

**Universidade de São Paulo
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

Maria Carolina dos Santos e Silva

**Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de
isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose
(*Colletotrichum* spp.)**

**Piracicaba
2015**

MARIA CAROLINA DOS SANTOS E SILVA

Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.)

Dissertação apresentada ao Centro de energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Silva, Maria Carolina dos Santos e

Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.) / Maria Carolina dos Santos e Silva; orientador João Lúcio de Azevedo. - - Piracicaba, 2015.

76 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biotecnologia 2. Controle químico 3. Enzimas 4. Guaraná 5. Microbiologia
I. Título

CDU 579.6 : 582.746.46

Dedico e ofereço

*A meus pais Pedro e Sônia pelo incentivo, paciência, dedicação e
muito amor dado e recebido.*

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela vida!

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pelo aprendizado, dedicação, oportunidade e privilégio de tê-lo como orientador.

A Profa. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, ou apenas minha 'xará' Carol, pela amizade e parceria fora e dentro do laboratório.

Ao técnico Zezo pelo apoio e colaboração nas atividades de bancada.

Aos parceiros do laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo": Andrea Ferrari, Sarina, Bruno, Bruna Durante, Jéssica, Jaqueline, Mariana, Andrea Bogas, Joelma, Bruna Pacheco, Lucas, Maria Letícia, Renatinha, Paula (s) pela parceria e ajuda no decorrer do trabalho, e em especial o Tiago e a Renata Assis por toda a ajuda, amizade, paciência e dedicação em todos os momentos, sem vocês não conseguiria finalizar esse trabalho.

A Danice Metal, pela enorme colaboração na finalização do trabalho.

Aos amigos: Prof. Dr. João Pamphile, Adriana, Sandro e Juliana pelo apoio desde o início dessa jornada, pela amizade e carinho mútuo.

As companheiras de república Sheila e Alexys pela amizade e parceria nesses dois anos de convivência.

Aos meus primos Lê, Cláudia e Felipe pela hospedagem, carinho, apoio e descontração.

Ao INPA/AM e UFRB pelo fornecimento das sementes de guaraná com todo cuidado. E ao Laboratório de Micologia da UFPE pela identificação morfológica dos fungos.

A secretaria e comissão do Programa de Pós-Graduação do CENA pelo apoio, informações e dedicação no decorrer dessa jornada.

A Capes/PROEX pelo incentivo de pesquisa e financeiro.

As minhas amadas avós e bisavó Maria(s), aos meus tios: paternos e maternos: (Sandro, Dri, Lu, Vivi, Helena, Pedro, Cléo, Chico, Bal, Vadim, Zé e Val) aos meus queridos primos, em especial Patrícia e Alexandre e minha tia/madrinha Marlene, pelo apoio, carinho e dedicação.

A meus pais pelo suporte físico, mental e emocional.

Ao meu irmão Luis Fernando, minha cunhada Tati e meus sobrinhos Isabela e Pietro, pelo carinho.

Meus amigos de Rio Preto: Dr. Alexandre Mazzo, Rosana, Sérgio, Selma, Larissa, Nathália, Marília, Marina, Vivian, Renan, aos amigos de Maringá: Bruno, Ery, Marina, Mariana, Munira e Mônica, que mesmo distante sempre parceiros, amigos e compreensivos.

Aos meus amigos de Sorocaba: Peterson, Sophia e família, Luciano e família, Carla e família, Morena, Chico, Dani, Luh e Marcel pela amizade, força e paciência em todos os dias, principalmente nos dias de cansaço.

Aos colegas professores, diretoras, coordenadores e aos alunos da Escola Dulce pelo apoio.

Aos amigos do CSA pela alegria e motivação.

A Célia e todo grupo da Shamballa pelo apoio espiritual.

A todos da Igreja São Pedro e São Paulo, Pe. Leonel e Coral, por todas as orações.

E a outros não citados que colaboraram direta e indiretamente com esse trabalho.

Muito obrigada!!!!

*“Tudo posso Naquele que me fortalece”
Filipenses 4:13*

*“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Chaplin*

RESUMO

SILVA, M. C. dos S. e. **Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.)**. 2015. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

A cultura do guaranazeiro, (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) espécie nativa da região amazônica, é de grande importância para o Brasil, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Atualmente, a comercialização do guaraná em rama (sementes torradas) é a maneira mais comumente utilizada na produção de xaropes e extratos de guaraná utilizados principalmente pelas indústrias de bebidas. O Brasil é o único produtor de guaraná no mundo, com destaque para o Estado do Amazonas e a Bahia. Entretanto, a produção de guaraná na região amazônica, centro de origem da planta, vem sendo cada vez mais afetada por condições fitossanitárias desfavoráveis, como a presença da antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum* spp., que não se constitui um problema na Bahia. A finalidade da presente pesquisa foi de comparar microbiota endofítica de sementes dos dois estados na detecção de possíveis causas que poderiam explicar as diferenças de sanidade, além de procurar uma alternativa sustentável para a utilização de microrganismos endofíticos, que vivem no interior dos tecidos vegetais, e tem sido descritos como agentes de controle biológico de doenças através de vários mecanismos, dentre eles a produção de enzimas líticas. Assim, o presente estudo teve por objetivo isolar e identificar bactérias e fungos endofíticos associados à sementes de guaranazeiros provenientes do Amazonas e da Bahia. Esses microrganismos foram também avaliados quanto ao potencial biotecnológico na produção de enzimas e controle da antracnose. Para o isolamento, as sementes passaram por um processo de desinfecção. A análise da produção enzimática foi detectada por meios de culturas específicos e para o estudo da atividade antagonística contra o *Colletotrichum* sp. (L1) foram realizados ensaios *in vitro* por meio de cultura pareada. A identificação dos isolados foi realizada por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA para isolados bacterianos, e da região ITS do rDNA para isolados fúngicos. Não foram encontradas diferenças significativas no número de isolados bacterianos em sementes das duas procedências. Fungos em pequeno número (6) foram isolados apenas de sementes da Bahia. Desses isolados foram selecionadas 102 bactérias, sendo 48 provenientes do Amazonas e 54 da Bahia. Nos testes de antagonismo houve redução de 32% a 64% do crescimento do fungo patogênico *Colletotrichum* por bactérias endofíticas e 8% a 52% pelos fungos endofíticos. Com relação à atividade enzimática, 13 bactérias apresentaram atividade amilolítica, 5 celulolítica, 11 pectinolítica, e 24 proteolítica. Em relação aos fungos endofíticos, todos apresentaram pelo menos uma atividade das enzimas testadas, com exceção de atividade proteolítica. Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Ochrobacterium*, *Rhizobium* e *Microbacterium* foram isolados como endofíticos de sementes de guaraná. Em relação a isolados fúngicos foram encontrados representantes dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Fusarium*. Embora não tenham sido encontradas diferenças substanciais com relação aos endófitos isolados, para explicar a incidência de antracnose no Amazonas em relação à Bahia, os resultados demonstram o potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos

de sementes de guaraná na produção de enzimas e para o controle biológico da antracnose.

Palavras-chave: Microrganismos endofíticos. Guaraná. Controle biológico. Atividade enzimática. *Paullinia cupana*.

ABSTRACT

SILVA, M. C. dos S. e. **Bioprospection and characterization of endophytic microorganisms isolated from guarana seeds and the control of anthracnose (*Colletotrichum* spp.)**. 2015. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) a plant from the Amazon region is of great importance mainly from the Amazonas state both from economic and social points of view. Currently roast seed extracts have been used for the production of soft drinks and medicinal purposes. Brazil is the only guarana producer in the world, being the states of Amazonas and Bahia the main producers in the country. However, guarana production in Amazonas state has been increasingly affected by unfavorable conditions due the plant disease anthracnose caused by fungi from the genus *Colletotrichum*, which is not a problem in Bahia state. The aim of the present research was to compare the endophytic microbiota from seeds derived from the two states, to detect possible causes which could explain plant sanity differences in both regions and also to use endophytic microorganisms as biological controllers, a sustainable alternative to chemical products to control the disease. Endophytic bacteria and fungi from guarana seeds obtained from Bahia and Amazonas regions were isolated and studied as antagonists against *Colletotrichum* sp. strain L1 and also for enzymes production. The isolates identification was performed by partial sequencing the 16S rDNA region for bacterial isolates and rDNA ITS region for fungal isolates. Fungal morphological characterization was also done. We detect few differences between the number of bacteria isolated from Bahia and Amazonas seeds. Although only reduced number of seeds were analyzed, only six fungal isolates were obtained, all from Bahia. A total of 102 bacteria isolates, 48 from Amazonas and 54 from Bahia were selected. Antagonistic tests and enzymatic activities showed that from bacteria tested, 13, 5, 11 and 24 isolates were able to produce amylolytic, cellulolytic, pectinolytic and proteolytic activities respectively. All the six fungal isolates produced the tested enzymes with exception of proteases. From the positive tests, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Ochrobacterium*, *Rhizobium* and *Microbacterium* were the genera isolated from guarana seeds and the genera *Lasiodiplodia* and *Fusarium* were found among the endophytic fungi. Although no clear distinctions among isolated endophytes were found to explain anthracnose differences in Amazonas and Bahia, the results demonstrated the biotechnological potential of selected endophytic microbiota from guarana seeds for enzyme production and *in vitro* control of *Colletotrichum*, the causal agent of guarana anthracnose.

Keywords: Endophytic microorganisms. Guarana; Biological Control. Enzymatic activity. *Paullinia cupana*;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fruto e semente de guaraná.....	32
Figura 2 – Ensaio antagonista para análise qualitativa.....	38
Figura 3 – Inibição de crescimento fúngico pelo isolado bacteriano.....	38
Figura 4 – Teste antagônico fungo endofítico x fungo patogênico.....	39
Figura 5 – A) Bactérias endofíticas isoladas de sementes de guaraná provenientes de Manaus/AM. B) Água do último enxague das sementes como controle de desinfecção.....	45
Figura 6 – Isolamento de fungos endofíticos de guaraná provenientes de Cruz das Almas/BA.....	46
Figura 7 – Teste antagônico de isolados bacterianos contra o fungo fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> L1.....	47
Figura 8 – Teste antagônico de fungos isolados de sementes de guaranazeiro contra fungo fitopatogênico <i>Colletotrichum</i> L1.....	48
Figura 9 – Porcentagem de bactérias que produziram enzimas hidrolíticas.....	49
Figura 10 – Teste qualitativo de produção enzimática por bactérias endofíticas isoladas de sementes de guaranazeiro.....	50
Figura 11 – Teste semiquantitativo de produção de enzimas hidrolíticas por bactérias endofíticas isoladas de guaranazeiro.....	54
Figura 12 – Dendograma determinado pelo método <i>Neighbor-Joining</i> e a relação entre as sequências foi inferida usando método <i>Muscle</i> ; os dados observados nos ramos indicam valores de <i>bootstrap</i> acima de 50%, total de 1000 repetições	56
Figura 13 – Dendograma determinado pelo método <i>Neighbor-Joining</i> e a relação entre as sequências foi inferida usando método <i>Muscle</i> ; os dados observados nos ramos indicam valores de <i>bootstrap</i> acima de 50%, total de 1000 repetições.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de bactérias provenientes de guaraná nas diferentes regiões coletadas.....	45
Tabela 2 - Agrupamento estatísticos do índice de redução do fitopatógeno pelas bactérias endofíticas isoladas de sementes de guaranazeiro.....	47
Tabela 3 - Inoculação dos fungos isolados de sementes de guaranazeiro e suas interações com o fitopatógeno <i>Colletotrichum</i>	49
Tabela 4 - Dados estatísticos e atividade amilolíticas de bactérias endofíticas.....	50
Tabela 5 - Dados estatísticos e atividade celulolítica de bactérias endofíticas	51
Tabela 6 - Dados estatísticos e produção de pectina por bactérias endofíticas.....	52
Tabela 7 - Dados estatísticos e atividade proteolíticas de bactérias endofíticas.....	53
Tabela 8 - Produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados fúngicos.....	54
Tabela 9 - Identificação das bactérias pelo sequenciamento parcial do gene 16S do rDNA.....	55
Tabela 10 - Identificação dos fungos pelo sequenciamento da região ITS do rDNA.....	58
Tabela 11 - Identificação morfológica dos fungos isolados de sementes de guaranazeiro.....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 O guaraná: aspectos culturais e sócio-econômicos.....	21
2.2 Agente causal da antracnose do guaranazeiro.....	24
2.3 Microrganismos endofíticos.....	25
2.4 Controle biológico.....	26
2.5 Produção de enzimas	27
2.6 Análise do gene 16S rDNA para estudos de diversidade em comunidades bacterianas.....	29
2.7 Análise da região ITS do rDNA para estudos de diversidade em comunidades fúngicas.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Coleta de material.....	31
3.2 Isolamento de microrganismos endofíticos.....	31
3.2.1 Isolamento de bactérias endofíticas.....	31
3.2.2 Isolamento de fungos endofíticos.....	32
3.3 Identificação molecular dos isolados bacterianos.....	33
3.3.1 Extração de DNA bacteriano.....	33
3.3.2 Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR.....	34
3.4 Identificação molecular dos isolados fúngicos.....	35
3.4.1 Extração do DNA fúngico.....	35
3.4.2 Amplificação do ITS pela reação de PCR.....	35
3.5 Purificação do DNA, Sequenciamento de regiões 16S e ITS do rDNA e análise das sequências.....	36
3.6 Identificação dos isolados.....	37
3.7 Potencial de biocontrole e biotecnológico dos isolados.....	37
3.7.1 Ensaio de antagonismo com isolados bacterianos.....	37
3.7.2 Ensaio de antagonismo com isolados fúngicos.....	39
3.7.3 Produção de enzimas hidrolíticas.....	40
3.7.3.1 Atividade amilolítica.....	40
3.7.3.2 Atividade celulolítica.....	41

3.7.3.3 Atividade lipolítica.....	42
3.7.3.4 Atividade esterásica.....	42
3.7.3.5 Atividade proteolítica.....	43
3.7.3.6 Atividade pectinolítica.....	43
3.7.3.7 Índice Enzimático e Análise estatístico.....	44
4 RESULTADOS.....	45
4.1 Isolamento de bactérias endofíticas.....	45
4.2 Isolamento de fungos endofíticos.....	46
4.3 Testes Antagônicos.....	46
4.3.1 Antagonismo com isolados bacterianos.....	46
4.3.2 Antagonismo com isolados fúngicos.....	48
4.4 Produção de enzimas hidrolíticas por bactérias isoladas de sementes do guaranazeiro.....	49
4.4.1 Atividade amilolítica.....	50
4.4.2 Atividade celulolítica.....	51
4.4.3 Atividade pectinolítica.....	51
4.4.4 Atividade proteolítica.....	52
4.5 Produção de enzimas por fungos isolados de sementes do guaranazeiro.....	54
4.6 Identificação molecular das bactérias endofíticas.....	55
4.7 Identificação molecular dos fungos endofíticos.....	58
4.8 Identificação morfológica dos fungos.....	60
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Duke) é uma espécie vegetal arbustiva nativa da Amazônia, que produz o fruto conhecido como guaraná. Seu cultivo é de grande importância sócio-econômica para a região, movimentando vários setores da economia. A maior parte da produção brasileira de guaraná é consumida no mercado interno, sendo pequena a quantidade exportada para outros países. Estimativas apontam que cerca de 70% da demanda nacional de sementes de guaraná é absorvida pelos fabricantes de bebidas, enquanto o restante abastece o mercado interno e externo, sendo comercializado na forma de xarope, bastão, pó, extrato e outras.

