

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

**INDUÇÃO DO ENRAIZAMENTO DE MUDAS MICROPROPAGADAS  
DE BANANEIRAS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E  
BIOCONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ**

**ELIZABETH MARIA RAMOS**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**MAIO – 2011**

**INDUÇÃO DO ENRAIZAMENTO DE MUDAS MICROPROPAGADAS  
DE BANANEIRAS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E  
BIOCONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ**

**ELIZABETH MARIA RAMOS**

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009

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

Orientador: Harllen Sandro Alves Silva

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
MAIO – 2011**

## FICHA CATALOGRÁFICA

R175 Ramos, Elizabeth Maria.

Indução do enraizamento de mudas micropropagadas de bananeira por bactérias endofíticas e biocontrole do mal-do-Panamá / Elizabeth Maria Ramos. -- Cruz das Almas, Ba, 2011.

65f.; il.

Orientador: Harllen Sandro Alves Silva.

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

1.Banana – Cultivo. 2.Banana – Biocontrole. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 634.772

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

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
ELIZABETH MARIA RAMOS**

---

Dr. Harllen Sandro Alves Silva  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientador)

---

Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia  
Universidade Estadual do Centro-Oeste  
UNICENTRO

---

Dr<sup>a</sup>. Carla da Silva Sousa  
Universidade Federal do Recôncavo da  
Bahia-UFRB

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**MAIO - 2011**

## **AGRADEÇO**

A Deus pela vida.....

A maior mulher do mundo, minha mãe, **MARA**, pelo exemplo de honestidade e caráter, pelo amor, carinho, apoio em todos os momentos e por tudo que ensinou. Obrigada por tudo. Aos meus irmãos, **Elisângela, Edivânia, Eduardo e Edleuza** por tudo que passamos juntos. Aos meus sobrinhos queridos, **Júnior, Michelle e Emily** “a treteira” por todo carinho do mundo.

Ao meu esposo **José Luiz**, por acreditar em mim e me apoiar incondicionalmente. Obrigada pelo amor.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela oportunidade de viver...

A minha mãe (Mara), meus irmãos (Elisângela, Edivânia, Eduardo e Edleuza) e meu esposo (José Luiz) pelo apoio incondicional e por estarem sempre ao meu lado;

Aos meus sobrinhos Júnior, Michelle e Emily pelos momentos de alegria, amo muito vocês;

A meu orientador Dr. Harllen Sandro Alves Silva pela oportunidade na elaboração deste trabalho, pela confiança e por todo apoio, nunca vou esquecê-lo;

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela realização de mais um grande passo em minha vida;

À Fapesb pela concessão da bolsa e ao estímulo nesta caminhada;

Aos inesquecíveis colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo e Resíduos Orgânicos: Kaliane Sírio, Celma, Jorge, Luciano e principalmente a Karol por todo apoio;

Ao senhor João Vieira, técnico do Laboratório de Nematologia da Embrapa, por está sempre pronto a ajudar. Um "Grande homem". Meus sinceros agradecimentos;

Ao técnico Paulo, do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, pela autorização do uso deste laboratório. A Bizunga pela ajuda na coleta do material em campo, nunca esquecerei tanta bondade. A Raimundo do laboratório de Genética pelo apoio;

A Amália, Renata e Rejane, funcionárias do colegiado da Pós-Graduação sempre prestativas;

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, pelo apoio sempre. Lene, Augusto, Paty, Cris, Jeferson, Lica, Adailson. A amiga Ana Cláudia pelo apoio inicial, nunca a esquecerei. E a todos meus amigos do curso. Muito obrigada por tudo.

A minha amiga Paula Pomponet por todo apoio e pelas palavras de conforto.

