solubilização de fosfatos naturais por micro-organismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SILVA, C. A. V.; SILVA, F. E.; TABOSA, N. J. Comportamento de genótipos de arroz de terras altas na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.10, p.1030-1037, 2010.

SILVA, H. S. A.; TOZZI, J. P. L.; TERRASAN C. R. F.; BETTIOL, W. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, v. 63, P. 62–67, 2012.

SILVEIRA, E. L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. 2008. 83 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, fev. 2008.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S. de; MINHONI, M. T. de A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. 3^a ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1980. 150p.

SONG, O.R.; LEE, S.J.; LEE, Y.S.; LEE, S.C.; KIM, K.K.; CHOI, Y.L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 151-156. 2008.

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 329-334, 2005.

SOUSA, M. T. B. Análise da utilização do biodiesel como alternativa para o desenvolvimento sustentável. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 1., 2006, Natal. **Anais...** Natal: Editora, 2006.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 195-203, 2009.

SOUZA, J. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; LUZ J. M. Q.; AMARAL, C. L. F.; FIGUEIREDO, R. M.; SANTANA, C. M. P. Potencialidade de fungicidas biológicos no controle de requeima do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 115-119, 2014.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB, Araujo J.M Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 137-141, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial 211 Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, jul./dez. 2011 Aplicação de micro-organismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G. A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, Great Britain, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 534-535, 2003.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, n. 15, p. 183-190, 2000.

SUAREZ, P. A.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

SWOT. **Summary of current knowledge: an industry and market study of plant products from five trees in Southern Africa – jatropha or physic nut.** Washington, 2002. 15 p. Relatório de Projeto, Internacional Programs Washington State University, Washington, 2002.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; IKEDA, A. C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVACORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express – Springer**, v. 4 (26), p. 9, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 559p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**.4.ed Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

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

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 18- 27, 2005.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. Micro-organismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 43-49, 2007.

TEJESVI, M. V.; NALINI, M. S.; MAHESH, B.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SHETTY, H. S.; SUBBIAH, V. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Boletín de la Sociedad Química de México**, Querétaro, v. 1, n. 1, p. 19-26, 2007.

THYS R. C. S.; GUZZON S. O.; OLIVERA F. C.; BRANDELLI A. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 67-73, 2006.

TÖFOLI, J.G. ; DOMINGUES, R. J. ; FERRARI, J. T.; NOGUEIRA, Eduardo Monteiro de Campos . Doenças Fúngicas da Oliva: sintomas, etiologia e manejo. **O Biológico** (Online) (São Paulo), v. 75, p. 53-61, 2013.

TSUI, S. **Diversidade de bactérias endolíticas cultiváveis do guaranazeiro e o controle da antracnose**. 2012 69 p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

VASCONCELOS, C. V.; SILVA, D. C.; CARVALHO, D. C. Ocorrência de *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl. em tubérculos de batata, no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.44, n.2, p.219-222, 2014.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.; LOPEZ, E.; CORTES, A; BASHAN, Y. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. **Biol Fertil Soils**, v.30, p.460-468, 2000.

VENDAN, R.T., YU, Y.J., LEE, S.H.; RHEE, Y. H. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. **Journal Microbiology**, v. 48, p.559-565, 2010.

VENUGOPAL, M.; SARAMMA, A. V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1239-1243, 2006.

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

WIJESINGUE, C. J.; WIJERATNAM, R. S. W.; SAMARASEKARA, J. K. R. R.; WIJESUNDERA, R. L. C. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an late of *Trichoderma asperellum*. **Biological Control**, v. 53, p. 285-290, 2010.

WHITAKER, R.H.C. News concepts of kingdoms of organisms. **Science**, Washington, DC, v. 163, p. 150-160, 1969.

WILHELM, E.; ARTHOFER, W.; SCHAFLEITNER, R.; KREBS, B. *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 52, n. 1/2, p. 105-108, 1998.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WULFF, E. G.; MGUNI, C. M.; MORTENSEN, C. N.; KESWANI, C. L.; HOCKENHULL, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *bacillus subtilis* in Zimbabwe. **European Journal of Plant Pathology, Dordrecht**, v. 108, n. 4, p. 317-325, 2002.

ZAMBUDIO, S.; FERREIRA, A. L. Fixação Biológica de Nitrogênio. **XXI Ciência para a Vida**, n. 1, p. 10-15, 2012. Disponível em: <http://revista.sct.embrapa.br/download/XXI_n1_pt.pdf>. Acesso em: 16 de abril de 2015.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

ANEXO A1- Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados de bactérias do pinhão-mansão.

