

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*
H.B.K. var. *sorbilis* (Matius) Ducke) SAPINDACEAE.

BOLSISTA: JOSÉ LUIZ COSTA MENDES

Manaus
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-B 0020/2010

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*
H.B.K. var. *sorbilis* (Matius) Ducke) SAPINDACEAE.

Bolsista: José Luiz Costa Mendes
Orientadora: Profa. Dra. Rozana de Medeiros Sousa Galvão
Colaboradores: Prof. Dr. Pedro Queiroz Costa Neto
Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Manaus
2011

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*
H.B.K. var. *sorbilis* (Matius) Ducke) SAPINDACEAE.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*
H.B.K. var. *sorbilis* (Matius) Ducke) SAPINDACEA.

Bolsista: José Luiz Costa Mendes - CNPq
Orientadora: Profa. Dra. Rozana de Medeiros Sousa Galvão

Manaus
2011

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Lista de Figuras

Figura 1 - Vista da Fazenda Santa Helena, Maués.....	16
Figura 2 - Plantas pertencentes à Fazenda experimental; Manaus.....	17
Figura 3 - Esquema da assepsia do material biológico para isolamentos das bactérias endofíticas.....	18
Figura 4 - Gel de agarose 1%, mostrando a amplificação de 22 colônias de bactérias endofíticas assim discriminados: 1 ao 18 os indivíduos 2; 3; 8;; 9; 11; 15;17;18 não amplificaram. Os indivíduos 22; 27; 33; 34; 35 também não amplificaram.....	22

Lista de Tabela

Tabela 1 - Reação de otimização da PCR.....	20
Tabela 2 - Amplificação de DNA em um Termociclador.....	20
Tabela 3 - Primers utilizados para a identificação das bactérias endofíticas isoladas do guaranazeiro.....	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Bactérias endofíticas.....	12
2.2 Hospedeiros.....	13
2.3 Genética molecular de microrganismos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Material vegetal e local de coleta.....	15
3.2 Isolamento das bactérias endofíticas.....	16
3.3 Purificação das bactérias endofíticas isoladas.....	17
3.4 PCR de colônias.....	18
3.4.1 Desnaturação.....	18
3.4.2 Amplificação.....	18
3.4.3 Eletroforese.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Isolamento e identificação das bactérias endofíticas.....	20
4.2 Amplificação do gene 16S rDNA.....	20
5. CONCLUSÕES.....	22
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

As bactérias constituem um dos grupos mais diversos da Terra e podem compreender mais de um milhão de espécies (KENNEDY, 2004). Apesar dessa grande diversidade estima-se que tenhamos conhecimento de apenas uma pequena fração das bactérias existentes (TORSVIK et al., 2002). Elas estão presentes em todos os ambientes terrestres e, através de sua atividade metabólica, afetam as propriedades químicas e físicas de todo o ambiente à sua volta (NEWMAN e BANFIELD, 2002) ocupando e colonizando todos os nichos possíveis, desde o sistema digestório de animais superiores e materiais mortos até fontes termais, incluindo as superfícies e interior de plantas, água doce e salgada, interior de rochas e geleiras.

Em particular, as plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano. Nestas plantas hospedeiras, diferentes nichos são ocupados pelos microrganismos, tais como as superfícies das raízes e folhas (as epífitas), ou então, estão colonizando o interior de diversos tecidos das plantas. As bactérias que vivem no interior das plantas podem ser divididas em dois grupos, com base na sua relação com o hospedeiro.

O primeiro grupo é das bactérias endofíticas que são geralmente definidas como aquelas que vivem no interior das plantas sem causar danos visíveis (HALLMANN et al., 1998). Esse conceito as diferencia do outro grupo de bactérias que, apesar de também viver no interior da planta pode causar doença, trazendo prejuízo ao seu hospedeiro. Este segundo grupo é composto pelas bactérias patogênicas. Essa diferenciação não é definitiva, uma vez que a relação benéfica ou patogênica depende de fatores como as condições ambientais ou do equilíbrio com as outras populações bacterianas. Sendo assim, uma bactéria endofítica pode, dependendo das condições, se tornar um patógeno. Ou ainda, uma epífita pode entrar na planta, tornando-se endofítica ou patogênica (SABARATNA e BEATTIE, 2003; KLOPPER et al., 1992). Apesar de sua importância, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (PACE, 1997). Este fato se deve em parte aos métodos de isolamento e identificação usados. Atualmente um maior número de organismos tem sido identificado e tantos outros reclassificados pelo uso de técnicas de identificação e

classificação molecular, muitas delas permitindo a identificação de organismos não cultuiváveis (KIRCHOFF et al., 1997; UEDA et al., 1995).