# ÍNDICE

Página

**RESUMO**  
**ABSTRACT**

**INTRODUÇÃO**.....01

**CAPÍTULO 1**

Potencial de bactérias endofíticas na micropropagação *in vitro* e como agentes de controle biológico.....03

1.1. A cultura da banana.....06

1.2. Mal-do-Panamá.....08

1.3. A micropropagação e sua importância em produção de mudas.....11

1.4. Potencial biotecnológico das bactérias endofíticas.....14

1.4.1. Bactérias endofíticas como promotoras de crescimento de planta.....16

1.4.2. Bactérias endofíticas no controle biológico de fitopatógenos.....21

**CAPÍTULO 2**

Indução do enraizamento de mudas micropropagadas de bananeiras por bactérias endofíticas e biocontrole do mal-do-Panamá.....24

Introdução.....27

Material e Métodos.....29

Resultados.....38

Discussão.....42

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**.....52

**REFERÊNCIAS**.....53

## RESUMO

### Ramos, E. M. Indução do enraizamento de mudas micropropagadas de bananeiras por bactérias endofíticas e biocontrole do mal-do-Panamá

Várias doenças afetam a bananicultura em todo mundo. A propagação vegetativa por meio de rebento propicia a disseminação de patógenos. A micropropagação *in vitro* constitui uma ferramenta alternativa na produção de mudas de bananeira, por produzir plantas homogêneas e saudáveis. Contudo, esta técnica elimina micro-organismos que atuam de forma benéfica no desenvolvimento do vegetal. Bactérias endofíticas podem promover o crescimento pela síntese de reguladores de crescimento vegetal, bem como reduzir a incidência de patógenos. O presente trabalho teve como objetivos: a) isolar e testar bactérias endofíticas de bananeira com capacidade de promover o crescimento e inibir o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *in vitro*; b) avaliar o potencial de promoção do crescimento dos isolados na fase de enraizamento e de aclimação em mudas de bananeira, cultivares 'Maçã', 'Thap Maeo' e 'Grande Naine'; c) verificar a redução da severidade do mal-do-Panamá em mudas de bananeira cultivar 'Maçã' microbiolizadas com endófitas antagonistas ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. De um total de 200 bactérias endofíticas isoladas de tecidos internos (raiz, pseudocaule e folhas) de bananeira com bom estado fitossanitário, os testes de seleção em condições controladas revelaram que um grupo de 17 foram produtoras de AIA e 12 foram capazes de inibir o crescimento micelial do fungo. Na fase de enraizamento *in vitro* nenhuma endófitas proporcionou resultados significativos. A fase de aclimação no enraizamento das mudas se revelou como melhor momento de aplicação das endófitas, uma vez que oito isolados produtores de ácido indolacético foram capazes de promover o crescimento e três antagonistas reduziram a severidade do mal-do-Panamá, em até 31,4%. Foram identificados cinco das onze endófitas de melhor desempenho como pertencentes ao gênero *Bacillus*, (BF-10, ARZ-33, BPC05, BPC-06 e BPC07). Sendo assim, o uso de endófitas pode constituir uma alternativa no processo de produção de mudas de bananeiras.

**Palavras-chave:** *Musa* spp., micropropagação, controle biológico



## ABSTRACT

### Ramos, E. M. Induction of rooting of plantlets micropropagated of banana plants by endophytic bacteria and biocontrol of evil-of-Panama

Several diseases affect banana worldwide. Vegetative propagation through the shoot promotes the spread of pathogens. Micropropagation *in vitro* is an alternative tool in the production of banana seedlings, plants for producing homogeneous and healthy. However, this technique eliminates micro-organisms that act in a beneficial way in the development of the plant. Endophytic bacteria can promote the growth for the synthesis of plant growth regulators as well as reduce the incidence of pathogens. This study aimed to: a) isolating and testing of banana endophytic bacteria are able to promote growth and inhibit the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *in vitro*; b) assess the potential for promoting the growth of the isolated phase of rooting and acclimatization of banana seedlings, cultivars 'Apple', 'Thap Maeo' and 'Grande Naine'; c) to verify the reduction of the severity of the ill-Panama banana plantlets cultivar 'Apple' microbiolized with endophytic antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Of a total of 200 endophytic bacteria isolated from internal tissues (root, pseudostem and leaves) with good banana plant health, screening tests under controlled conditions revealed that a group of 17 were producing IAA and 12 were able to inhibit the growth mycelium of the fungus. *In vitro* rooting phase any endophyte provided no significant results. The acclimatization phase in the rooting of seedlings was revealed as the best moment of application of endophytic, since eight isolates producing indoleacetic acid were able to promote growth and three antagonists reduced the severity of the ill-Panama, to 31.4%. We identified five of the eleven endophytic best performance as belonging to the genus *Bacillus* (BF-10, ARZ-33, BPC-05, BPC-06 and BPC-07). Therefore, the use of endophytic can be an alternative in the production of banana seedlings.