Há relatos de que civilizações indígenas já faziam um uso abrangente desta planta desde o século XVII, devido às suas propriedades medicinais que atualmente são comprovadas cientificamente, pois a semente apresenta substâncias estimulantes como a cafeína e pode ser utilizada como: antitérmico, antineurálgico, antidiarréico, estimulante, analgésico e antigripal. Apesar de seu potencial e de grande parte de seu genoma já ter sido sequenciado, não existem muitos estudos relacionados à guaranicultura. Assim, pouco se sabe sobre sua genética e sobre as interações microbianas existentes, tanto benéficas como prejudiciais.

Apesar de o guaranazeiro ocorrer naturalmente no Amazonas, este não é o maior e melhor produtor desta cultura. Atualmente, a Bahia destaca-se como o estado brasileiro com a maior produção do guaraná. A principal razão apontada para a baixa produtividade do fruto no estado do Amazonas é a alta incidência de pragas e doenças, e a falta de tratamentos culturais adequados. Dentre esses fatores, a principal baixa na produção do guaranazeiro deve-se à antracnose, uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum* spp.. Esta doença ocorre em todas as fases de desenvolvimento da planta, levando à formação de lesões necróticas de coloração marrom-avermelhada nas folhas e também nos frutos, comprometendo o desenvolvimento e a produtividade.

Atualmente, as únicas medidas de controle da antracnose do guaranazeiro são o manejo da cultura e/ou aplicação de fungicidas químicos em grande escala, que pode promover diversos danos ao meio ambiente, principalmente no frágil equilíbrio da floresta Amazônica, além da indução de resistência no fitopatógeno. Uma alternativa mais sustentável de controlar a antracnose seria o emprego de

controle biológico por microrganismos associados às plantas, como bactérias e fungos. Desta forma, o isolamento das comunidades bacterianas e fúngicas associada ao guaranazeiro podem resultar na descoberta de novas linhagens a serem utilizadas no biocontrole de fitopatógenos, incluindo o *Colletotrichum* spp. O controle biológico por bactérias associadas às plantas pode ocorrer, entre outras coisas, por meio da sua introdução como antagonistas aos fitopatógenos no ambiente onde eles interagem, competição por espaço e nutrientes, indução de resistência sistêmica, e ainda por meio da produção de diversas substâncias, incluindo enzimas hidrolíticas, melhorando, assim, a produtividade e/ou a qualidade da produção do guaranazeiro.

Para tanto, o presente trabalho teve como objetivos: o isolamento de fungos e bactérias endofíticas cultiváveis de sementes de guaranazeiros em duas regiões do Brasil: Amazonas (com ocorrência de antracnose na cultura do guaranazeiro) e Bahia (sem registro da doença); buscando avaliar o potencial biotecnológico dos isolados na produção de enzimas; e a aplicação dos endófitos no controle biológico de *Colletotrichum* spp.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O guaraná: aspectos culturais e sócio-econômicos

O gênero *Paullinia* pertence à família Sapindaceae e dentro deste gênero existem cerca de 200 espécies, sendo 9 consideradas nativas do Brasil (ÂNGELO et al., 2008). O guaraná apresenta duas variedades, *P. cupana* variedade *typica* que ocorre na Venezuela, na Colômbia e Brasil, e a *P. cupana* variedade *sorbilis*, conhecida como guaraná verdadeiro, e que ocorre somente na região central da Amazônia brasileira, principalmente no município de Maués (ARAÚJO et al., 2009).

As espécies de *Paullinia*, denominadas popularmente como “cupana”, “guaraná”, “cipó-timbó”, “timbo” ou “tinguis”, são plantas lenhosas com gavinhas e estípulas, e se caracterizam por apresentar hábito trepador (POLO, 2006).

A palavra guaraná, uarana ou varana significa "videira" em vários dialetos indígenas, e refere-se ao hábito de crescimento liana desta planta perene, que tem gavinhas que se formam na presença de árvores que funcionam como suportes (SCHIMPL et al., 2013).

Os frutos são cápsulas aladas com deiscência septicidal, pedúnculo desenvolvido, pericarpo geralmente subcarnoso e avermelhado. Quando imaturos possuem cor verde escura; quando maduros a cor varia de amarelo-laranja para amarelo-vermelho ao vermelho brilhante. As sementes (um a três por fruto) são castanho escuras com uma textura crustácea, parcialmente envolvida por um arilo branco gredoso que parece proteger o embrião contra perda de umidade. A fruta madura aberta expõe o arilo branco. A semente escura, em contraste com a cor vermelha do material de reserva do fruto, se assemelha a um olho humano, que representa uma característica marcante para a identificação desta espécie (POLO, 2006; SCHIMPL et al., 2013).

O guaraná é uma planta que se desenvolve bem em áreas de clima tropical chuvoso e requer precipitações médias anuais superiores a 1.300 mm. A temperatura média anual ideal para seu cultivo oscila entre 23° C e 28° C, a umidade relativa do ar deve estar acima de 80%, e não suporta ventos frios. Os solos para a cultura devem ser profundos, bem drenados, de textura média, topografia levemente ondulada e não sujeito a inundações. Os solos de baixa fertilidade e elevada acidez predominam na Amazônia, o que limita a utilização para

a agricultura (SANCHEZ et al., 1982). Uma alternativa econômica e ecologicamente equilibrada é o uso de solos com sistemas agroflorestais (SAFs), pois esses sistemas imitam de certa forma a floresta primária, mas com a vantagem de serem mais ricos em espécies importantes para o homem (OLIVEIRA, 1991). O guaranazeiro é uma das espécies perenes de grande importância regional cultivada em SAFs e pequenas áreas de monocultivo (FIGUEIREDO; MACÊDO; CRAVO, 2000).

Em 2006 a área plantada com guaraná no país correspondia a 15.356 ha, com uma produção de 2.989 toneladas de sementes secas e produtividade média de 229 kg/ha (IBGE, 2006). Apesar da origem amazônica do guaraná, o estado da Bahia é atualmente o maior produtor agrícola de guaraná no Brasil (46,9%) seguida do Amazonas (38,6%), Mato Grosso (9,7%), Acre (2%), Rondônia (1,6%) e Pará (1,2%), sendo que o valor da produção nacional, em milhões de reais foi de 13,6 em 2006 (IBGE, 2006; ATROCH, 2009). Dados mais recentes (IBGE, 2011) revelam que a produtividade média de guaraná no Brasil é de 303 Kg/ha sendo que esta média no Amazonas é de 205 Kg/ha, bem menor que a média da Bahia com 404 Kg/ha. A estimativa de produção para 2014 é de 637 toneladas para o estado do Amazonas e 2691 toneladas para a Bahia sendo o total para o Brasil de 3567 toneladas. Bezerra (2014) mostra o papel negativo da antracnose no Amazonas em comparação com sua ausência no estado da Bahia. Com valores tão expressivos, o Brasil é o único produtor de guaraná em escala comercial do mundo, com possibilidade real de expansão, o que incrementaria a economia regional. Os principais produtos oriundos dessa cultura são vendidos em forma de xarope, pó, refrigerante e outros subprodutos.

O primeiro exame químico de sementes de guaraná foi realizado no século XVIII pelo botânico alemão Theodore von Martius ao isolar uma substância cristalina amarga, branca, com notáveis propriedades fisiológicas. Esta substância foi nomeada *guaranina*, e mais tarde foi renomeado cafeína (BASILE et al., 2005). Dentre as características que mais impulsionam o consumo do guaraná, destaca-se a cafeína, presente em altos teores, principalmente nas sementes (TFOUNI et al., 2007).

Os indígenas têm utilizado por séculos o guaraná como produto medicinal e alimentício e seu cultivo tem servido como meio de redução dos efeitos negativos da agricultura itinerante, contribuindo para a fixação e integração do homem ao campo. A cultura e comercialização do fruto movimentam mais de 3000 pequenos produtores só na região de Maués e emprega direta e indiretamente milhares de habitantes do estado (EMBRAPA, 2005).

A forma mais antiga de se comercializar o guaraná é em bastão, método desenvolvido pelos índios na região de Maués. No entanto, a difusão do produto no sertão de Goiás e Mato Grosso elevou o preço do guaraná, o que estimulou o interesse dos “civilizados” a concorrer com os indígenas de Maués. Assim, desde 1886 o guaraná começou a ser cultivado. No Amazonas e principalmente no Mato Grosso existe uma grande demanda por este tipo de produto. Após torrado, elimina-se o casquilho do grão e este é triturado e pilado ou somente pilado (artesanal) misturando-se com água, formando uma pasta consistente que será moldada na forma de bastão, conhecida por panificação. O bastão passa por um processo de desidratação, conhecido por defumação prolongada, o que consolida o formato comercial. O bastão normalmente é ralado para ser transformado em pó e então é consumido (EMBRAPA, 2005).

Atualmente, a comercialização do guaraná em rama (sementes torradas) é a maneira mais comum, utilizada na produção de xaropes e extratos de guaraná, mas também a de menor valor agregado. Os produtores de guaraná em rama de Maués encaminham sua produção atualmente para quatro canais distintos de comercialização, e o principal é a venda para indústrias de bebidas que é responsável por cerca de 70% da produção total. A AMBEV manufatura o xarope consumido pelas fábricas de refrigerantes em todo o país. Outra importante via de comercialização é a exportação dos derivados do guaraná como chás, comprimidos e sachês para vários países: Japão, França, Reino Unido e Estados Unidos.

O rendimento da guaranicultura está diretamente relacionado à colheita dos frutos, pois o guaranazeiro apresenta frutificação desuniforme dentro de uma mesma planta, o que determina a necessidade de se proceder à colheita pelo menos duas vezes por semana, e esta é feita manualmente com uma tesoura de poda, retirando-se o cacho todo, quando todos os frutos estiverem maduros e com 50% deles abertos, caso contrário a coleta deve ser individual. (EMBRAPA, 2005). Embora poucos estudos tenham sido conduzidos com o guaranazeiro, estudos de genética

molecular já foram desenvolvidos com isolamento de sequências de cDNA (ÂNGELO et al., 2008) e a análise das sequências expressas revelaram a existência de genes para produção de alcaloides, especialmente de cafeína (FIGUEIREDO et al., 2011). Também análise proteômica de alta resolução foi conduzida a partir de pericarpo de frutos de guaraná (SOUZA et al., 2014)

2.2 Agente causal da antracnose do guaranazeiro

O agente causal da antracnose no guaranazeiro é um fungo classificado como *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque, descrito por Albuquerque em 1961. Entretanto, a taxonomia desta espécie de *Colletotrichum* ainda não é reconhecida pela revisão mais recente do gênero realizada por Sutton (1992). Estudos relacionados com a interação *Colletotrichum* spp.-hospedeiros são comuns na literatura, mas pouco se sabe sobre o patossistema *Colletotrichum*-guaranazeiro envolvendo seus microrganismos.

O gênero *Colletotrichum* engloba diferentes espécies causadoras de doenças em muitos hospedeiros (BAILEY; JEGGER, 1992). São diversas as estratégias de invasão utilizadas pelo fungo nos tecidos da planta e também há uma diversidade de estruturas de infecção especializadas apresentadas por estes patógenos incluindo, tubos germinativos, apressórios, haustórios e acérvulos (SILVA et al., 2006).

O sintoma típico da doença é caracterizado por lesões arredondadas, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada, podendo ocorrer uma podridão-mole nos frutos, inviabilizando sua comercialização (SILVA et al., 2006).

Este gênero *Colletotrichum* é também responsável por uma diversidade de doenças de clima tropical como a podridão de pedúnculo e varicela em manga, abacate, caju (FIGUEIREDO et al., 2012a e 2012b), mamão (BAILEY; JEGGER, 1992), pimenta (GOMES; SERRA, 2013; SUN et al., 2015), banana (CRUZ et al., 2013). Ainda assim, a antracnose é a principal doença de frutos em pós-colheita, sendo considerada doença de elevada importância econômica (SILVA et al., 2006).

2.3 Microrganismos endofíticos

Endófitos são aqueles microrganismos que colonizam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais saudáveis como folhas, ramos e raízes, sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Essa comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, e ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causa prejuízos à planta hospedeira (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2003). Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição do termo “microrganismo endofítico”, considerando a definição anterior, e, adicionalmente, dividindo os endófitos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. Dessa forma, são incluídos, por definição, os fungos micorrízicos, bactérias simbióticas nodulantes no Tipo II e excluídos os microrganismos epifíticos e patogênicos.

Nos últimos anos, muitos trabalhos vêm relatando a presença de microrganismos no interior de tecidos vegetais assintomáticos abrindo, assim, perspectivas para o estudo das interações entre plantas e microrganismos endofíticos (AZEVEDO et al., 2000).

Aproximadamente 300.000 espécies vegetais existem no planeta Terra e, cada planta individualmente, é hospedeira de um ou mais endófitos (STROBEL et al., 2004). Entretanto, apenas uma pequena parcela dessas plantas tem sido estudada com relação à sua microbiota endofítica. Conseqüentemente, a oportunidade de encontrar um novo e benéfico microrganismo endofítico entre a diversidade de plantas existentes nos diferentes ecossistemas terrestres é considerável (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; TIWARI; SAILAJA; SHAKER, 2014).

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

substâncias produzidas pelos endófitos e seu potencial de antagonismo são importantes não somente para o entendimento de papel ecológico e de relações inter-específicas, mas também para viabilizar a aplicação desses organismos no controle biológico de patógenos ou mesmo o isolamento de compostos de importância biotecnológica (WELLER, 1988; EMMERT; HANDELSMAN, 1999; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; SESSITSCH; REITER; BERG, 2004; FERREIRA et al., 2008). Segundo Molina (2012), apenas uma parte dos endófitos foram estudados, e mais recentemente, vários grupos de investigação foram motivados a avaliar e elucidar o potencial destes microrganismos aplicados em processos biotecnológicos, inclusive focando a produção de compostos bioativos. Com relação a endófitos, alguns membros da família Sapindaceae, a qual pertence o guaraná, já foram pesquisados e podem ser mencionados os trabalhos de Daisy et al. (2002) e Garcia et al. (2012). Particularmente com *P. cupana*, tem sido pesquisada a microbiota endofítica tanto culturável como independente de cultivo por vários autores, entre eles Bonatelli (2012), Tsui (2012), Batista (2013), Bezerra (2014), Bogas (2012), dentro de um projeto financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas).