Nos últimos anos os estudos de diversidade endofítica bacteriana de uma extensa variedade de plantas têm sido realizados utilizando principalmente técnicas de tipagem molecular. Recentemente Mocali et al., (2003) pesquisaram a diversidade endofítica em *Ulmus spp.* Utilizando as técnicas de sequenciamento do gene rRNA 16S e ARDRA, encontrando representantes de *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Enterobacter* e *Stahlylococcus*.

Um dos desafios da sistemática tem sido estabelecer uma classificação que reflita a filogenia dos organismos. Nesse contexto, surge a possibilidade de se usar marcadores moleculares que reflitam a sua origem evolutiva e auxiliem na sua classificação e que tenham relação com o hospedeiro.

O cultivo do guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é importante para a economia nacional possuindo uma área plantada de 15.278 ha, produzindo 4.604 t de sementes secas numa área colhida de 15.271 ha, representando uma produtividade média de 301 Kg ha⁻¹. O maior produtor é o Estado da Bahia com 6.634 ha e produtividade de 408 Kg ha⁻¹ enquanto o Amazonas fica em segundo lugar com 206 Kg ha⁻¹ numa área colhida de 8.039 ha, conforme dados do IBGE (2011) ano base 2009.

No Amazonas, em 2009, destacaram-se os municípios Parintins, Maués, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva como os principais produtores dessa cultura (IBGE, 2011). Um dos fatores que tem limitado a expansão dessa cultura é a ocorrência da doença antracnose, cujo agente causal é o fungo filamentoso *Colletotrichum guaranicola* Albuq (BENTES e MATSUOKA, 2002; BENTES e BARRETO, 2004; MILÉO et al., 2007; BENTES e COSTA NETO, 2011). A Embrapa Amazônia Ocidental tem produzido cultivares de guaranazeiro que possuem a polaridade da produtividade e resistência como melhoria e ofertado aos produtores (NASCIMENTO FILHO et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivos: isolar, purificar, caracterizar e identificar (este último por métodos moleculares) as bactérias endofíticas dos frutos, das folhas e caules de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Martius) Ducke (guaranazeiro).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias endofíticas

Apesar da ocorrência de bactérias endofíticas em diferentes plantas, pouco se sabe sobre sua identidade, diversidade e níveis populacionais nos diferentes tecidos. As bactérias endofíticas provavelmente desenvolveram íntima relação com sua planta hospedeira através de processos coevolucionários e podem influenciar a fisiologia da planta de alguma forma ainda não elucidada (MISAGHI & DONNDELINGER, 1990).

Um dos trabalhos pioneiros no estudo das bactérias endofíticas foi realizado por Colombo (1978), no qual relatou a ocorrência de bactérias endofíticas no talo de algas, entre sífões e dentro dos filamentos cenocíticos.

As bactérias endofíticas, assim como os fitopatógenos, apresentam a capacidade de penetrar e se disseminar sistemicamente na planta hospedeira, habitando de forma ativa o apoplasto (QUADT-HALLMANN et al., 1997b), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997) e, ocasionalmente, colonizando os espaços intracelulares (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996; QUADT-HALLMANN et al., 1997a). Esta colonização apresenta um nicho ecológico semelhante ao ocupado por fitopatógenos, o qual pode se apresentar como um agente de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997). Os mecanismos de controle podem ser por ação direta sobre o patógeno no interior da planta (PAN et al., 1997), por antibiose (PLEBAN et al., 1997; STURZ et al., 1998), ou indiretamente por indução de resistência sistêmica no hospedeiro (DUIJFF et al., 1997; KRISHNAMURTHY; GNANAMANICKAM, 1997; M'PIGA et al., 1997; RAUPACH; KLOEPPER, 1998) e/ou por competição por nutrientes (MARI et al., 1996).