**Keywords:** *Musa* spp. micropropagation, biological control.

# INTRODUÇÃO

Originária do Sudoeste da Ásia a banana (*Musa spp.*) é a fruta tropical mais apreciada e a segunda mais colhida do planeta Terra. Disponível o ano todo, nutritiva e acessível à maioria da população, é o quarto produto alimentar mais consumido no mundo. Segundo dados da FAO, em 2010 foram produzidas cerca de 95,5 milhões de toneladas. No Brasil, no que se refere ao volume de produção, a banana perde apenas para a laranja e isso se deve à indústria de suco (IBGE, 2010).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelam que a bananicultura está entre a atividade agrícola de maior alcance social e elevada expressão econômica. Os principais Estados produtores são: Bahia, São Paulo e Santa Catarina, dentro as quais a Bahia se destaca como maior produtor da fruta. Em todo seu ciclo, a bananeira está sujeita a ocorrência de mais de 20 doenças, sejam essas de etiologia viral, bacteriana, nemátoda ou fúngica (CORDEIRO, 2000a; PEREIRA et al., 2000; ZAMBOLIM et al., 2002). Dentre as doenças fúngicas é relatada o mal-do-Panamá causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, que vem reduzindo consideravelmente a produtividade da fruta em diversas regiões, inclusive na cultivar 'Maçã' promovendo 100 % de perdas para cultura (CORDEIRO, 2000a). A infecção pelo patógeno ocorre sempre via raízes atingindo o xilema, onde ocorre abundante esporulação, neste caso, os conídios são transportados pelo fluxo da seiva JONES (2000). As mudas infectadas são o principal veículo de disseminação para novas áreas de plantio ou regiões (ALVES, 1999; CORDEIRO, 2000a).

A propagação vegetativa convencional, onde se retiram brotos laterais da planta adulta para propagação da cultura, pode apresentar baixas taxas de multiplicação, com altos riscos de disseminação de patógenos (SILVA et al., 2005). Assim, a técnica da micropropagação *in vitro*, tem sido utilizada para maximizar a produção e reduzir ou eliminar a ocorrência de fitopatógenos. A micropropagação *in vitro* realizada a partir de ápices caulinares promove a produção de mudas mais vigorosas, uniformes geneticamente e com qualidade fitossanitária. Porém, essa técnica elimina também a microbiota natural benéfica que é capaz de induzir o crescimento das mudas e protegê-las contra uma série de estresses bióticos e

abióticos (BORGES e SOUZA, 2004). Por este motivo trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de reintroduzir micro-organismos benéficos na fase de enraizamento e/ou aclimatação para aumentar a capacidade adaptativa dessas mudas em campo.