2.4 Controle biológico

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; SANTOS, 2013).

Embora os pesticidas químicos sejam usados com sucesso na agricultura, eles podem causar problemas de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, resíduos em alimentos, aumento da resistência em populações de patógenos e pragas, e seus efeitos sobre organismos não-alvo (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN, 2011). Isto é especialmente importante quando se trata de regiões que necessitam ser preservadas como a Amazônia e em culturas cujos produtos são usados na alimentação e uso medicinal como é o caso do guaraná. Embora hajam efeitos benéficos no controle de doenças e pragas pelo uso de defensivos agrícolas, há necessidade de se avaliar outras estratégias de controle de patógenos e pragas. O controle biológico de doenças de plantas é um método

alternativo ao uso de agroquímicos, que devido à sua eficiência e menor custo de manutenção e agressividade ao ecossistema, vem ganhando espaço no mundo (AZEVEDO et al., 2000).

No Brasil, embora o uso do controle biológico não seja uma prática generalizada entre os agricultores, há avanços significativos em alguns cultivos, principalmente pelo uso de microrganismos no controle de pragas. Um exemplo de sucesso é o controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatallis*) por meio do *Baculovirus anticarsia*. Essa prática foi desenvolvida e lançada pela EMBRAPA (Centro Nacional de Pesquisa da Soja) em 1983 e, desde então, o produto foi utilizado em milhões de hectares, proporcionando ao país uma economia estimada em cem milhões de dólares em agrotóxicos, sem considerar os benefícios ambientais resultantes da não aplicação de mais de onze milhões de litros desses produtos. O *Baculovirus anticarsia* está sendo utilizado em outros países da América Latina, como Argentina, Paraguai e Bolívia (SAVIO; PINOTTI, 2008). Com relação ao controle microbiano de doenças de plantas, incluindo controle por microrganismos endofíticos, dados podem ser encontrados em diferentes capítulos de livros sobre controle biológico editados pela EMBRAPA (MELO; AZEVEDO, 1998a; 2000a; 2000b). Com relação ao guaraná, vários autores têm buscado o controle da antracnose do guaranazeiro por meio de microrganismos endofíticos (TSUI, 2012; BONATELLI, 2012; BOGAS, 2012; BEZERRA, 2014).

2.5 Produção de enzimas

As enzimas têm sido utilizadas pelo ser humano há milhares de anos, de duas formas: direta pelo emprego de extratos enzimáticos brutos de origem animal ou vegetal, e indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática sobre determinados substratos. A produção e o uso de enzimas de origem microbiana sob uma forma controlada têm tido um maior enfoque na biotecnológica (JAEGER; EGGERT, 2002). Além disso, a produção de enzimas por microrganismos assegura um potencial ilimitado de suprimentos e ainda possibilita a criação de novos sistemas enzimáticos, o que é mais difícil de se obter em fontes animais e vegetais.

Nas células vegetais, o amido é um polímero de glicose que constitui o principal polissacarídeo de reserva energética. Muitos microrganismos produzem enzimas, as amilases, que degradam esse polímero em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas celulares (PASCHOLATI, 1995).

Para a celulose, um dos principais constituintes das células vegetais, a conversão enzimática em glicose é uma árdua tarefa, devido à natureza física do substrato. Na sua forma nativa, a celulose é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, que são ligadas por pontes de hidrogênio (BÉGUIN, 1990). A conversão microbiana da celulose em açúcares simples necessita de enzimas, dentre elas endoglicanases (GILKES et al., 1991), também conhecidas como celulases, endo β -1,4-glicanases e carboximetil celulases (SCHULEN, 2002).

Outras enzimas, como proteases e fosfolipases, atuam na quebra de moléculas para a nutrição dos vegetais, estão associadas a processos de patogênese e penetração nos hospedeiros (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

As lipases e esterases, por sua vez, constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e hidrólise dos lipídeos. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de microrganismos (REED, 1975). As enzimas lipolíticas, juntamente com as celulases, constituem, atualmente, importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas (JAEGER; EGGERT, 2002). As lipases catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, liberados para as plantas, apresentando a capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Já as esterases agem em ésteres solúveis ou que hidrolisam outros lipídeos (acilhidrolases, colesterolesterase, tioesterases) (REED, 1975). As principais aplicações destas lipases envolvem a produção de detergentes, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produção de produtos farmacêuticos, produção de agroquímicos, pesticidas e inseticidas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Microrganismos endofíticos provenientes de *P. cupana*, principalmente os isolados de folhas saudáveis e também folhas com sintomas de antracnose, tem sido pesquisados em relação a produção de enzimas (TSUI, 2012; BONATELLI, 2012).

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

Os microrganismos 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). Woese et al. (1990) sugeriram, baseados na sequência dos genes ribossomais, uma nova classificação dos seres vivos, até então classificados em cinco reinos (WHITAKER, 1969). Em procariotos, 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 microrganismos ao nível de gênero e também ao nível de espécie, e ainda possibilita fazer correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEBY et al., 2000). Com sua análise é possível ainda inferir a relação evolutiva entre espécies de bactérias (WOESE, 1987).

2.7 Análise da região ITS do rDNA para estudos de diversidade em comunidades fúngicas

A identificação de muitos fungos tem sido realizada por meio de marcadores morfológicos, principalmente por suas estruturas reprodutivas. No entanto, muitos deles não produzem essas estruturas em meios de cultura artificiais dificultando sua classificação e identificação. De acordo com Magnani et al. (2005), o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para a diferenciação genética das espécies de fungos resultou em avanços substanciais na taxonomia, devido à sensibilidade e especificidade dessas técnicas.

O rDNA está presente em todos os organismos, evoluindo rapidamente e portanto sendo apropriado para discriminar espécies ou até mesmo variedades de uma mesma espécie (FUNGARO, 2000). As regiões espaçadoras transcrita ITS (*Internal Transcribed Spacer*) são flanqueadas por segmentos conservados. Estas regiões conservadas carregam a informação sobre a filogenia e o nível taxonômico, enquanto os ITS apresentam muitas mutações durante o processo de evolução podendo ser mais utilizado para classificação intraespecífica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de material

A coleta das sementes foi realizada em duas regiões do Brasil: no Norte (onde há incidência da antracnose) e Nordeste (onde não há incidência da antracnose). No Norte, a coleta foi realizada pela pesquisadora Rosineide Souza do INPA (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia), na cidade de Manaus/AM (S 3°05'38.1" W 59°59'17.5") em janeiro de 2013. No Nordeste, a coleta foi realizada pelos pesquisadores Phellippe Marbach e Jackeline Andrade da UFRB (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia), na região do município de Cruz das Almas/BA (S 12°39'27.6" W 39°05'17.8") em abril de 2013 e janeiro de 2014. As sementes foram coletadas aleatoriamente, armazenadas em caixas de papelão, sendo que a coleta de janeiro de 2013 foi transportada por avião e as demais enviadas via Correios ao Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo".

3.2 Isolamento de microrganismos endofíticos

3.2.1 Isolamento de bactérias endofíticas

Primeiramente, as sementes foram separadas das cápsulas e do arilo (Figura 1) submetidas, posteriormente à desinfecção superficial, da seguinte forma: lavagem em álcool etílico 70% por 1 minuto, lavagem em hipoclorito de sódio com 3% de cloro ativo (v/v) por 3 minutos, lavagem novamente em álcool 70% por 1 minuto, e duas lavagens com água destilada autoclavada (ARAÚJO et al., 2002; SOBRAL et al., 2014). Após a desinfecção superficial, as sementes foram trituradas em 5 mL de tampão PBS (contendo por litro: NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g, água destilada; pH 7,4) e realizada a diluições seriadas apropriadas e o extrato foi semeado em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio sólido TSA 10% (Tryptona-soja-ágar) (Himedia), suplementado com benomil (50 µg/mL), para reduzir o possível crescimento de fungos. As placas foram incubadas a 28° C até 7 dias para posterior avaliação das colônias isoladas. A eficácia da desinfecção

superficial foi observada por meio da semeadura de alíquotas de água da última lavagem das sementes em meio de cultura TSA 10%.

Ainda para avaliar o número de bactérias cultiváveis encontradas, foi feita a contagem das colônias e realizados cálculos para estimar a abundância bacteriana por meio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) /grama de tecido vegetal.

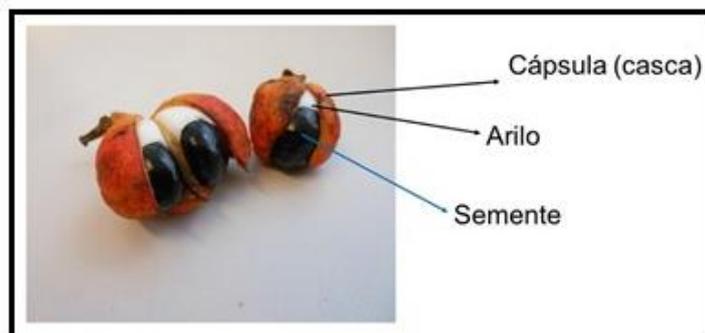


Figura 1 - Fruto e semente do guaraná

A purificação das colônias foi realizada por estrias de esgotamento ou por semeadura em diluição apropriada em placas de Petri (9 cm), contendo o meio TSA 10%, e incubadas por 48 h a 28° C. Após, as colônias isoladas foram repicadas em meio sólido e então preparadas para o armazenamento. Estas colônias foram inoculadas em tubos de 2 mL contendo 1 ml de meio líquido TSB (30 g/L), após crescimento bacteriano foi suplementado ao tubo 500 ml de glicerol e armazenados em freezer a -80° C.

Os isolados bacterianos receberam códigos de letra 'B', no início do código indica isolados provenientes de sementes do Amazonas e a letra 'D', no início do código, indica isolados provenientes de sementes da Bahia.

3.2.2 Isolamento de fungos endofíticos

As sementes foram primeiramente submetidas à desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (NaOCl), de acordo com Pamphile e Azevedo (2002) modificado: as sementes foram tratadas por imersão no álcool 70% por 1 minuto, no hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% de princípio ativo por 3 minutos, no álcool 70% por 1 minuto e enxaguadas duas vezes em água destilada autoclavada. Após a desinfecção superficial, as sementes foram cortadas em pequenos fragmentos de

aproximadamente 0,6cm. Posteriormente, foram inoculados 5 fragmentos por placas de Petri, no total de 24 placas, contendo meio BDA (1 L BDA: infusão de 200 g de batata; glicose 20 g; ágar 15 g; água destilada para completar 1 L; pH = 6,0) suplementado com tetraciclina e estreptomicina, ambas na concentração de 50 µg/mL, para inibir crescimento bacteriano. Estas placas foram incubadas a 28° C até 21 dias para posterior avaliação das colônias isoladas. A eficácia do processo de desinfecção superficial foi observada por meio da semeadura de alíquotas de água da última lavagem da mesma maneira que foi feito para o isolamento de bactérias, utilizando o meio BDA.

As colônias obtidas foram repicadas em outras placas de Petri, contendo meio de cultivo BDA, e então purificadas por diluição dos esporos fúngicos em suspensão em Tween 80 (Polissorbato 80) (Vetec) a 1%, agitado em vortex por 3 minutos. A solução foi alíquotada no meio sólido e com alça de Drigalski foi espalhada na placa. Após 2 dias, as colônias crescidas foram repicadas em placas de Petri, e então estocadas por dois processos de armazenamento: óleo mineral e método de Castelani, onde o primeiro consistiu em cultivar o isolado fúngico em meio sólido inclinado, e após crescimento, foi adicionado óleo mineral sobre o micélio e mantido em temperatura ambiente. No segundo processo, os fungos crescidos foram fragmentados e colocados os pedaços em frascos que continham água destilada esterilizada, mantidos em temperatura ambiente.

Os isolados fúngicos receberam códigos de letra C, FM e SBA, que indicam: Cruz das Almas (C) – primeira remessa, fungos Manaus (FM) e sementes da Bahia (SBA) – segunda remessa, respectivamente.

3.3 Identificação molecular dos isolados bacterianos

3.3.1 Extração de DNA bacteriano

Os isolados bacterianos selecionados foram crescidos em meio LB autoclavado (*Luria Bertani*, contendo por litro: Triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; ágar 1,5%; e água destilada) 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 5000 bpm, 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.

3.3.2 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* R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (HEUER et al., 1997), e a reação foi realizada nas seguintes condições: 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 M de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase (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) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Fermentas).

3.4 Identificação molecular dos isolados fúngicos

3.4.1 Extração do DNA fúngico

Para a extração de DNA dos isolados fúngicos, estes foram crescidos em meio BD (Batata-dextrose) por 15 dias a 28° C, sob agitação (150 rpm). A metodologia para extração de DNA foi realizada conforme Pamphile e Azevedo. (2002), modificado: a cultura fúngica foi filtrada por bomba a vácuo, até o micélio ficar seco. O micélio foi triturado ao ser adicionado nitrogênio líquido. Ao material triturado foram adicionados 700 µL de tampão TE (o mesmo Tampão de extração usado na extração de DNA das bactérias) e incubados em estufa durante 30 minutos a 70° C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 10.000 g e a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado à ele 700 µL de fenol, sendo então a suspensão homogeneizada por inversão e centrifugada por 5 minutos nas condições acima. O sobrenadante foi, então, transferido para outro tubo e adicionados 350 µL de clorofórmio e 350 µL de fenol. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 5 minutos a 10.000 g, novamente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo com 700 µL de clorofórmio, homogeneizado, centrifugado nas mesmas condições e coletado. Em seguida, foram adicionados 0,1 do volume de NaCl (5 M) e 0,6 do volume de isopropanol. A mistura foi deixada por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 5 minutos a 10.000g. O DNA foi lavado com etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 10.000 g, mantido em estufa a 40° C por 40 minutos e eluído em 50 µL de água deionizada esterilizada.

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

3.4.2 Amplificação do ITS pela reação de PCR

A amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA foi realizada com o uso dos iniciadores ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), que anelam em posições específicas do 18S e 28S rDNA (WHITE et al. 1990). A reação foi realizada utilizando 3,7 mM de MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase

(Sinapse Inc.), Tampão 1X, 5 ng de DNA num volume final de 50 µL. A região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA foi amplificada com desnaturação inicial de 5 minutos a 95° C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95° C; 30 segundos a 55° C; 30 segundos a 72° C, e uma extensão final de 10 minutos a 72° C em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research). O produto das reações foi analisado em gel de agarose (1% p/v) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Fermentas).

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

Os fragmentos do gene 16S rDNA e região ITS amplificados (aproximadamente 1360 e 500 pb, respectivamente) foram purificados por meio de solução de Polietilenoglicol (PEG 8000) (10g PEG 8000; 7,3 g NaCl; 45 mL água deionizada). Para tanto, 50 µL de solução PEG foram misturados com 50 µL do produto de PCR em microtubos de 1,5 mL e então incubados a 37° C por 15 minutos. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 10.000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi retirado com a pipeta e feita uma lavagem primária com 125 µL de etanol 80% sob as mesmas condições de incubação. Depois de centrifugadas, as amostras purificadas foram ressuspensas em 30 µL de água deionizada, quantificadas e então enviadas para serem sequenciadas no LBA – Laboratório de Biotecnologia Animal/ESALQ.