Apesar do uso de endófitos no controle de doenças serem constantemente descritos na literatura, poucos estudos são direcionados para a elucidação da interação entre bactérias e fungos endofíticos e vírus, pois, estes organismos ocupam nichos diferentes (DE SÁ PEIXOTO NETO, P.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. 2002)

2.2 Hospedeiro

O guaranazeiro (*Paullina cupana* var. *sorbilis* (Martius) Duke) apresenta grande importância econômica e alimentar para o Brasil, especialmente para a região Amazônica, seu centro de origem. O Brasil é o único produtor de guaraná, em escala comercial, no mundo. Mais de 15.300 ha estão plantados em diferentes estados do país, dos quais 8.029 ha situam-se no estado do Amazonas (Nascimento Filho e Atroch, 2002; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2006)

A importância econômica do guaranazeiro para a região Norte foi devidamente reconhecida com a sua escolha para o sequenciamento (Sequenciamento do Genoma do Guaraná – Brazilian Amazon Consortium for Genomic Research - Realgene). Uma das grandes descobertas realizadas foi a presença de vias metabólicas secundárias, que podem ser responsáveis pela síntese de princípios ativos importantes para os conhecidos efeitos do guaraná. Este estudo abriu caminhos para novas pesquisas como: genes de resistências a doenças, maior teor de substâncias de interesse e várias outras aplicações biotecnológicas (Angêlo et. al., 2008).

Mesmo com os estudos já realizados, o plantio do guaraná é ainda assolado com diversas pragas, a qual durante a década de 90 levou a uma quebra na produção da região Norte (Albuquerque, 1961; Bentes e Barreto, 2004; Mileo et.al. 2006; Gonçalves et. al., 2006).

2.3 Genética molecular de microrganismos

Com o advento das técnicas de biologia molecular aplicadas aos microrganismos, uma nova faceta, a caracterização molecular destes, incluindo os endófitos, ganhou uma importância muito grande, contribuindo e facilitando sobremaneira a identificação e estudo da diversidade microbiana. Estas técnicas têm como base a extração do material, o DNA; em seguida, o uso técnicas, em geral conhecidas por siglas tais como PCR, ARDRA, RAPD.

A extração do DNA é um procedimento de rotina para obter-se o material genético a ser usado em análises moleculares. É considerada uma etapa crítica nos procedimentos moleculares, pois o DNA obtido com baixa qualidade pode prejudicar os passos subsequentes.

A maioria das técnicas moleculares aplicadas a estudos microbiológicos baseia-se nas diferenças de composição dos genes ribossomais. Considerando comunidades bacterianas, o gene 16s rDNA é o mais amplamente utilizado, sendo considerado uma das mais importantes moléculas para o estudo de filogenia e ecologia microbiana. Seu sequenciamento permite identificar microrganismos em nível de gênero e possivelmente ao de espécies.

A diversidade bacteriana avaliada em vários ambientes baseando-se nos genes 16s rDNA, revela a grande diversidade que deixa de ser explorada quando apenas os métodos baseados em cultivo são aplicados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e local de coleta

Foram coletadas folhas e ramos de cinco diferentes plantas sem sintomas de guaranazeiro (*P. cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Martius) Ducke). Todos os indivíduos coletados pertenciam ao mesmo clone (série 800). Essa coleta foi realizada no mês de junho/2010 na Fazenda Santa Helena pertencente à AMBEV (American Beverage Company) localizada no município de Maués-AM (Figura 1). Também foram realizadas coletas na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas. Localizada no km 38 da rodovia BR-174, no município de Manaus/Amazonas (Figura 2).



Figura 1 – Vista da Fazenda Santa Helena, Maués.



Figura 2 – Plantas pertencentes à Fazenda experimental; Manaus

3.2 Isolamento das bactérias endofíticas

As folhas (amostras de 1 grama) foram primeiramente submetidas à desinfecção superficial (Araújo et al., 2002): lavagem em álcool por 1 minuto, lavagem em hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (v/v) por 2 minutos, lavagem em álcool 70% por 1 minuto, e duas lavagens com água destilada autoclavada. A eficácia do processo de desinfecção superficial foi observada através da semeadura de alíquotas de água da última lavagem em meio de cultura TSA 10% e estocadas em glicerol 70% a -80°C para análises posteriores descritas abaixo. Após a coleta o material foi transportado para o Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde ocorreu o isolamento.

3.2 Isolamento da Microbiota Endofítica

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas após a coleta, sendo lavado abundantemente com água corrente e detergente neutro para a retirada do excesso de microrganismos epifíticos.