Isolados	FBN^a	ISF^b	AIA^c µg/ml
A1	+	NI*	-
A2	-	-	4,13
1	+	1,76	16,74
2	-	3,39	38,93
4	-	3,05	79,87
5	+	-	-
6	-	2,39	-
7	-	NI*	27,45
8	-	-	45,99
9	-	2,36	-2,27
10	+	-	58,25
12	-	-	10,48
14	-	-	-
15	-	-	0,46
19	-	-	-
20	-	-	51,42
21	-	-	1,72
23	-	NI*	5,71
24	+	-	-
25	+	-	-
26	+	-	-
28	+	-	-
29	+	-	-
31	-	NI*	62,31
32	-	NI*	7,68
33	-	NI*	7,71
34	+	NI*	12,83
35	+	NI*	3,62
36	-	-	0,33
36A	+	1,61	6,21
37	+	-	-
41A	+	1,58	15,97
41B	+	1,63	15,99
42	-	NI*	19,72
43	-	-	4,10
44	+	2,00	-
46A	-	-	14,19
46B	-	-	8,77
47	-	-	20,14
50	-	-	3,49
50 C	-	-	45,25

^aFixação Biológica de Nitrogênio;

^bÍndice de Solubilização de Fosfato

^cConcentração da produção de Ácido Indol Acético bacteriano em µg/mL;

NI* Índice de Solubilização de Fosfato Não Identificado

ANEXO A2- Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados de bactérias endofíticas do presente estudo e seus respectivos resultados (*continuação*).

Isolados	FBN ^a	ISF ^b	AIA ^c µg/ml
53	+	-	-
54A	+	1,64	47,07
55	-	-	13,39
55A	+	-	-
55B	+	-	9,49
58	+	-	0,14
61	+	-	2,12
63	-	4,44	65,37
63B	-	4,53	84,11
63C	-	NI*	51,90
63D	+	-	0,58
66	-	2,92	6,98
66B	-	2,86	6,82
70	+	-	-
73	-	-	3,44
75	-	3,01	5,40
75B	-	-	3,02
77	-	NI*	-
78	-	-	2,40
79	+	-	7,31
80	+	NI*	1,36
81	-	-	-
84	-	NI*	7,63
87A	-	NI*	-
87B	-	NI*	-
88	+	-	-
89	+	-	-
91	-	3,01	15,78
92	+	-	48,45
95	-	-	0,80
96	-	-	56,34

^a Fixação Biológica de Nitrogênio;

^b Índice de Solubilização de Fosfato

^c Concentração da produção de Ácido Indol Acético bacteriano em µg/mL;

NI* Índice de Solubilização de Fosfato Não Identificado

ANEXO B1- Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados de bactérias endofíticas do pinhão-mansão: testes de antagonismo.

Isolados	<i>A. Alternata</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. Verticillioides</i>	<i>C. paradoxa</i>
A1	+	+	+	-
A2	-	-	-	-
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
12	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	+	-	-	-
21	+	-	-	-
23	-	-	-	-
24	+	+	+	-
25	+	+	+	-
26	+	+	+	-
28	+	+	+	-
29	+	+	+	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	+	+	+	-
36A	+	-	+	-
37	+	+	+	+
41A	-	-	-	-
41B	-	-	-	-
42	-	-	-	-
43	-	-	-	-
44	+	-	-	-
46A	+	-	-	-
46B	+	-	-	-
47	-	-	-	-
50	+	-	-	-
50C	-	-	-	-
53	+	+	+	-

Anexo B2- Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados de bactérias endofíticas do pinhão-mansão: testes de antagonismo (*continuação*).

Isolados	<i>A. alternata</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>C. paradoxa</i>
54A	-	-	-	-
55	-	-	-	-
55A	+	+	+	-
55B	+	-	-	-
58	+	+	+	+
61	+	+	+	+
63	-	-	-	-
63B	-	-	-	-
63C	-	-	-	-
63D	+	+	+	+
66	-	-	-	-
66B	-	-	-	-
70	+	+	+	+
73	-	-	-	-
75	-	-	-	-
75B	-	-	-	-
77	-	-	-	-
78	-	-	-	-
79	-	-	-	-
80	-	-	-	-
81	-	-	-	-
84	-	-	-	-
87A	-	-	-	-
87B	-	-	-	-
88	+	-	-	+
89	+	-	-	+
91	-	-	-	-
92	-	-	-	-
95	-	-	-	-
96	-	-	-	-