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>), através do *Blastn*. Foram consideradas sequências com dissimilaridade menor ou igual a 3% com as do banco de dados.

A identificação das espécies fúngicas foram baseadas no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade. 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; NEI, 1987), usando-se “p-distance” para nucleotídeos com a opção “the pairwise gap deletion” e usando bootstrap com 10.000 repetições.

3.6 Identificação dos isolados

As sequências obtidas pelo 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. Estas sequências foram obtidas nas bases de dados do NCBI e RDP. O dendograma foi construído com base no alinhamento realizado pelo *Muscle* (EDGAR, 2004), posteriormente convertido numa matriz de distância determinada pelo parâmetro Kimura-2 (KIMURA, 1980), que foi agrupada pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987). A consistência da estrutura da árvore foi determinada pela análise de *bootstrap*, feita com base em 1000 subamostragens na matriz de distância. Sequências distantemente relacionadas às sequências utilizadas neste trabalho (gênero *Burkholderia*, para identificação bacteriana, e gênero *Saccharomyces* para identificação fúngica) foram utilizadas como *out-group* nos dendogramas.

3.7 Potencial de biocontrole e biotecnológico dos isolados

Para avaliar a atividade antagônica dos isolados fúngicos e bacterianos contra o agente causal da antracnose, foi realizado o teste de paridade *in vitro*. O fitopatógeno testado foi o *C. glorisporioides* (L1), gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Pedro Queiroz da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus-AM. Para isso, foi utilizado o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar, na concentração de 39 g/L) (Lab M limited).

3.7.1 Ensaio de antagonismo com isolados bacterianos

Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa da capacidade inibitória dos isolados. Em duas extremidades de placas de Petri 9 cm foram inoculados diferentes isolados bacterianos do guaraná. No mesmo dia foi realizada a inoculação no centro da placa com o fitopatogênico (discos de 0,5 cm de diâmetro), conforme observado na Figura 2. As culturas foram incubadas a 28° C durante 7 dias.

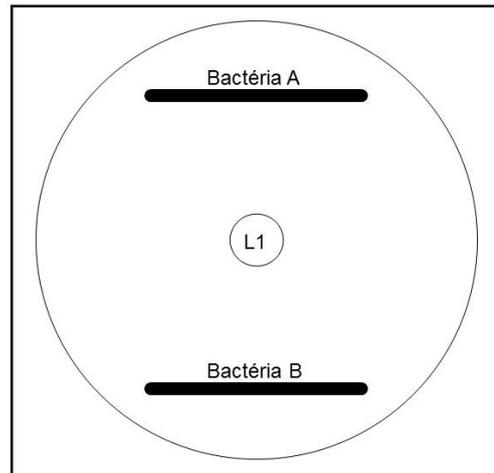


Figura 2 - Ensaio antagonista para análise qualitativa

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 LB sólido após 48 horas de incubação a 28° C foram transferidas para 5 ml de água deionizada autoclavada, e a absorbância ($OD_{550\text{ nm}}$) 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 (Figura 3).

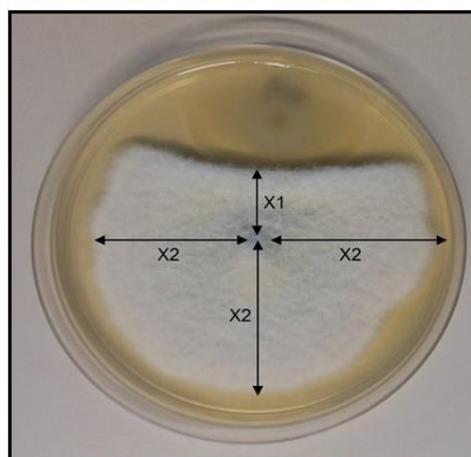


Figura 3 - Inibição de crescimento fúngico pelo isolado bacteriano, sendo 'X1' = raio do crescimento fúngico em direção ao isolado bacteriano; 'X2' = raio do crescimento fúngico nas laterais da placa e na direção oposta do isolado bacteriano

O cálculo da porcentagem de inibição dos isolados bacterianos testados foi realizado a partir da seguinte fórmula:

$$IA = 100 - \left\{ \frac{X1}{\left[\frac{X2 + X2' + X2''}{3} \right] x 100} \right\}$$

3.7.2 Ensaio de antagonismo com isolados fúngicos

O ensaio foi conduzido em meio BDA onde foram inoculados discos de 0,5 cm de diâmetro, um do fitopatógeno, outro do isolado fúngico a cerca de 2 cm de distância da borda da placa (Figura 4).

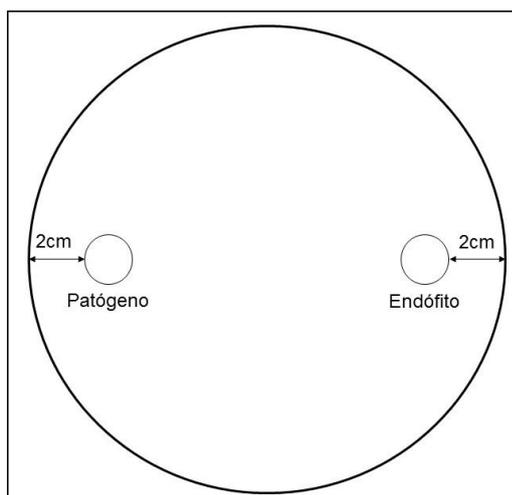


Figura 4 - Teste antagônico fungo endofítico *versus* fungo patogênico

O teste foi realizado inoculando os fungos no mesmo dia. Após inoculação, as placas foram incubadas a 28° C de 7 a 30 dias. A análise foi realizada de acordo com Badalyan, Innocenti e Garibyan. (2002, 2004) e o IA (Índice de Antagonismo) foi calculado segundo Campanile, Ruscelli e Luisi (2007), através da fórmula:

$$AI = \left(\frac{(RM - rm)}{RM} \right) * 100$$

Onde:

rm = raio da colônia em direção ao antagonismo.

RM = média dos raios nas outras três direções.

3.7.3 Produção de enzimas hidrolíticas

A atividade enzimática dos microrganismos foi avaliada qualitativa e semi-quantitativamente. Inicialmente, os isolados bacterianos foram crescidos em meio LB sólido, os isolados fúngicos foram crescidos em meio BDA, e então semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura específico para cada enzima, incubados a 28° C de 2 a 7 dias.

Para análise qualitativa, os microrganismos foram repicados na placa de Petri de 15 cm com meios específicos para cada enzima (96 bactérias em cada placa e 1 fungo em cada placa), e após 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 tipo Falcon contendo água destilada esterilizada e eluídas na mesma densidade óptica (OD), sendo OD_{550 nm} = 0,1 (aproximadamente 10⁸ UFC). Dessa solução, foram inoculados 10 µL na placa contendo o meio de cultura específico.

3.7.3.1 Atividade amilolítica

Os isolados foram crescidos em placas contendo em meio mínimo M9, substituindo a glicose por 1% de amido solúvel (p/v) e 0,5% de extrato de levedura. Como descrito a seguir:

Amido solúvel	10 g
Extrato de levedura	5 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	12,8 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 g
Ágar	15 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Após o crescimento microbiano foram adicionados 10 mL de solução de iodo (Iodo 10 g; Iodeto de potássio (KI) 6 g; água destilada 20 mL; etanol 95% para completar 100 mL) e lavados quase imediatamente com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a atividade amilolítica microbiana (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Como controle positivo foi utilizado 10 µL da enzima α-Amilase (SIGMA – código A3176-500KU).

3.7.3.2 Atividade celulolítica

Os isolados foram crescidos em placas contendo meio mínimo M9, substituindo glicose por 1% de Carboximetilcelulose (CMC) (p/v) e 0,5% de extrato de levedura:

Carboximetilcelulose.....	10 g
Extrato de levedura	5 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	12,8 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 g
Ágar	15 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Após o crescimento microbiano foram adicionados 10 mL do Corante Vermelho Congo (Vermelho Congo 1 g em 1 L de água destilada). Decorridos 15 minutos, as placas foram lavadas com NaCl (5 M) segundo a metodologia proposta por Teather e Wood (1982). A presença de um halo amarelado ou alaranjado em torno da colônia observada após 10-15 minutos, a adição de NaCl indicou atividade celulolítica dos isolados. Como controle positivo foi utilizado 10 µL da enzima Celulase (SIGMA – código 22178 – 1,24 U/mg).

3.7.3.3 Atividade lipolítica

O meio para detecção de lipase foi o proposto por Sierra, 1957, acrescido de Tween 20, conforme abaixo:

Peptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g
Ágar	15 g
Tween 20	10 mL
H ₂ O destilada	990 mL

Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (p/v) de Tween 20, previamente esterilizado. A presença de halos formados por cristais indicou atividade lipolítica dos isolados.

3.7.3.4 Atividade esterásica

A metodologia utilizada para observação da produção de esterase foi a mesma utilizada para lipase, sendo substituído o Tween 20 pelo Tween 80 na mesma proporção.

Peptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g
Ágar	15 g
Tween 80	10 mL
H ₂ O destilada	990 mL

A atividade esterásica dos isolados foi indicada pela presença de halos claros ao redor dos isolados (SIERRA, 1957).

3.7.3.5 Atividade proteolítica

Para avaliação da atividade proteolítica foi utilizado o meio da atividade proteolítica dos isolados.

Triptona	5 g
Extrato de levedura	2,5 g
NaCl	2,5 g
Glicose	1 g
Ágar	15 g
H ₂ O destilada	900 mL
Leite desnatado	100 mL

Após a esterilização para cada 900 mL de meio foi adicionado 100 mL de leite desnatado. A atividade proteolítica foi indicada pela visualização da formação de halo transparente ao redor do isolado. Como controle positivo foi utilizado 10 µL da enzima Protease (SIGMA – código P6110 – ≥ 500 U/g).

3.7.3.6 Atividade pectinolítica

Os microrganismos foram crescidos em meio mínimo M9, substituindo glicose por 1% de pectina (p/v), contendo 0,5% de extrato de levedura, como:

Pectina cítrica	10 g
Extrato de levedura	5 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	12,8 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 g
Ágar	15 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Após o crescimento microbiano, foram adicionados 10 mL de lugol e imediatamente realizada uma lavagem com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou atividade pectinolítica dos isolados. O pH foi ajustado para 8,0 que é utilizado para caracterização de pectato-liase. Como controle positivo foi utilizado 10 µL da enzima Pectinase (SIGMA – código P4716 – 5KU).

3.7.3.7 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 milimetrada sendo determinado o Índice Enzimático (IE), conforme a fórmula abaixo:

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

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 RESULTADOS

4.1 Isolamento de bactérias endofíticas

Pela contagem de colônias presentes nas placas, após crescimento bacteriano, foi possível analisar a abundância bacteriana estimando a Unidade Formadora de Colônias por grama de tecido vegetal (UFC/grama). A Tabela 1 apresenta os valores obtidos:

Tabela 1 - Quantidade de bactérias provenientes de guaraná nas diferentes regiões coletadas

Origem da semente	UFC/grama
Manaus/AM	$2,9 \times 10^4$
Cruz das Almas/BA	$2,4 \times 10^4$

Das bactérias isoladas, foram selecionadas 102, sendo 48 bactérias endofíticas provenientes das sementes de Manaus/AM (Figura 5) e 54 bactérias endofíticas provenientes das sementes de Cruz das Almas/BA. A ausência de microrganismos nas placas controle indicou eficácia na desinfecção superficial das sementes.

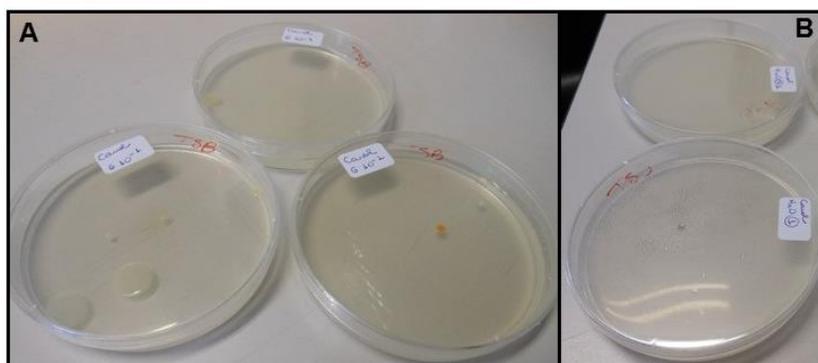


Figura 5 - A) Bactérias endofíticas isoladas de sementes de guaraná provenientes de Manaus/AM. B) Água do último enxague das sementes como controle de desinfecção

4.2 Isolamento de fungos endofíticos

Dos 40 fragmentos de sementes provenientes de Manaus, não foi observado crescimento fúngico. Já para os 80 fragmentos de sementes provenientes de Cruz das Almas, apenas 4 fragmentos tiveram crescimento fúngico, sendo isolado um total de 6 fungos endofíticos. A ausência de microrganismos nas placas controle indicou eficácia na desinfecção superficial das sementes (Figura 6).

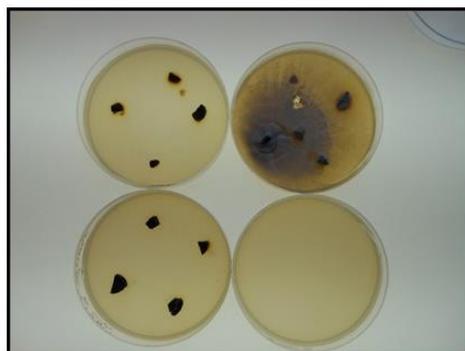


Figura 6 - Isolamento de fungos endofíticos de guaraná provenientes de Cruz das Almas/BA. As placas mostram fragmentos de sementes sem e com crescimento fúngico, além da placa controle indicando a eficiência da desinfecção superficial das sementes.

4.3 Testes Antagônicos

4.3.1 Antagonismo com isolados bacterianos

Das 102 bactérias testadas contra o fitopatógeno *Colletotrichum* L1, 37 apresentaram alguma forma de atividade antagônica sendo que 16 isolados reduziram substancialmente o crescimento fúngico. Estes 16 isolados foram submetidos à testes semi-quantitativos, analisados estatisticamente por Scott-knott. Os isolados foram divididos em 3 grupos: o primeiro grupo, com 12 isolados, teve maior índice de redução do crescimento do fitopatógeno, entre 51,65% e 63,78%. O segundo grupo, com 3 isolados, reduziu entre 41,87% a 49% do crescimento do patógeno. O último grupo, com apenas um representante (isolado D3.7C), reduziu o crescimento do patógeno em 32,32% (Tabela 2) (Figura 7A-B-C).