A esterilização do material foi realizada em câmara asséptica. E em seguida o material vegetal foi imerso em copos de Becker contendo água

destilada esterilizada por 30 segundos; álcool 70% por um minuto; hipoclorito 3% por três minutos, álcool 70% por 30 segundos. Após isso, o material foi lavado duas vezes em água destilada autoclavada, da qual se retirou 100 µL para realizar o controle de assepsia (PEREIRA et al., 1993).

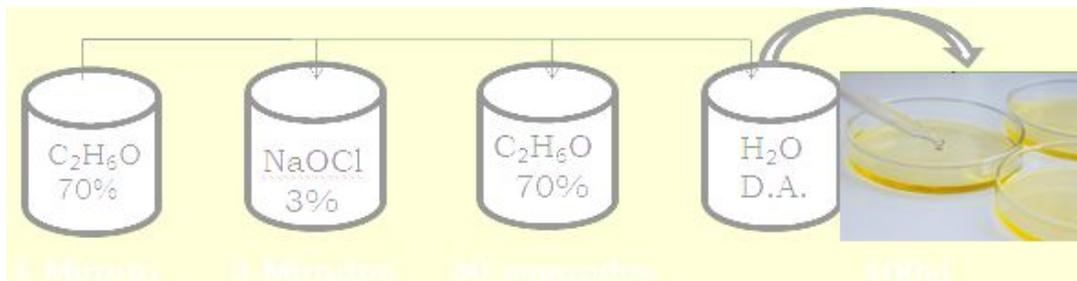


Figura 3 – Esquema da assepsia do material biológico para isolamentos das bactérias endofíticas.

Após a assepsia, o material foi triturado em almofariz contendo PBS e PVP, e plaqueado em placas de Petri contendo meios de cultura TSA, Raffinose e CHOI3. No primeiro isolamento todos esses meios foram usados. No segundo optou-se por usar apenas TSA. O sistema foi incubado em BOD, aproximadamente sete dias à temperatura de 28 °C.

3.3 Purificação das Bactérias endofíticas isoladas

A purificação das colônias de bactérias endofíticas isoladas obedecendo os seguintes procedimentos:

- a) Método de diluição seriada que consiste na diluição progressiva da suspensão bacteriana, tomando-se uma pequena alíquota de uma suspensão mais concentrada, de onde se faz a transferência desta para uma solução de PBS esterilizada, com volume previamente determinado. De cada diluição, procede-se imediatamente o espalhamento de um pequeno volume do extrato em meio de cultura, utilizando uma alça de Drigalski, com posterior incubação (28 °C / 24 horas), quando então se verificam as placas que tiveram suas colônias crescidas separadamente, de forma a permitir a sua qualificação;

- b) Por esgotamento do inóculo por estrias, consistiu em riscar a placa de Petri com meio de cultura a fim de obter uma colônia isolada.
- c) Após o processo de purificação, foi feita a descrição morfológica macroscópicas das colônias bacterianas (a olho nu, com lupa ou microscópio, usando a objeto de menor aumento).
- d) As características culturais também foram observadas em meios líquidos e sólidos inclinados (em tubos).
- e) Após a observação dessas características foi feita os esfregaços para colorações especiais, para a observação da morfologia microscópica (forma, arranjos, tamanho e reação ao Gram) presença ou ausência de esporos (forma e localização, com deformação ou não do corpo bacteriano), flagelos (número e localização), cápsulas, granulações metacromáticas (comum em corinebactérias) e coloração bipolar (frequente nas pasteurelas e yersínias). Também foi verificada a motilidade por exame a fresco. A motilidade verdadeira consiste no deslocamento com o movimento Browniano ou metabólico, isto é, o organismo vibra, mas não se desloca.

3.4 PCR de colônia

3.4.1 Desnaturação

Com um palito de madeira autoclavado tirou-se uma pequena quantidade das colônias e as inoculou em tubos eppendorf de 0,6 mL contendo 250 µl de água Milli-Q. Os tubos, cada um com uma colônia, foram levados a um termociclador onde ficaram por cinco minutos e a 90 °C.

3.4.2 Amplificação

Retirou-se 5 µl da amostra do eppendorf de 0,6 mL onde foi transferida para um de 0,2 mL Neste foi-se adicionado 20 µl do mix ficando o volume final do tubo em 25 µl (amostra + mix).