A introdução de bactérias endofíticas no processo de produção de mudas micropropagadas pode favorecer o crescimento pela síntese de reguladores de crescimento vegetal, atuando, por exemplo, na indução do enraizamento, na disponibilidade de fósforo e ferro para a planta e na proteção do vegetal contra fatores ambientais adversos, além do potencial no controle biológico, permitindo melhor sanidade à planta (BALDANI et al., 2000; ASSUMPÇÃO et al., 2009)

No primeiro capítulo desse trabalho serão abordados aspectos relevantes sobre a cultura da banana, o mal-do-Panamá, a micropropagação *in vitro* e o emprego de bactérias endofíticas como promotoras de crescimento de plantas e agentes de controle biológico. No segundo capítulo, apresentam-se os resultados de uma pesquisa sobre a aplicação de bactérias endofíticas na promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira e controle biológico do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

A hipótese em estudo fundamenta-se na idéia de que bactérias endofíticas de bananeira podem atuar como promotores do crescimento e agentes de controle de doenças. Diante deste contexto, 200 endófitas isoladas de plantas sadias de bananeira foram testadas quanto a indução do enraizamento de mudas micropropagadas e biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

---

## **CAPÍTULO 1**

**Potencial de bactérias endofíticas na micropropagação *in vitro* e como agentes de controle biológico**

---

## RESUMO

### **Ramos, E. M. Potencial de bactérias endofíticas na micropropagação *in vitro* e como agentes de controle biológico**

Neste capítulo realizou-se um levantamento a cerca da bananicultura e seus problemas fitossanitários, como o mal-do-Panamá, além da sua forma de micropropagação *in vitro*, como uma alternativa na produção de mudas isentas de patógenos. Devido à enorme importância da cultura da banana no Brasil, biofábricas estão produzindo mudas certificadas, isentas de micro-organismos patogênicos para garantir maior produtividade para os agricultores. Algumas desvantagens são inerentes à micropropagação *in vitro* como o alto custo de produção, pois necessita de estrutura física, reagentes caros e mão-de-obra especializada. Como consequência da assepsia realizada no processo de produção de mudas a microbiota benéfica é eliminada do tecido vegetal, impossibilitando que estes micro-organismos participem diretamente na promoção do crescimento e no possível controle de patógenos. Bactérias endofíticas têm sido relatadas como micro-organismos promissores na promoção de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. Visando a importância da utilização destas bactérias no processo de produção de mudas, possíveis mecanismos de ação dessas endófitas foram descritos. Além de serem descritos aspectos sobre a utilização destes micro-organismos no incremento da produtividade de mudas de bananeira foi abordado o controle do mal-do-Panamá causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, pois esta doença é um fator limitante à expansão da cultura da banana, principalmente, da cultivar 'Maçã'.

**Palavras-chave:** banana, fitossanidade, endófitas.

## ABSTRACT

### **Ramos, E. M. Potential of endophytic bacteria in *in vitro* micropropagation and as biological control agents**

In this chapter we carried out a survey about the banana plant its problems, such the ill-Panama, and its method of micropropagation *in vitro*, as an alternative in the production of seedlings free of pathogens. Given the enormous importance of the banana crop in Brazil, bio-factories producing seedlings are certified free of pathogenic micro-organisms to ensure higher productivity for farmers. Some disadvantages are inherent in the *in vitro* micropropagation as the high cost of production, because it requires physical infrastructure, expensive reagents and skilled labor. As a result of sterilization performed in the production of seedlings is beneficial microbes eliminated from plant tissue, making it impossible for these micro-organisms directly involved in promoting growth and possibility control of pathogens. Endophytic bacteria have been reported as promising micro-organisms in growth promotion and biocontrol of plant diseases. Aiming the importance of using these bacteria in the process of seedling production, possible mechanism of action of these endophytic were described. Besides being described aspects of the use of these micro-organisms in increasing the productivity of banana plantlets was approached control of the evil-Panama caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, because this disease is a limiting factor to the expansion of banana culture, especially the 'apple' cultivars.

**Keywords:** banana, plant health, endophytic

## 1.1 - A cultura da banana

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta que pertence à divisão Angiosperma sendo tipicamente tropical, hidrófita, herbácea, monocotiledônea, com porte que varia de 2,0 a 8,0 m de altura. Morfologicamente, a bananeira é um vegetal completo, cujas principais partes são: sistema radicular, caule (rizoma) constituindo o órgão de reserva da planta e possui várias gemas laterais onde se origina os rebentos, o pseudocaule, formado pela união das bainhas foliares e por folhas e cacho este é constituído pelo ráquis, engaço e coração (SIMÃO, 1971; MOREIRA, 1987; MANICA, 1997).