Tabela 2 - Agrupamento estatísticos do índice de redução do fitopatógeno pelas bactérias endofíticas isoladas de sementes de guaranzeiro

Isolado bacteriano	Porcentagem de Inibição do crescimento do patógeno	Agrupamento Scott-knott
*D3.7C	32,32%	A
D3.1B	41,87%	B
**3B.7B	48,66%	B
1B.11A	49%	B
1B.1A	51,65%	C
3B.7A	53,79%	C
D5.9B	55,38%	C
1B.11B	57,41%	C
1B.10	57,72%	C
1B.1B	58,35%	C
1B.12A	58,92%	C
5.1B.1B	59,15%	C
5.1B.1A	60,67%	C
1B.12C	61,94%	C
1B.2A	62,86%	C
1B.12B	63,78%	C

*A letra 'D', no início do código, indica isolados provenientes de sementes da Bahia;

**A letra 'B', no início do código indica isolados provenientes de sementes do Amazonas.

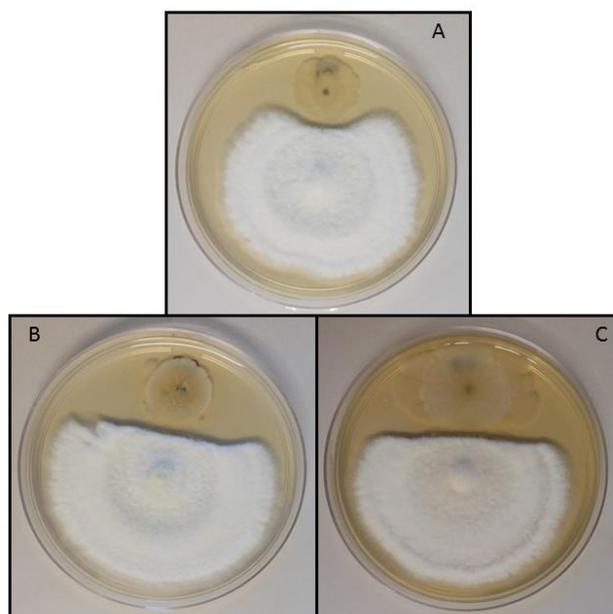


Figura 7 - Teste antagônico de isolados bacterianos contra o fungo fitopatógeno *Colletotrichum* L1.
A) Isolado 1B.11A; B) Isolado 1B.2A; C) Isolado 1B.12C

4.3.2 Antagonismo com isolados fúngicos

Dentre os 6 isolados fúngicos testados contra o fitopatógeno L1 foi observada pequena redução no crescimento do patógeno.

A análise de interação entre os isolados e o fitopatógeno foi também realizada de acordo com Badalyan, Innocenti e Garibyan (2002 e 2004), onde: C7 e C9.1 apresentaram o tipo de interação “A” (=“deadlock” com contato micelial) (Figura 8A-B). Os isolados C9.2 e C9.3 tiveram interação do tipo “B” (=“deadlock” a distância) (Figura 8C-D). O isolado S7BA teve interação do tipo “CB1” (crescimento parcial do endofítico sobre o fitopatógeno depois de “deadlock” inicial à distância) (Figura 8E). O isolado C8 apresentou a interação do tipo “CA1” (crescimento parcial do endofítico sobre o fitopatógeno depois de “deadlock” inicial com contato micelial) (Figura 8F).

O Índice de Antagonismo dos 6 isolados fungicos contra o *Colletotrichum* L1, foi calculado conforme Campanile, Ruscelli e Luisi (2007) (Tabela 3).

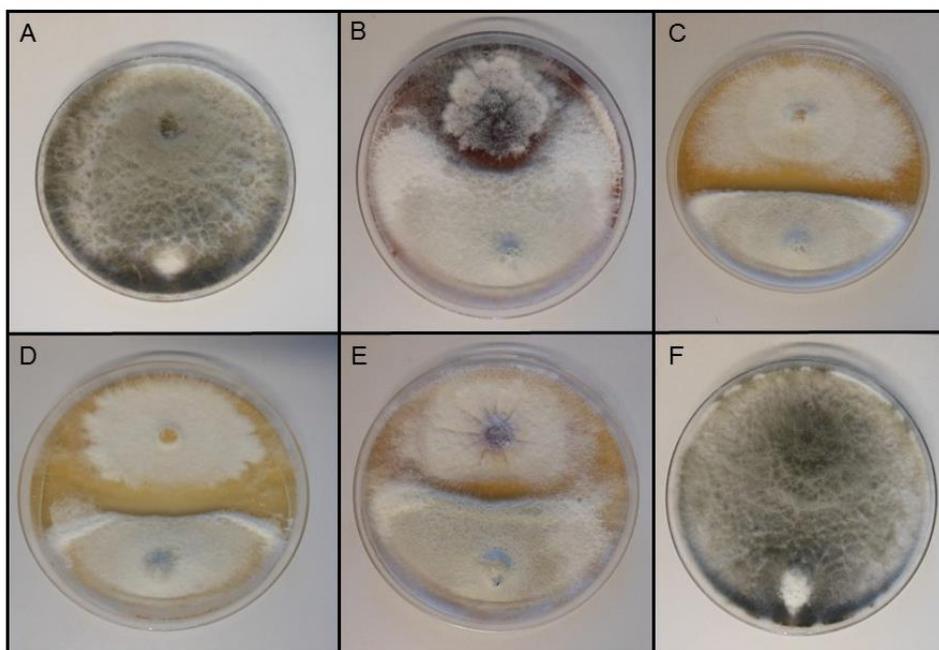


Figura 8 - Teste antagônico de fungos isolados de sementes de guaranazeiro contra fungo fitopatogênico *Colletotrichum* L1. A) Isolado C7; B) Isolado C9.1; C) Isolado C9.2; D) Isolado C9.3; E) Isolado S7BA; F) Isolado C8

Tabela 3 - Inoculação dos fungos isolados de sementes de guaranazeiro e suas interações com o fitopatógeno *Colletotrichum*

Fungo Isolado	Índice de Antagonismo (%)	Interação de acordo com Badalyan, Innocenti e Garibyan, 2002-2004
C7	38,01%	A
C8	31,74%	CA1
C9.1	8,61%	A
C9.2	52,41%	B
C9.3	32,07%	B
S7BA	37,02%	CB1

4.4 Produção de enzimas hidrolíticas por bactérias isoladas de sementes do guaranazeiro

Das 102 bactérias testadas, 13 foram positivas para a atividade amilolítica, 5 para atividade celulolítica, 11 para atividade pectinolítica e 24 para atividade proteolítica. Nenhuma bactéria apresentou atividade lipolítica e esterásica (Figuras 9 e 10).

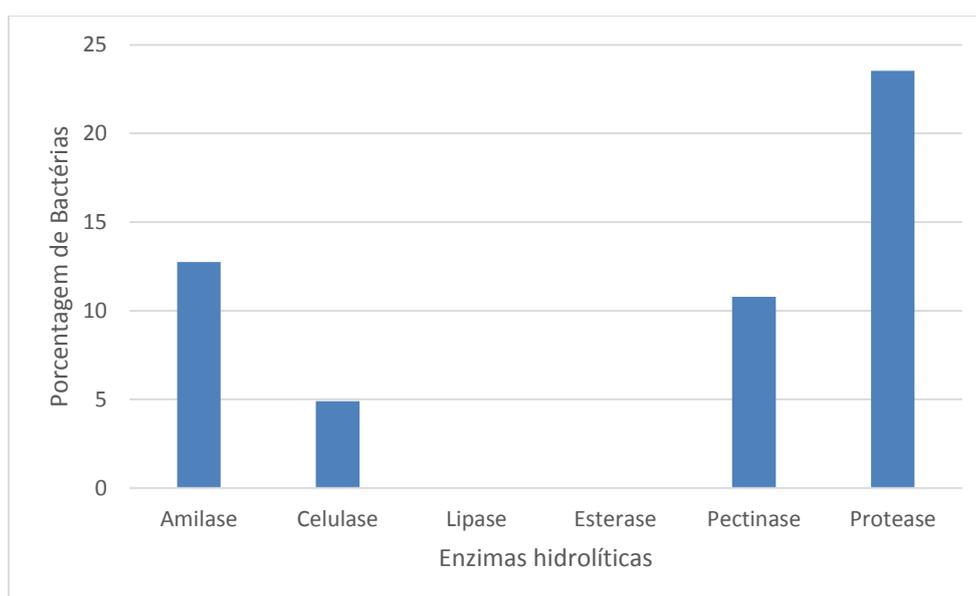


Figura 9 - Porcentagem de bactérias que produziram enzimas hidrolíticas

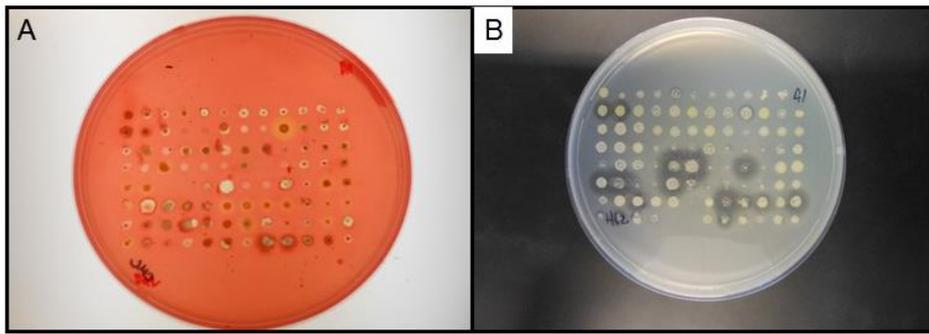


Figura 10 - Teste qualitativo de produção enzimática por bactérias endofíticas isoladas de sementes de guaranazeiro. A) Produção de celulase; B) Produção de protease

4.4.1 Atividade amilolítica

As 13 bactérias apresentaram atividade amilolítica foram analisadas em teste semi-quantitativo (Figura 11A), por meio do cálculo do IE. Os valores obtidos foram entre 1,18 a 2,26, e esses valores não identificaram diferença estatísticas, conforme mostrado na Tabela 4:

Tabela 4 - Dados estatísticos e atividade amilolíticas de bactérias endofíticas

Isolado	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
*3B.7B	1,19	A
1B.12C	1,3	A
5.1B.1A	1,38	A
1B.11B	1,53	A
1B.1B	1,54	A
1B.11A	1,61	A
3B.7A	1,62	A
1B.1A	1,67	A
3B.1	1,69	A
1B.10	1,79	A
5.1B.1B	1,85	A
1B.12A	2,05	A
1B.12C	2,26	A

*A letra 'B', no início do código indica isolados provenientes de sementes do Amazonas.

4.4.2 Atividade celulolítica

As 5 bactérias que apresentaram atividade celulolítica, após teste semi-quantitativo, tiveram resultados de IE entre 1,62 a 1,78 (Tabela 5), sendo que esses valores não diferem estatisticamente. O teste está ilustrado na Figura 11B.

Tabela 5 - Dados estatísticos e atividade celulolítica de bactérias endofíticas

Isolado	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
*1B.8	1,61	A
1B.9	1,62	A
1B.6	1,64	A
1B.13	1,77	A
1B.7	1,78	A

* A letra 'B', no início do código indica isolados provenientes de sementes do Amazonas.

4.4.3 Atividade pectinolítica

Das 11 bactérias que apresentaram pectinases, os valores de IE obtidos em teste semi-quantitativo (figura 11C), foram estaticamente separados em dois grupos: bactérias que tiveram o IE entre 1,28 a 1,39, e as que tiveram o IE entre 1,55 a 1,66, conforme Tabela 6:

Tabela 6 - Dados estatísticos e atividade de pectinase por bactérias endofíticas

Isolado	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
*3B.1	1,28	A
1B.1A	1,3	A
1B.1B	1,31	A
3B.7B	1,31	A
1B.11A	1,35	A
1B.12A	1,39	A
3B.7A	1,55	B
1B.12B	1,6	B
1B.12C	1,62	B
3B.17B	1,65	B
1B.11B	1,66	B

*A letra 'B', no início do código indica isolados provenientes de sementes do Amazonas.

4.4.4 Atividade proteolítica

Um total de 24 bactérias apresentaram atividade proteolítica. Pelas análises estatísticas, as bactérias foram separadas em dois grupos: as que tiveram IE entre 1,23 a 1,77; e as que tiveram IE entre 1,97 a 2,33 (Tabela 7) (Figura 11D).

Tabela 7 - Dados estatísticos e atividade proteolíticas de bactérias endofíticas

Isolado	Média do IE	Grupo estatístico (Scott-knott)
*D3.6A	1,23	A
**1B.10	1,27	A
3B.7B	1,31	A
1B.1B	1,33	A
D3.6B	1,33	A
3B.9	1,37	A
1B.12B	1,41	A
D5.9B	1,42	A
D2.3B	1,43	A
3B.1	1,45	A
D1.2	1,48	A
1B.12C	1,53	A
1B.1A	1,54	A
5.1B.1B	1,54	A
1B.9	1,6	A
3B.7A	1,65	A
D1.3	1,67	A
1B.8	1,68	A
5.1B.1A	1,77	A
3B.19	1,97	B
D3.1B	1,97	B
1B.11B	2,11	B
1B.12A	2,23	B
6B.4B	2,33	B

*A letra 'D', no início do código, indica isolados provenientes de sementes da Bahia;

**A letra 'B', no início do código indica isolados provenientes de sementes do Amazonas.

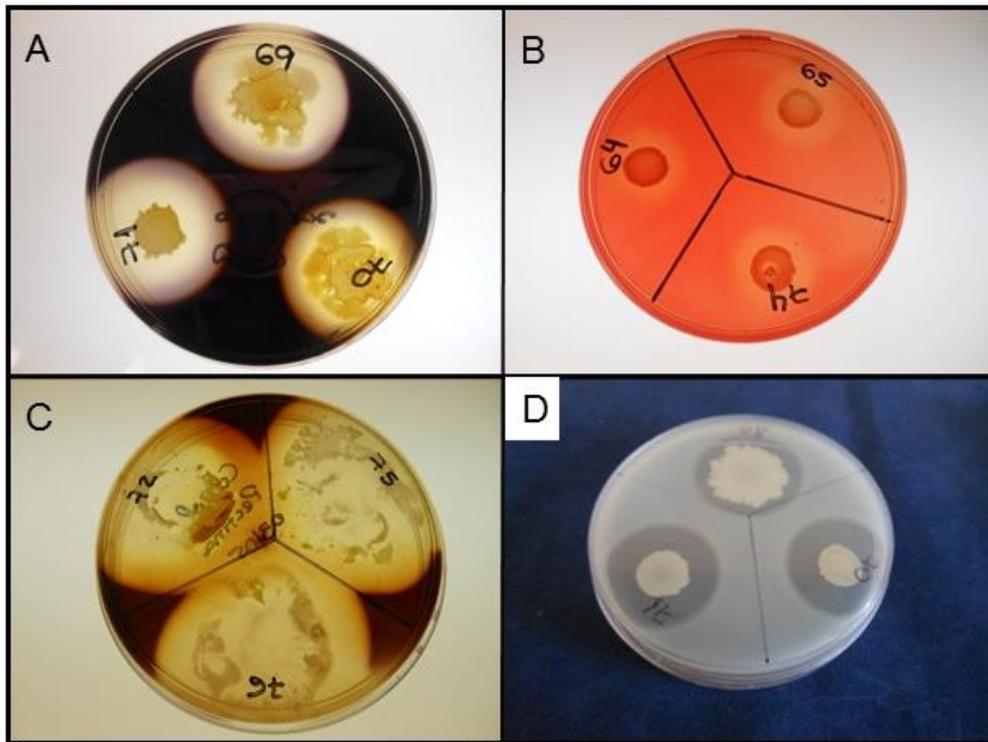


Figura 11 - Teste semiquantitativo de produção de enzimas hidrolíticas por bactérias endofíticas isoladas de guaranazeiro. A) Produção de amilase; B) Produção de celulase; C) Produção de pectinase; D) Produção de protease

4.5 Produção de enzimas por fungos isolados de sementes do guaranazeiro

Dos 6 fungos testados, todos apresentaram atividade amilolítica, pectinolítica, lipolítica e esterásica, 2 apresentaram atividade celulolítica e nenhum apresentou atividade proteolítica (Tabela 8).