Tabela 1 – Reação de otimização da PCR

Componentes	Volume
Água Mili Q	11,7 µL
Tampão 10 X	2,5 µL
dNTP (25mM)	2,5 µL
MgCl ₂	3,0 µL
Iniciadores 1492R (R)	1,0 µL
Iniciadores 530 (F)	1,0 µL
Taq Polimerase (5U/L)	0,3 µL
DNA genômico	3,0 µL
Total	25,0 µL

A PCR foi feita utilizando o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient onde as condições de amplificação foram:

Tabela 2 – Amplificação de DNA em um Termociclador

STEP	Temperatura	Tempo	Evento
1	95 °C	3 minutos	Pré -desnaturação
2	94 °C	30 minutos	Desnaturação
3	58 °C	1 minuto	Anelamento
4	72 °C	30 minutos	Extensão
5	Repetição	2 minutos	30 ciclos
6	72 °C	50 minutos	Extensão final

Tabela 3 – Primers utilizados para a identificação das bactérias endofíticas isoladas do guaranazeiro.

Primers	Sequência
R1387	5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3'
PO27F	(5'-GAGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3')

3.4.3 Eletroforese

Para confirmar se ocorreu amplificação foi feita eletroforese em gel de agarose. Usou-se 2 µl de gel red e 5 µl de DNA. As amostras correram a 80V.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação das bactérias endofíticas

Foram isoladas 123 bactérias endofíticas, sendo 57 isoladas das folhas e 66 dos ramos. Das 57 bactérias isoladas das folhas 34 foram isoladas das plantas da AMBEV e 23 das plantas da Fazenda Experimental da UFAM, enquanto que das 66 bactérias isoladas dos ramos 30 foram isoladas da AMBEV e 33 foram isoladas da Fazenda Experimental da UFAM.

Foram observadas bactérias de diferentes cores e consistências. Quanto à cor foram notadas colônias de bactérias avermelhadas, alaranjadas, esbranquiçadas, entre outras. Quanto à consistência, algumas apresentavam-se com uma cola.

Das 123 bactérias isoladas foram identificadas 94 bactérias, sendo pertencentes aos gêneros *Acinetobacter* e *Bacillus*. As 29 bactérias foram identificadas como leveduras.

4.2 Amplificação do gene 16S rDNA

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada diretamente das colônias bacterianas crescidas em meio TSA 10%. Para as reações de PCR foram utilizados os *primers* R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3') (Heuer et al., 1997) Figura 4.

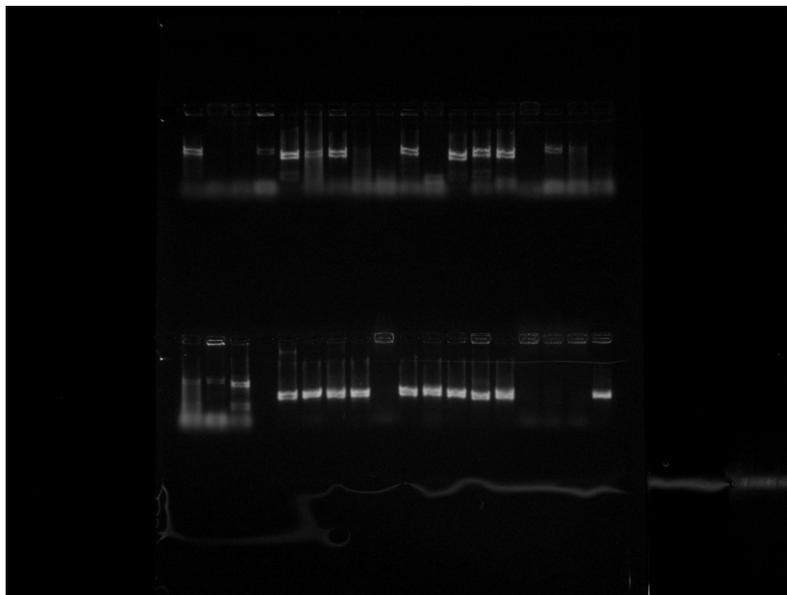


Figura 4 – Gel de agarose 1%, mostrando a amplificação de 22 colônias de bactérias endofíticas assim discriminados: 1 ao 18 os indivíduos 2; 3; 8;; 9; 11; 15;17;18 não amplificaram. Os indivíduos 22; 27; 33; 34; 35 também não amplificaram.