MOREIRA (1987) relata que a palavra banana é originária das línguas serra-leonesa e liberianas pertencentes à costa ocidental da África. No que tange à classificação botânica, a bananeira de frutos comestíveis, está na classe Liliopsida, subclasse Liliidae, superordem Lilinae, ordem Zingiberales (Scitamineae), família Musaceae, subfamília Musoideae, gênero *Musa*, seção *Eumusa* (SILVA et al., 2002) originada de cruzamentos interespecíficos entre *Musa acuminata* e *M. balbisiana*, e apresenta por isso, caracteres das duas espécies (SIMMONDS, 1973). O gênero *Musa* é o mais importante, uma vez que é formado pelo maior número de espécies e apresenta ampla distribuição geográfica (DANTAS e SOARES FILHO, 2000).

A banana é um alimento rico em vitaminas (A, B e C) e minerais, como Ca, K e Fe (VIEIRA, 2009). É muito apreciada tanto pelas características de sabor, aroma e facilidade de consumo *in natura* quanto pela sua versatilidade em termos de utilização (cozida, frita, doces, tortas e sorvetes), (DONATO, 2006) e inclusive na produção de macarrão e aguardente (IBRAF, 2007).

No mundo, o cultivo da bananeira está geograficamente situado entre latitudes de 30° S e 30° N do Equador (SOTO BALLESTERO, 1992) sendo as condições ótimas encontradas entre 15° de latitude ao Sul e ao Norte do Equador. Entretanto, no Brasil o cultivo da bananeira ocorre em todos os estados da Federação nos ecossistemas mais variados possíveis (COELHO, 2009), tendo como destaque as regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste, grande parte da região Sudeste e alguns microclimas da região Sul (ALVES, 1999).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), em 2008 a produção mundial de banana foi de aproximadamente 90,7 milhões de toneladas com

rendimento médio de 18,8 toneladas por hectare. A Índia liderou o *ranking* dos países produtores, seguida por Filipinas, China, Brasil e Equador. A produção da banana foi superada apenas pela produção de melancia, com 93,2 milhões de toneladas (FAO, 2008). É o quarto produto agrícola mais comercializado no planeta Terra, precedida pelo arroz, trigo e o milho, segundo o Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola (2009).

A Índia concentra a maior produtividade de banana no mundo com cerca de aproximadamente 37 t.ha<sup>-1</sup>, seguido do Equador, China, Filipinas, e ocupando a quinta posição no “ranking” vem o Brasil com 14 t.ha<sup>-1</sup> (FAO, 2010). A baixa produtividade pode ter relação com manejos mal conduzidos, deficiência nutricional e a incidência de pragas e doenças.

Em muitos estados brasileiros, depois da laranja, devido à produção de suco, a bananeira é a frutífera mais cultivada, com expressiva quantidade produzida e área plantada (VIEIRA, 2009). Segundo dados do IBGE (2009) no Brasil, a produção de bananas em 2009 atingiu cerca de 7.193.189 toneladas, plantada numa área de 511.636 ha. Entretanto, em novembro de 2010 numa área de aproximadamente 528.000 ha houve um acréscimo na produção para 7.389.318 toneladas, sendo as regiões Nordeste e Sudeste responsáveis por 69,78 % da produção nacional (IBGE, 2010).

A Bahia é o maior Estado produtor nacional da fruta (1.367.957 toneladas/ano), seguido pelos Estados de São Paulo (1.271.500 toneladas/ano), Santa Catarina (655.363 toneladas/ano), Minas Gerais (653.784 toneladas/ano) e Pará (527.432 toneladas/ano). Na região Nordeste a Bahia contribui com 45,85 % da produção de bananas seguida pelos Estados de Pernambuco com 18,18 %, Ceará 14,92 %, Paraíba 7,41 % e Rio Grande do Norte 5,38 % (IBGE, 2010).