Tabela 8 - Produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados fúngicos

Isolado	Pectinase	Amilase	CMC	Esterase	Lipase	Protease
C91	+	+	ND	+	+	ND
C92	+	ND	ND	+	+	ND
C93	+	ND	ND	+	+	ND
C7	+	ND	+	+	+	ND
C8	+	ND	+	+	+	ND
S7BA	+	+	ND	+	+	ND

+: produção enzimática; ND: Não detectada produção enzimática.

4.6 Identificação molecular das bactérias endofíticas

Das 102 bactérias isoladas, 23 bactérias que apresentaram algum tipo de atividade antagônica ou enzimática tiveram seu DNA extraído e realizada identificação pelo sequenciamento parcial do gene 16S do rDNA através da ferramenta BLASTn do banco de dados do NCBI. Os dados estão apresentados na Tabela 9:

Tabela 9 - Identificação das bactérias pelo sequenciamento parcial do gene 16S do rDNA

Isolado	Identificação	Número de Acesso	Similaridade (%)
*D1.2	<i>Bacillus</i> sp.	AY372926.1	100
D3.1B	<i>Bacillus</i> sp.	KJ094437.1	100
D3.6A	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	KC853183.1	99
**1B.1A	<i>Bacillus</i> sp.	KJ572218.1	99
1B.1B	<i>Bacillus</i> sp.	KM242534.1	100
1B.2B	<i>Paenibacillus</i> sp.	EF173331.1	100
1B.5	<i>Paenibacillus</i> sp.	KJ946204.1	97
1B.7	<i>Paenibacillus</i> sp.	KC466184.1	99
1B.10	<i>Bacillus</i> sp.	KM242534.1	100
1B.11B	<i>Bacillus subtilis</i>	GQ122328.1	99
1B.12A	<i>Bacillus</i> sp.	KM242534.1	100
1B.12B	<i>Bacillus subtilis</i>	GQ122328.1	99
1B.12C	<i>Bacillus licheniformis</i>	KC692185.1	100
3B.7A	<i>Bacillus subtilis</i>	GQ122328.1	100
3B.9	<i>Paenibacillus</i> sp.	KJ946204.1	97
3B.11A	<i>Ochrobactrum</i> sp.	KF681078.1	97
3B.11B	<i>Ochrobactrum</i> sp.	KF913832.1	100
3B.12	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	EF364375.1	99
3B.17B	<i>Microbacterium murale</i>	KF025986.1	99
3B.20	<i>Ochrobactrum</i> sp.	KM656363.1	99
5.1B.1A	<i>Bacillus</i> sp.	KM242534.1	99
5.1B.1B	<i>Bacillus</i> sp.	KM242534.1	100
6B.4B	<i>Ochrobactrum</i> sp.	KM656363.1	99

*A letra 'D', no início do código, indica isolados provenientes de sementes da Bahia;

**A letra 'B', no início do código indica isolados provenientes de sementes do Amazonas.

Para construção do dendograma, além das 23 sequências obtidas neste trabalho, foram também utilizadas 19 sequências de interesse para o agrupamento e 2 sequencias utilizadas como *out-group* (Figura 12).

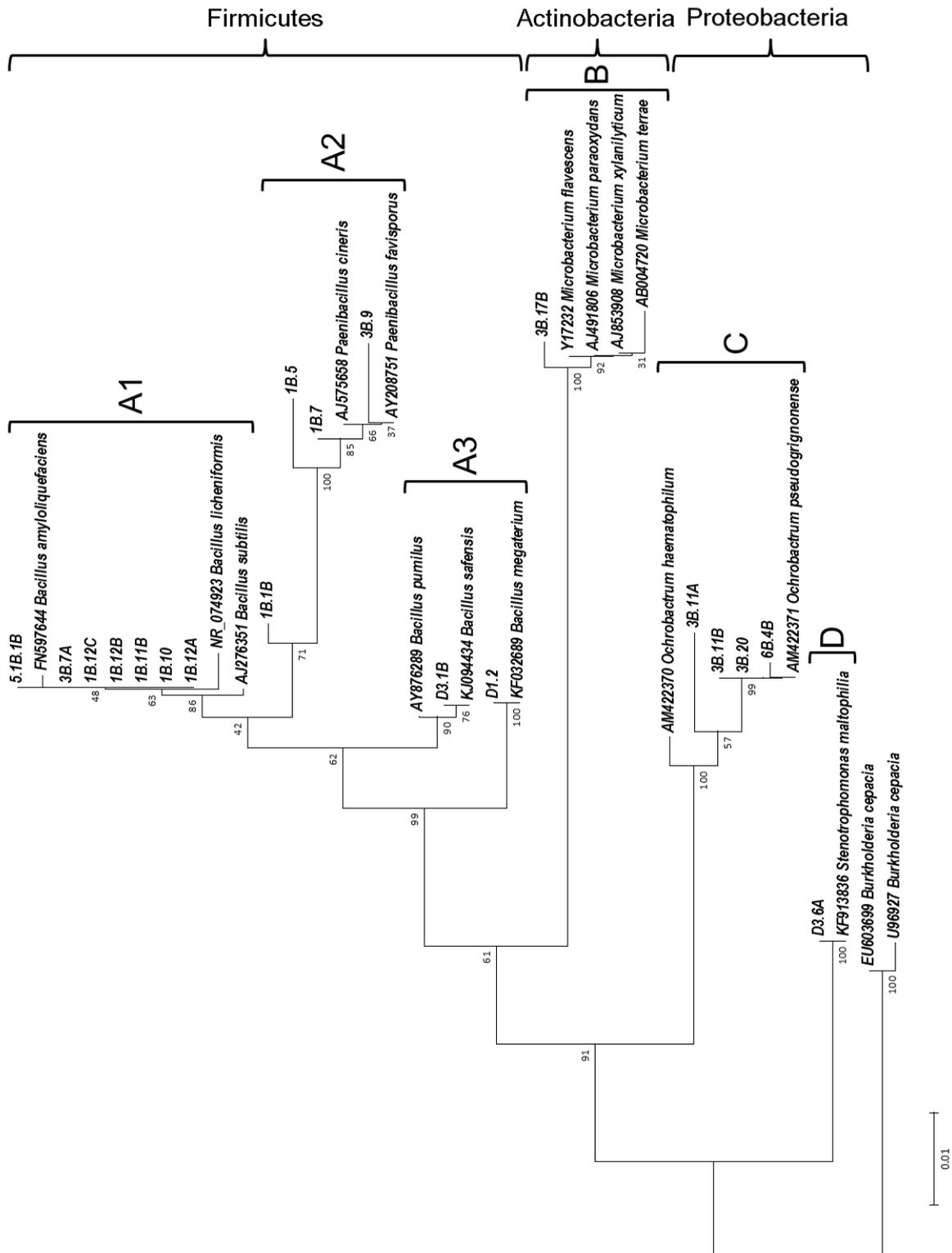


Figura 12 - Dendograma determinado pelo método *Neighbor-Joining* e a relação entre as sequências foi inferida usando método *Muscle*; os dados observados nos ramos indicam valores de *bootstrap* acima de 50%, total de 1000 repetições

No dendograma, as bactérias endofíticas de sementes de guaraná foram classificadas pertencentes aos Filos: Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria (Figura 12). Foi observado também que os isolados com similaridade maior que 97% pelo banco de dados do NCBI comparados com o cladograma, correspondem aos gêneros: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum* e *Stenotrophomonas*.

No Filo Firmicutes são observados 3 agrupamentos: A1, A2 e A3. O primeiro deles, A1, observam-se os isolados 5.1B.1B, 3B.7A, 1B.12C, 1B.12B, 1B.11B, 1B.10 e 1B.12A, juntamente com *Bacillus amyloliquefaciens* (GenBank: FN597644) e estes agrupados com *Bacillus licheniformis* (GenBank: NR_074923) e *Bacillus subtilis* (GenBank: AJ276351). O segundo agrupamento, A2, foi formado pelos isolados 3B.9 e *Paenibacillus favisporus* (GenBank: AY208751) e *Paenibacillus cineris* (GenBank: AJ575658), estes agrupados com os isolados 1B.7 e 1B.5. No terceiro agrupamento, A3, observa-se o isolado D3.1B, agrupado com *Bacillus safensis* (GenBank: KJ094434) e com maior similaridade com *Bacillus pumilus* (GenBank: AY876289); como também o isolado D1.2 agrupado com *Bacillus megaterium* (GenBank: KF032689). Nesse Filo, pode-se observar que no primeiro e no terceiro agrupamento, A1 e A3, os isolados são agrupados com o gênero *Bacillus*, podendo-se concluir que esses isolados possivelmente são pertencentes a tal gênero. No segundo agrupamento, A2, os isolados se pareiam com o gênero *Paenibacillus*, sendo possível, concluir também, que os isolados deste agrupamento são pertencentes a tal gênero.

O Filo Actinobacteria foi formado pelo isolado 3B.17B agrupado com maior similaridade com *Microbacterium flavescens* (GenBank: Y17232) e *Microbacterium paraoxydans* (GenBank: AJ491806), e estes agrupados com *Microbacterium xylanilyticum* (GenBank: AJ853908) e *Microbacterium terrae* (GenBank: AB004720). Pode-se dizer que o isolado 3B.17B, pertence ao gênero *Microbacterium*

No Filo Proteobacteria, pode-se observar a presença de 2 agrupamentos distintos, C e D. O agrupamento C foi formado pelos isolados 3B.11A, 3B.11B, 3B.20 e 6B.4B foram agrupados com *Ochrobactrum pseudogrignonense* (GenBank: AM422371) e *Ochrobactrum haematophilum* (GenBank: AM422371). O quinto agrupamento, D, o isolado D3.6A agrupou-se com *Stenotrophomonas maltophilia* (GenBank: KF913836). Portanto, nesse filo mostra que no primeiro agrupamento, C, os isolados, provavelmente são do gênero *Ochrobactrum*, pertencente à

Classe Alphaproteobacteria, e no segundo agrupamento, D, os isolados provavelmente são do gênero *Stenotrophomonas*, pertencente à Classe Gammaproteobacteria.

O *out-group*, foi formado por sequências de *Burkholderia cepacia*, obtidas no banco de dados do NCBI pelos códigos de acesso EU603699 e U96927.

4.7 Identificação molecular dos fungos endofíticos

Os 6 fungos obtidos de sementes de guaranazeiro foram submetidos ao sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, com a utilização do programa BLASTn no banco de dados do NCBI, e a identificação dos isolados se encontra na Tabela 10:

Tabela 10 - Identificação dos fungos pelo sequenciamento da região ITS do rDNA

Isolado	Identificação	Número de Acesso	Similaridade (%)
C7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	KM111487.1	100
C8	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	KF814723.1	98
C9.1	<i>Fusarium decemcellulare</i>	KF918599.1	98
C9.2	<i>Fusarium</i> sp.	KF746131.1	99
C9.3	<i>Fusarium</i> sp.	KF746131.1	99
S7BA	<i>Fusarium decemcellulare</i>	GU797410.2	99

Ao todo foram utilizadas 6 sequências obtidas neste trabalho, 13 sequências de interesse para o agrupamento e 1 sequência foi utilizada como *out-group* (Figura 13).

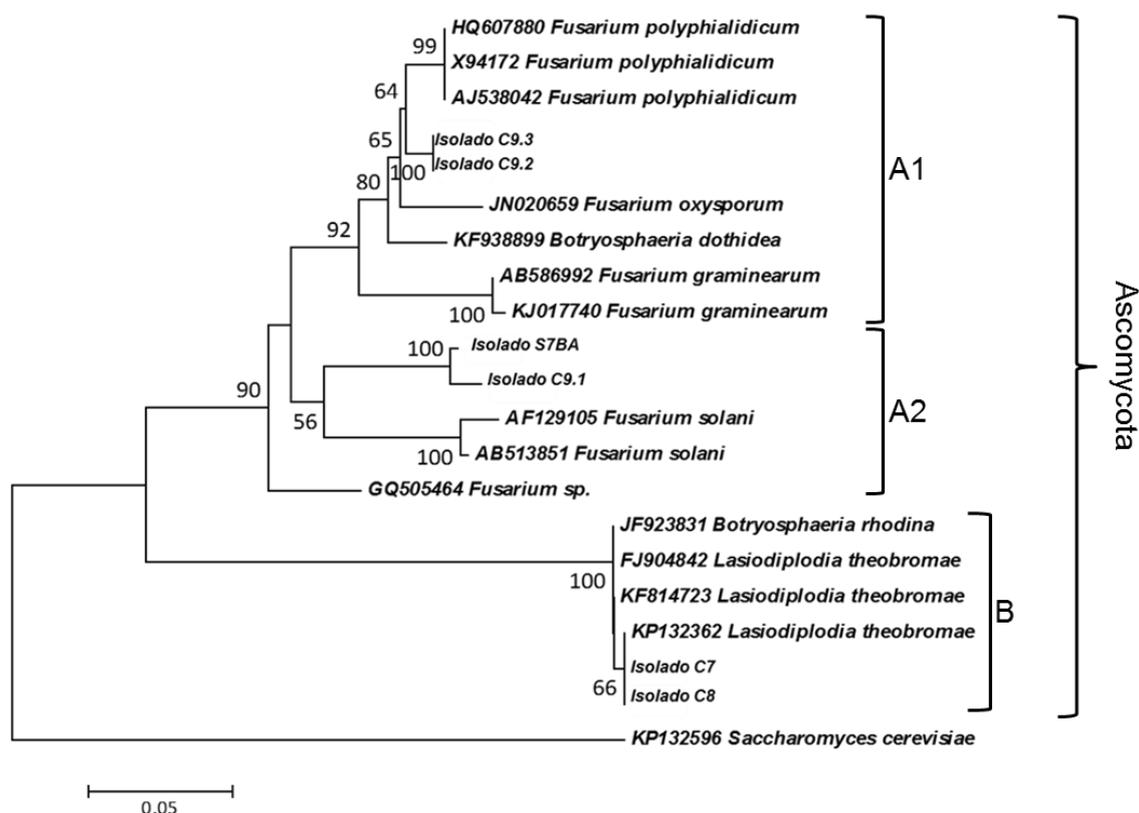


Figura 13 - Dendrograma determinado pelo método *Neighbor-Joining* e a relação entre as sequências foi inferida usando método *Muscle*; os dados observados nos ramos indicam valores de *bootstrap* acima de 50%, total de 1000 repetições

No dendrograma dos isolados fúngicos de semente de guaranazeiro (Figura 13), realizado pelo sequenciamento da região ITS do rDNA, foi observada a similaridade dos isolados e foi possível detectar a presença de 2 gêneros: *Fusarium* e *Lasiodiplodia*, pertencentes ao Filo Ascomycota

No dendrograma foi observado um Filo, Ascomycota, que se divide em dois cladogramas comparados com sequências obtidas pelo banco de dados NCBI. O primeiro clado foi subdividido em 2 agrupamentos (A1 e A2): o primeiro, A1, contém os isolados C9.2 e C9.3 que possuem maior similaridade entre si, juntamente com *Fusarium polyphialidicum* (GenBank: HQ607880; X94172 e AJ538042), com *Fusarium oxysporum* (GenBank: JN020659), com *Botryosphaeria dothidea* (GenBank: KF938899); e com *Fusarium graminearum* (GenBank: AB586992 e KJ017740). O segundo agrupamento, A2, que contém os isolados S7BA e C9.1 que possuem similaridade maior entre si e com *Fusarium solani* (GenBank: AF129105 e AB513851). Assim, os dois agrupamentos estão fortemente relacionados ao gênero *Fusarium*, mesmo que a espécie não esteja claramente evidenciada no agrupamento.