Os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados (1400 pb) foram purificados com polietilenoglicol (PEG 8000 20%; NaCl 2,5 mM) e então sequenciados no Centro de Estudo do Genoma Humano, Instituto de Ciências Biológicas-USP. Foi efetuada uma busca de similaridade no banco de dados do GenBank por meio do programa BLASTn (Altshul, 1997). Esse programa está disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov). A qualidade do alinhamento foi avaliada pelo melhor *score* de alinhamentos locais entre a seqüência submetida e o banco de dados. Dessa forma, somente as seqüências que apresentaram os valores mais altos de similaridade foram levadas em consideração.

Os gêneros *Acinetobacter* e *Bacillus* foram isolados como endofíticos, entretanto vale salientar que *Acinetobacter* se destaca entre os isolados epifíticos enquanto *Bacillus* aparece em alta freqüência entre os endofíticos.

O gênero *Bacillus*, isolado em alta freqüência de folhas assintomáticas, possui potencial para ser explorado para diversos fins, como o controle biológico, inclusive contra fungos patogênicos (Korsten et al., 1995; Remuska e Pria, 2007; Ryu et al., 2006). Korsten et al. (1995) em seu trabalho, descreveram diferentes espécies deste gênero como potenciais antagonistas ao fungo *Colletotrichum* spp.

Remuska e Pria (2007) realizaram um trabalho cujo objetivo foi avaliar o efeito antagonista de *Bacillus thuringiensis* no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Essa espécie de *Bacillus* é largamente usada para controle biológico, especialmente de invertebrados.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho fornecerá subsídios para estudos posteriores o potencial biotecnológico das bactérias do guaranazeiro, visando especialmente o controle biológico do fungo *Colletotrichum* sp. Assim esses isolados serão ainda avaliados, inicialmente *in vitro*, quanto à produção de compostos antagonistas contra o fungo causador da antracnose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANGÊLO, P.S.; NUNES-SILVA, C.G.; BRIGIDO, M.M.; AZEVEDO, J. S.N.; ASSUNÇÃO, E.N.; SOUSA, A.R.B.; et. al. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Report**, v. 27, p. 117 – 124, 2008.

BENTES, J.L.S. & BARRETO, R.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. agente causal da antracnose do guaranazeiro. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 129 – 131, 2004.

DE SÁ PEIXOTO NETO, P.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. "Microorganismos endofíticos". *Revista Ciência e desenvolvimento*, 29, 62-76. 2002.

DUIJFF, B.J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots of by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist**, v.135, p.325-334, 1997.

GONÇALVES, J.F.C.; SANTOS JUNIOR, U.M.; SILVA, J.F.; BONATES, L.C.M.; FERNANDES, A.V. Physiological and anatomical characteristics of leaves of two clones of guarana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.3, p.393-398, 2006.

HALMMAN. J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRIGUEZ-RABANA, L.; KLOEPPER, J. Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil. Biochem.**, v. 30, n. 7, p. 925-937, 1998.

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

KENNEDY, C. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*ammophila arenaria* and *elymus mollis*) from Oregon. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 469-479. 2004.

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

KLOEPPER, J. W. et al. Proposed elimination of the term Endorhizosphere. **Phytopathology**, v. 82, p. 726-727, 1992.

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

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

MILEO, L.J.; BENTES, J.L.S; SILVA, J.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Plantas de cobertura de solo como hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 677-683, 2006.

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

M'PIGA; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, p.301-320, 1997.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, n. 154, p. 105-114. 2003.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L. Guaranazeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de Fruteiras tropicais**. UFV, Viçosa, Minas Gerais, p. 291-307. 2002.

NEWMAN DK, ; BANFIELD JF. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, n.10, v. 296, p.1071-7. 2002.

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

PAN, M. J.; RADEMAN, S.; KUNERT, K.; HASTINGS, J.W. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 by endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **Journal of Phytopathology**, v. 145, p.479-486, 1997.

PEREIRA, J.O., AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: A first report. **Mycologia**, v. 85, p. 362 – 364. 1993.

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

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.577-582, 1997b.

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

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

RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p.1158-1164, 1998.

SABARATNAM, S.; BEATTIE, G. A. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 69, n. 2, p. 1220-1228. 2003.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G. Association of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.162-167, 1998.

TORSVIK V, OVREAS L, THINGSTAD TF. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 10, n. 296; p. 1064-6. 2002.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI; T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1414-1417. 1995.