Geralmente, no Brasil, os cultivos são tradicionais, com baixos índices de capitalização e tecnologia, porém nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso, existem alguns cultivos tecnificados, onde se pode observar a utilização de tecnologia geralmente adaptada de outros países em outros países (VIEIRA, 2004).

Além de ser um alimento complementar da dieta da população, a banana apresenta grande relevância social e econômica, servindo como fonte de renda para muitas famílias de pequenos agricultores. Esta atividade gera postos de trabalho tanto no campo quanto na cidade e contribui direta e indiretamente para



o desenvolvimento das regiões envolvidas em sua produção (FIORAVANÇO, 2003; ANDRADE, 2009).

Na Bahia a produção de banana está concentrada na agricultura de base familiar, que representa 60 % dos produtores rurais, na faixa dos 50 ha, possibilitando a garantia de emprego e renda e gerando aproximadamente, 14 mil empregos diretos e 20 mil indiretos (NOTÍCIAS DA BAHIA, 2008).

Segundo ANDRADE (2009), entre os maiores problemas do cultivo da banana no Brasil, está à falta de variedades comerciais, com porte adequado, o manejo inadequado do sistema solo-água-plantas, resistência às principais pragas e as doenças, como a sigatoka negra, o moko, a sigatoka amarela e o mal-do-Panamá, que promovem perdas consideráveis.

## **1.2- mal-do-Panamá**

A cultura da banana apresenta uma série de problemas fitossanitários que limitam sua produtividade. A ação de fungos patogênicos, principalmente, tem causado expressivas perdas.

O mal-do-Panamá ou murcha-de-fusário, doença causada pelo fungo habitante do solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder e Hansen (1953) foi descrito em 1874, pela primeira vez, na Austrália. Entretanto, tornou-se uma doença de importância após sua detecção no Panamá em 1904, e durante muitos anos foi a principal doença da bananicultura, sendo responsável pela destruição de grandes plantações comerciais em muitos países do mundo (FERNANDES et al., 2006).

No Brasil, esta doença foi registrada no ano de 1930, no Município de Piracicaba, Estado de São Paulo, dizimando o plantio de banana 'Maçã', dentre outras variedades. Atualmente, a doença é encontrada em praticamente todo o território nacional, atacando na maioria das vezes a variedade 'Maçã' e inclusive, bananas do subgrupo Cavendish (FERNANDES et al., 2006).

Devido à sua ampla distribuição, ocorre em praticamente todas as áreas produtoras, pelo grande potencial destrutivo e pela dificuldade de controle, a doença merece especial atenção (BORGES et al., 2007).

O mal-do-Panamá, quando ocorre em cultivares altamente suscetíveis como a banana 'Maçã', provoca perdas de 100 % na produção. Já na cultivar

'Prata', que apresenta menor suscetibilidade, a incidência do mal-do-Panamá, geralmente, situa-se, em torno de 20 % (CORDEIRO, 2000a).

Pertencente à classe dos Deuteromicetos, cuja forma perfeita ainda não é conhecida, as espécies do gênero *Fusarium* são heterogêneas, cosmopolitas, encontrados em regiões subtropicais e tropicais com ampla distribuição geográfica, apresenta espécies não-patogênicas e patogênicas, entre elas o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causador do mal-do-Panamá (FOURIE et al., 2009). *Fusarium* spp. é caracterizado pelo crescimento rápido em meio de cultura apresentando colônias com coloração que varia da cor violeta à púrpura com micélio aéreo e difuso (DOMSCH, 1980).

As espécies de *Fusarium* apresentam variações quanto à patogenicidade em diferentes hospedeiros havendo assim classificação dessas espécies em *formae speciales* (f. sp.) (OLIVEIRA e COSTA, 2002). Dentro de *formae speciales* pode ainda haver a subdivisão em raças fisiológicas que seria a preferência de por uma determinada cultivar, pois as raças ocorrem tanto em variedades plantadas comercialmente (cultivar) quanto nas variedades selvagens (GROENEWALD, 2005).