O segundo clado (B) estão alocados os isolados C7 e C8, agrupados com as espécies *Botryosphaeria rhodina* (GenBank: JF923831) e *Lasiodiplodia theobromae* (GenBank: KP132362, FJ904842 e KF814723), evidenciando maior similaridade com a espécie *Lasiodiplodia theobromae*.

Como *out-group*, utilizou-se uma sequência do Filo Ascomycota, *Saccharomyces cerevisiae* KP132596, grupo distantemente relacionado às sequências fúngicas utilizadas neste trabalho. Os valores de *bootstrap* mostrados na filogenia encontram-se acima de 50%.

4.8 Identificação morfológica dos fungos

A identificação morfológica foi realizada, gentilmente pelo grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco (Coleção de Culturas – Micoteca URM 604, do Departamento de Micologia/CCB/UFPE), pela curadora Cristina Maria de Souza Motta. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Identificação morfológica dos fungos isolados de sementes de guaranazeiro

Isolado	Identificação
C7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon &Maubl.
C8	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon &Maubl.
C9.1	<i>Fusarium decemcellulare</i> Brick.
C9.2	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.
C9.3	<i>Fusarium redolens</i> Wollenw.
S7BA	<i>Fusarium decemcellulare</i> Brick.

A identificação morfológica é semelhante a identificação obtida pelo sequenciamento da região ITS do rDNA, conforme a Tabela 10.

5 DISCUSSÃO

Um novo conceito para uma visão holística de uma planta é considerá-la como um sistema abrangendo componentes vegetais e componentes microbianos. Atualmente sabe-se que os microrganismos, principalmente fungos e bactérias relacionados à espécies vegetais, em número de células, suplantam o número de células do hospedeiro vegetal (MENDES; AZEVEDO, 2007; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007), como aliás acontece também quando se comparam células de microrganismos com seus hospedeiros inclusive a espécie humana. Desta forma, pesquisas devem, em muitos aspectos, envolver não apenas o hospedeiro mas sim, no caso de vegetais, o complexo planta-microrganismos. O guaranazeiro ou simplesmente guaraná, originário da Amazônia vem se tornando de grande valor biotecnológico especialmente pelas suas propriedades medicinais e produção de bebidas. Um projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) realizado principalmente na Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e Universidade do Amazonas (UFAM), visou o estudo do complexo Guaraná-microbiota. Com início em 2010, foram sendo acumulados dados sobre bactérias e fungos epifíticos, endofíticos e da rizosfera do guaraná, que potencialmente vem produzindo resultados importantes sobre o papel dos microrganismos na produção de fitohormônios, para o controle biológico da antracnose do guaraná e para produção de produtos de valor biotecnológico, entre eles, enzimas. Um dos pontos pouco ou ainda não abrangidos até o momento, foi o estudo da microbiota de sementes do guaraná, objeto da presente pesquisa. Foram usadas sementes dos dois principais estados produtores brasileiros, a Bahia e o Amazonas, o primeiro no qual aparentemente não há problemas com a antracnose, principal doença do guaraná e o segundo no qual a antracnose constitui-se em um grave problema fitossanitário.

Os dados do presente trabalho, mostram que cerca de 24.000 e 29.000 bactérias (UFC) foram obtidas em média por grama de sementes de guaraná na Bahia e Amazonas respectivamente (Tabela 1), não havendo portanto diferenças significativas entre elas neste aspecto. Em relação aos fungos, as sementes de guaraná são bastante pobres ocorrendo apenas 5% de incidência de endófitos em fragmentos de sementes da Bahia e 0% nas sementes do Amazonas. Dois gêneros

foram encontrados, *Lasiodiplodia* e *Fusarium* (Tabela 11). Os testes de antibiose entre estes fungos e *Colletotrichum* bem como produção de enzimas (Tabelas 2 a 8) foram positivos em vários isolados e podem ser futuramente pesquisados para verificar se eles estariam inibindo a incidência de antracnose na Bahia. Entretanto, deve ser mencionado que o plantio de Guaraná na Amazônia é feito em grande parte através de clones por estaquia e na Bahia é feito por sementes. Este fator pode ser importante para aumento de diversidade de plantas da Bahia em relação às do Amazonas. Também, muito importante e possivelmente, independentemente da microbiota, as condições climáticas do Amazonas devem favorecer a incidência da doença, se constitui problema na região.

Quanto ao número de bactérias e fungos em sementes de guaraná, os dados se assemelham ao que em geral é encontrado em outras sementes vegetais. Mano et al (2006) em endófitos de arroz encontraram de 100 a 10.000 bactérias por grama de semente, similares aos encontrados em sementes de soja (KREMER, 1987). Em trabalho realizado no nosso laboratório pelo isolamento de bactérias endofíticas de várias espécies de eucalipto, Ferreira et al. (2008) apresentaram resultados evidenciando um menor número de bactérias que variaram 183 UFC/g em *Eucalyptys brassiana* até ausência completa de bactérias em *E. dunnii* e *E. grandis*. Com relação ao isolamento de fungos endofíticos de sementes de outros vegetais como de caupi e bambú (RODRIGUES; MENEZES, 2002; SHEN et al., 2014) muitos gêneros e espécies foram encontradas, muito mais que os poucos fungos encontrados em sementes de guaraná. Valores bem maiores de endofíticos são encontrados em outros tecidos vegetais e na rizosfera (BONATELLI, 2012; BATISTA, 2013). Segundo Cankar et al. (2005) o tempo de armazenamento e dormência de sementes podem ocasionar um decréscimo nas quantidades de endófitos, proporcional ao tempo de estocagem das mesmas, bem como a distribuição de endófitos em sementes é aleatória e a quantidade de endófitos varia com a espécie vegetal ou anatomia e fisiologia da semente. No nosso trabalho, como as sementes foram coletadas em outros locais e transportadas não só via aérea mas também por correio, isto pode ter afetado, reduzindo a incidência de endófitos nas sementes pesquisadas.

Testes de antagonismo podem indicar o potencial para controle biológico de pragas e patógenos, utilizando microrganismos endofíticos auxiliando o combate de doenças e pragas, sem agredir o ambiente com substâncias tóxicas, como alguns

agroquímicos. 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 (SOBRAL et al., 2014).

Um total de 16 isolados bacterianos provenientes de sementes de guaranazeiro, testados *in vitro* contra o fungo *Colletotrichum*, tiveram índice de redução do crescimento do fitopatógeno entre 32,32% e 63,78%, sendo os resultados mais expressivos obtidos com endófitos do gênero *Bacillus* (Tabela 2). Em trabalho semelhante, Bonatelli (2012) observou que 8 e 15% dos isolados bacterianos foliares de guaranazeiros do Amazonas pesquisados mostraram algum tipo de inibição de crescimento do fitopatógeno *Colletotrichum*. Dentre esses, a porcentagem de inibição do crescimento de *Colletotrichum* ficou entre 25 a 55%, sendo o gênero *Bacillus*, o isolado epifítico, com resultado mais expressivo. Tsui (2012) encontrou 10% de bactérias endofíticas como antagonistas de *Colletotrichum* e uma delas do gênero *Serratia* foi a melhor delas, com 30% de inibição. Bogas (2012) obteve de *Bacillus subtilis* isolado de folhas de guaraná da Amazônia, vários metabólitos secundários sendo um deles, uma iturina, apresentando excelente atividade antagônica contra *Colletotrichum*. Testes de antibiose realizados com outros patógenos contra endófitos de plantas entre elas o milho (SHIOMI et al., 2008) também evidenciaram o gênero *Bacillus* com um bom potencial como antagonista. Em relação a antagonismo obtido por fungos endofíticos de guaranazeiro contra *Colletotrichum*, resultados promissores têm sido obtidos *in vitro* por Bezerra (2014), tendo sido selecionados fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Schizophyllum* com 31 a 45% de inibição. Elias (2013) com fungos endofíticos da Amazônia tem também isolado metabólitos secundários que potencialmente poderão ser utilizados no controle químico de *Colletotrichum* do guaranazeiro.

Os dados obtidos no presente trabalho também revelam em testes de antagonismo com bactérias e fungos e, estes últimos isolados de sementes provenientes de guaraná da Bahia (Tabelas 3 e 11), resultados potencialmente favoráveis contra *Colletotrichum*, analisados por dois métodos e diferentes tipos de interação (A, B, CA1 e CB1), esses valores foram semelhantes aos encontrados em Bernardi-Wenzel et al. (2013). Entretanto, tem-se que levar em conta que a comparação entre estes índices *in vitro* fica difícil e somente futuros ensaios em campo podem indicar se haverá realmente possibilidade de controle biológico do

Colletotrichum em guaraná *in vivo*. Dados preliminares obtidos por Bezerra (2014) em testes *in vivo* com guaraná em Manaus-Amazonas tem se mostrado bastante promissores e poderão ser de utilidade no controle da antracnose naquela região.

Os microrganismos endofíticos, além de serem habitantes do interior de vegetais, possuem propriedades de interesse agrícola como proteção das plantas contra insetos-pragas, contra microrganismos patogênicos e também animais herbívoros. Tem também interesse biotecnológico na produção de toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos outros produtos com funções de importância para a sobrevivência do hospedeiro (MELO; AZEVEDO, 1998b). Dentre eles destacam-se as enzimas que além de poderem ser usadas para diferentes finalidades, podem ter função como endófitos, no controle de doenças de plantas.

No presente trabalho, fungos e bactérias isolados de sementes de guaraná apresentaram potencial biotecnológico para atividade enzimática como: amilolítica, celulolítica, pectinolítica, lipolítica, esterásica e proteolítica. Em torno de 25% das bactérias isoladas tiveram algum tipo de atividade enzimática, porém, nenhuma bactéria apresentou atividade lipolítica e esterásica (Tabela 4 a 7). O IE (índice enzimático) no presente trabalho, variou de 1,19 a 2,33. Em pesquisa semelhante, Bonatelli (2012), analisou bactérias 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% lipases, 20,8% esterases, 22,7% pectinases e 44% proteases. A mesma autora verificou que celulase, amilase, lipase, esterase, protease, poligalacturanase e pectina-liase foram produzidas por várias bactérias tanto provenientes de plantas sintomáticas (com sintomas de antracnose) como assintomáticas (aparentemente saudas) com diferenças estatisticamente significantes para amilase, lipase, e poligalacturanase para as assintomáticas em relação às sintomáticas o que poderia indicar que elas exerçam um papel no controle da antracnose em plantas saudas. Dados interessantes foram obtidos por Tsui (2012) pela verificação da presença da enzima quitinase preferencialmente por bactérias provenientes de plantas saudas de guaraná da Amazônia em comparação com plantas afetadas pela doença. Como se sabe, a quitinase tem atividade no controle biológico de fungos patogênicos, por exemplo em cana-de-açúcar (QUECINE et al., 2008).

No nosso trabalho, com fungos provenientes de sementes da Bahia, todos produziram pelo menos uma das enzimas pesquisadas, com exceção de proteases. Por outro lado a inexistência de fungos provenientes de sementes da Amazônia poderia indicar que eles teriam um papel na prevenção da doença. Entretanto, o pequeno número de dados não permite, no momento, uma conclusão que terá que ser comprovada ou não, pelo isolamento e testes de atividade enzimática com maior amostragem de isolados microbianos de sementes das duas regiões.

No presente trabalho apenas bactérias que produziram algum tipo de atividade antagônica ou produção de enzimas foram identificadas por processos moleculares. Como já discutido anteriormente, foram encontradas bactérias preferencialmente do gênero *Bacillus*, gênero muito conhecido como produtor de enzimas e outros produtos de interesse biotecnológico. Assim, pouco pode ser concluído com relação às diferenças entre bactérias endofíticas provenientes de guaranazeiros da Amazônia e da Bahia. Entretanto, se compararmos dados obtidos por outros autores, pode ser verificado que os estudos de Bonatelli (2012) e Tsui (2012) revelam predominância dos gêneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* em tecidos de guaraná da Amazônia. Interessante é que plantas atacadas por *Colletotrichum* (sintomáticas) tem predominância dos gêneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas* enquanto nas sadias (assintomáticas) há predominância de *Enterobacter*, *Acinetobacter* e *Bacillus*. É possível que estes gêneros predominantes em plantas assintomáticas possam contribuir para reduzir a incidência de antracnose, especialmente o gênero *Bacillus* que como mostram os dados no presente trabalho, preferencialmente antagonismo contra *Colletotrichum* além de se salientarem como produtores de enzimas hidrolíticas.

O presente trabalho juntamente com o de Sia et al. (2013) é um dos primeiros a relacionar isolados endofíticos de guaraná, por meio de dendograma.

O Filo Firmicutes apresentou 12 das 19 sequências obtidas, sendo o Filo com maior número de representantes endofíticos. O Filo Proteobacteria teve 5 isolados representantes, e o Filo Actinobacteria apenas um único isolado. Em relação aos isolados de folhas de guaraná, por Bonatelli (2012), o Filo mais abundante foi Proteobacteria, seguido de Firmicutes, sendo o mesmo observado por Mano et al. (2006), com isolados endofíticos de semente de arroz. Tais Filos são comumente encontrados em isolados endofíticos.

Com relação aos poucos fungos isolados de sementes de guaraná (*Lasiodiplodia* e *Fusarium*), pode-se notar que eles não são frequentemente encontrados em folhas e outros órgãos e tecidos de guaraná. Sia et al. (2013) isolaram e classificaram por processos moleculares 62 fungos endofíticos de folhas de guaraná amazônico com predominância dos gêneros *Daldinnia*, *Guignardia*, *Colletotrichum* e *Xylaria*, todos pertencentes ao Filo Ascomycota, o único Filo encontrado no nosso trabalho. Já os dados de Bezerra (2014) revelam como os mais comuns fungos do guaranazeiro que controlam *in vitro* *Colletotrichum*, os seguintes: *Penicillium*, *Geotrichum*, *Schizophyllum* e *Aspergillus*. Fungos isolados de outras plantas da mesma família que o guaranazeiro (Sapindaceae) por Garcia et al. (2012) e Daisy et al. (2002) mostram também gêneros de fungos endofíticos não encontrados normalmente no guaraná, porém a maioria dos isolados fúngicos encontrados são pertencentes ao Filo Ascomycota. Esse filo é comumente apresentado em diversos trabalhos relacionados a fungos endofíticos que produzem algum tipo de atividade de interesse biotecnológico mostrados em Schulz et al. (1999), Höller et al. (2000), Rodrigues e Menezes (2002), Schulz e Boyle (2005) e Suryanarayanan et al. (2009).

6 CONCLUSÕES

O número de bactérias endofíticas cultiváveis (Unidades Formadoras de Colônias-UFC), encontrado nas sementes de guaraná da Amazônia quanto da Bahia foi similar. Foi possível isolar somente raros fungos das sementes provenientes da Bahia, e não foram detectados isolados fúngicos nas sementes provenientes da Amazônia. Os dados não indicam que a presença ou ausência de microrganismos nas sementes sejam responsáveis por diferenças significativas de antracnose no Amazonas e não na Bahia. Fatores climáticos e processos de multiplicação do guaranazeiro nas duas regiões devem ser os fatores principais da incidência do fungo fitopatogênico *Colletotrichum*.

Nos testes *in vitro* de controle biológico contra a antracnose, provocada pelo fungo patógeno *Colletotrichum*, bactérias e fungos isolados das sementes de guaraná tem potencial para controlar *in vitro* o fitopatógeno, com destaque dos isolados bacterianos do gênero *Bacillus* e os isolados fúngicos de *Fusarium decemcellulare*.

Nos ensaios *in vitro* na avaliação de atividade enzimática, de bactérias endofíticas de sementes de guaraná, foram detectadas enzimas que podem ser importantes no controle do patógeno. Bactérias não produziram lipases e esterases, ao contrário dos fungos. Esses resultados mostram que tanto bactérias e fungos isolados das sementes de guaraná possuem potencial biotecnológico para produção de enzimas hidrolíticas de interesse para o setor industrial bem como algumas delas podem estar envolvidas em processos de controle de patógenos.

A comunidade bacteriana endofítica cultivável de semente de guaranazeiro estudada nesse trabalho foi constituída pelos Filos Firmicutes (*Bacillus* e *Paenibacillus*), Actinobacteria (*Microbacterium*) e Proteobacteria (*Rhizobium* e *Ochrobacterium*). A comunidade fúngica foi constituída pelos gêneros *Fusarium* e *Lasiodiplodia* pertencentes ao Filo Ascomycota. Não houve aparentes diferenças que permitam justificar a incidência da antracnose em guaranazeiro na Amazônia e Bahia mas, sugerem-se estudos posteriores com maior número de sementes que possam indicar a influência da microbiota endofítica no controle da antracnose.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, F.C. **Antracnose do guaraná**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Serviço de Informação Agrícola, 1961. 22 p.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 481 p.

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.

AMORIM, L.; REZENDE, J.; BERGAMIN, A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2011. 704 p.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.

ÂNGELO, P.C.S.; NUNES-SILVA, C.G.; BRÍGIDO, M.M.; AZEVEDO, J.S.N.; ASSUNÇÃO, E.N.; SOUSA, A.R.B.; PATRÍCIO, F.J.B.; REGO, M.M.; PEIXOTO, J.C.C.; OLIVEIRA-JUNIOR, W.P.; FREITAS, D.V.; ALMEIDA, E.R.P.; VIANA, A.M.H.A.; SOUZA, A.F.P.N.; ANDRADE, E.V.; ACOSTA, P.O.A.; BATISTA, J.S.; WALTER, M.E.M.T.; LEOMIL, L.; ANJOS, D.A.S.; COIMBRA, R.C.M.; BARBOSA, M.H.N.; HONDA, E.; PEREIRA, S.S.; SILVA, A.; PEREIRA, J.O.; SILVA, M.L.; MARINS, M.; HOLANDA, F.J.; ABREU, R.M.M.; PANDO, S.C.; GONÇALVES, J.F.C.; CARVALHO, M.L.; LEAL-MESQUITA, E.R.R.B.P.; SILVEIRA, M.A.; BATISTA, W.C.; ATROCH, A.L.; FRANÇA, S.C.; PORTO, J.I.R.; SCHNEIDER, M.P.C.; ASTOLFI-FILHO, S. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*, an anciently consumed stimulant from the Amazon rains Forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, p. 117-124, 2008.

ARAÚJO, I.L.; FREITAS, D.V.; NUNES-SILVA, C.G.; ASTOLFI-FILHO, S. Guaraná, os segredos moleculares de uma planta lendária. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 43, p. 30-35, 2009.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; VAN ELSAS, J.D.; VUURDE, J.L.V.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

ATROCH, A.L. **Avaliação e seleção de progênies de meios irmãos de guaranzeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis* (Mart.) Ducke) utilizando caracteres morfo-agronômicos**. 2009. 72 p. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

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

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**, Valparaíso, v. 3, p. 40-65, 2000.

BADALYAN, S.M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N.G. Interaction between xylophilic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiment. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 43, p. 4–48, 2004.

BADALYAN, S.M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N.G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 41, p. 200-225, 2002.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford, UK: CAB International, 1992.

BASILE, A.; FERRARA, L.; PEZZO, M.D.; MELE, G.; SCORBO, S.; BASSI, P.; MOTESANO, D. Antibacterial and antioxidante activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 102, p 32-36, 2005.

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, 2013.

BERNARDI-WENZEL, J.; GARCIA, A.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Molecular characterization by amplified ribosomal DNA restriction analysis and antimicrobial potential of endophytic fungi isolated from (Malvaceae) against plant pathogenic fungi and pathogenic bacteria. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 5072-5084, 2013.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.

BEZERRA, T.E. **Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) no controle biológico da antracnose**. 2014. 68 p. Exame de Qualificação (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 343–350, 2001.

BOGAS, A.C. **Microrganismos endofíticos do guaranazeiro e seus produtos na inibição de *Colletotrichum sp.* in vitro**. Brasília, DF, 2012. (Relatório apresentado ao CNPq).

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.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, n. 3, p. 237-246, 2007.

CANKAR, K.; KRAIGHER, H.; RAVNIKAR, M.; RUPNIK, M. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L.Karst). **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v. 244, p. 341-345, 2005.

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.

CRUZ, M.E.S.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CLEMENTE, E.; ITAKO, A.T.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.J.S. Plant extracts for controlling the post-harvest anthracnose of banana fruit. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 4, supl. 1, p. 727-733, 2013.

DAISY, B.; STROBEL, G.; EZRA, D.; CASTILLO, U.; BAIRD, G.; HESS, W.M. *Muscodor vitigentus* anam. sp. nov., an endophyte from *Paullinia paullinioides*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 84, p. 39-50, 2002.

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.

ELIAS, L.M. **Bioprospecção de fungos endofíticos isolados do guaranazeiro da Amazônia**. 2013. 75 p. Exame de Qualificação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

EMBRAPA.. **Cultura do guaranazeiro no Amazonas**. 4. ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, Centro de Pesquisa Agroflorestal, 2005. 22 p. (Sistema de Produção, 2).

EMMERT, E.A.B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 171, p. 1–9, 1999.

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVAL, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 287, p. 8-14, 2008.

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

FIGUEIREDO, L.C.; FIGUEIREDO, G.S.; QUECINE, M.C.; CAVALCANTI, F.C.N.; SANTOS, A.C.; COSTA, A.F.; OLIVEIRA, N.T.; AZEVEDO, J.L. Genetics of pathogenic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* the causal agent of cashew anthracnose. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, Jaipur, v. 2, p. 250-259, 2012a.

FIGUEIREDO, L.C.; FIGUEIREDO, G.S.; GIANCOLI, A.C.H.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.A.O.; KITAJIMA, E.W.; ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, J.L. Detection of isometric dsRNA-containing viral particles in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from cashew trees. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 37, p. 142-145, 2012b.

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

FIGUEIREDO, N.N.; MACÊDO, J.L.V.; CRAVO, M.S. Avaliação do estado nutricional do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum) em um Sistema Agroflorestal na Amazônia Central. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 3., 2000, Manaus. **Resumos**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. p. 48-50.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 14, p. 12-16, 2000.

GARCIA, A.; RHODEN, S.A.; RUBIN-FILHO, C.J.; NAKAMURA, C.V.; PAMPHILE, J.A. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. **Biological Research**, Santiago, v. 45, p. 139-148, 2012.

GILKES, N.R.; HENRISSAT, B.; KILLBURN, D.G.; MILLER JUNIOR, R.C.; WAREN, R.A.J. Domains in microbial beta-1,4-glycanases: sequence conservation, function and enzymes families. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 55, p. 303-315, 1991.

GOMES, E.C.; SERRA, I.M.R.S. Eficiência de produtos naturais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em pimenta na pós colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 4, p. 290-292, 2013.

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

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HÖLLER, U.; WRIGHT, A.D.; MATTHÉE, G.F.; KONIG, G.M.; DRAEGER, S.; AUST, H.J.; SCHULZ, B. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 11, p. 1354-1365, 2000.

IBGE. **Amazonas**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=am>>.

IBGE. **Amazonas**. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=am>>.

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

KREMER, R.J. Identity and properties of bacteria inhabiting seeds of selected broadleaf weed species. **Microbial Ecology**, New York, v. 14, p. 29-37, 1987.

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.

MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; PRETE, C.E.C.; HOMECHIM, M.; ONO, E.Y.S.; VILAS-BOAS, L.A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M.C.; FUNGARO, M.H.P. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n.1, p. 45-49, 2005.

MANO, H.; TANAKA, F.; WATANABE, A.; KAGA, H.; OKUNISHI, S.; MORISAKI, H. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, Xiamen, v. 21, n. 2, p. 86-100, 2006.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico I**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998a. 264 p.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998b. 488 p.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico II**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000a. 308 p.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico III**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000b. 388 p.

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

MOLINA, G.; PIMENTEL, M.R.; BERTUCCI, T.C.P.; PASTORE, G.M. Application of fungal endophytes in biotechnological processes. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 27, p. 289-294, 2012.

NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 29, p. 62-76, 2003.

OLIVEIRA, L.A. Ocupação racional da Amazônia: o caminho para preservar. In: VAL, A.L.; FIGLIUOLO, R.; FELDBERG, E. (Ed.). **Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia: fatos e perspectivas**. Manaus: INPA, 1991. p. 47-52.

PAMPFILE, J.A.; AZEVEDO, J.L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*L). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 391-396, 2002.

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.

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**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1797-1803, 2013.

POLO, S.H.O. **Estrutura e desenvolvimento de sementes de *Paullinia* L. (Sapindaceae)**. 2006. 118 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

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

QUECINE, M.C.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; GAI, C.S.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, p. 486-491, 2008.

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

RODRIGUES, A.A.C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 5, p. 532-537, 2002.

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.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, p. 827-837, 2006.

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.

SANCHEZ, P.A.; BANDY, D.E.; VILLACHICA, J.H.; NICHOLAIDES, J.J. Amazon basin soils: management for continuous crop production. **Science**, Washington, DC, v. 216, p. 821-827, 1982.

SAVIO, G.M.; PINOTTI, E.B. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *Baculovirus anticarsia*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 13, p. 7, 2008.

SCHIMPL, F.C.; SILVA, J.F.; GONÇALVES, J.F.C.; MAZZAFERA, P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 150, p. 14-31, 2013.

SCHÜLEN, M. Protein engineering of cellulases. **Biochimica et Biophysica Acta. Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1543, n. 2, p. 239-252, 2000.

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

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.-K.; DAMMANN, U.; AUST, H.-J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, n. 10, p. 1275-1283, 1999.

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.

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

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

SHEN, X.-Y.; CHENG, Y.-L.; CAI, C.-J.; FAN, L.; GAO, K.; HOU, C.-L. Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi isolated from moso bamboo seeds. **PloS One**, San Francisco, v.9, n. 4, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0095838.

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

SIA, E.F.; MARCON, J.; QUECINE, M.C.; TSUI, S.; PEREIRA, J.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. **SpringerPLUS**, Cham, Switzerland, v. 2, p. 579, 2013. doi:10.1186/2193-1801-2-579.

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

SILVA, K.S.; REBOUÇAS, T.N.H.; LEMOS, O.L.; BOMFIM, M.P.; BOMFIM, A.A.; ESQUIVEL, G.L.; BARRETO, A.P.P.; JOSÉ, A.R.S.; DIAS, N.O.; TAVARES, G.M. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, p. 131-133, 2006.

SOBRAL, J.K.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; LACAVA, P.T. Aspectos gerais de microorganismos endofíticos. In: ARAÚJO, W.L.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização**. Santarém: UFOPA, 2014. p. 11-27.

SOUZA, A.L.; ÂNGELO, P.C.S.; NOGUEIRA, P.P.O.; GONÇALVES, J.E.C.; FRANCO, A.M.; ASTOLFI-FILHO, S.; LOPEZ-LOZANO, J.L.; ANDRADE, E.V. Methods for obtaining high-resolution proteomic analysis from percarp of guaraná. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, p. 8014-8024, 2014.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, Pittsburg, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUN, C.; MAO, S.L.; ZHANG, Z.H.; PALLOIX, A.; WANG, L.H.; ZHANG, B.X. Resistances to anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) of *Capsicum* mature green and ripe fruit are controlled by a major dominant cluster of QTLs on chromosome P5. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 181, p. 81-88, 2015.

SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 9-19, 2009.

SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford, UK: CAB International, 1992. p. 1-26.

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.

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

TIWARI, K.; SAILAJA, I.A.; SHAKER, I.A. Exploitation of fungi: Redefined. **International Journal of Integrative Medical Sciences**, Vizianagaram, India, v. 1, p. 30-40, 2014.

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.

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

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

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols**: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. v. 18, p. 315-322.

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.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 51, p. 221-271, 1987.