São conhecidas quatro raças fisiológicas sendo que 1, 2 e 4 são importantes à bananeira. A raça 3 ocorre em *Heliconia* sp. No Brasil, de acordo com a estrutura dos grupos de compatibilidade vegetativa dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analisados, presume-se a prevalência da raça 1 (GOES e MORETTO, 2001). A forma mais simples de diferenciação das raças seria mediante o uso de cultivares indicadoras, onde a variedade 'Gros Michel' é indicadora da raça 1, a 'Bluggoe', indicadora da raça 2 e as cultivares do subgrupo Cavendish são indicadoras da raça 4 sendo esta a mais virulenta (LEONG et al., 2009).

*Fusarium oxysporum* possui dois tipos de esporos assexuais: microconídios e macroconídios (GROENEWALD, 2005). Segundo AGRIOS (2005), em condições ambientais favoráveis as estruturas reprodutivas produzidas são os microconídios, que são geralmente unicelulares, ovais a reniformes e hialinos. Os macroconídios normalmente são fusiformes, falcados, isolados e multicelulares. Os clamidósporos são estruturas de resistência do *Fusarium oxysporum*, apresentam forma esférica produzidos por micélios ou macroconídios, e por esta razão este fungo possui uma enorme capacidade de sobrevivência na

ausência do hospedeiro, permanecendo no solo por longos períodos de tempo (FERNANDES, 2006).

O mal-do-Panamá ocorre com mais freqüente em áreas com pH baixo e os teores de magnésio e calcário podem influenciar diretamente no mecanismo de resistência do hospedeiro. Pouco se sabem a respeito da interferência de parâmetros climáticos, como luz, temperatura e umidade, no desenvolvimento e estabelecimento da doença, porém, é sabido que o solo influi fortemente na incidência da doença, comparável à do próprio hospedeiro (CORDEIRO, 2000a).

A infecção do patógeno ocorre sempre via raízes, principalmente as secundárias e posteriormente atinge o xilema, onde ocorre abundante esporulação, sendo os conídios transportados pelo fluxo ascendente da seiva.

As plantas infectadas pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* apresentam uma série de sintomas externos e internos. Externamente os sintomas se caracterizam pelo amarelecimento progressivo das folhas mais velhas evoluindo para as folhas mais novas, este fenômeno se inicia pelos bordos do limbo foliar em direção a nervura central. Posteriormente, as folhas murcham, secam e quebram junto ao pseudocaule ficando pendente, dando à planta uma aparência de “guarda-chuva fechado” (BORGES e SOUZA, 2004; FERNANDES, 2006). É comum que as folhas centrais da bananeira permaneçam eretas mesmo após a morte das mais velhas. Nota-se próximo ao solo rachaduras do feixe de bainhas, cuja extensão varia com a área afetada no rizoma. Segundo COELHO (2009), os cachos das bananeiras atacadas, independentemente de sua idade, tem seu desenvolvimento paralisado e as bananas entram em fase de desidratação e apodrecimento. Internamente é possível observar necrose pardo-avermelhada do sistema vascular das raízes, rizoma, pseudocaule e nervura principal das folhas, provocada pela presença do patógeno nos vasos (ALVES, 1999; CORDEIRO, 2000a).

Os rizomas e pseudocaulares de plantas mortas e/ou doentes são importantes fontes de inóculo, sendo responsáveis pela infestação do solo (CORDEIRO, 1999). O fungo também é disseminado por água de irrigação, de drenagem e de inundação, bem como, pelo homem, por animais, pela movimentação de solo por implementos agrícolas, e por ferramentas (BORGES e SOUZA, 2004). Mudas infectadas são o principal veículo de disseminação para novas áreas de plantio ou regiões (ALVES, 1999; CORDEIRO, 2000a). SILVA et

al. (2005) relatam que o uso de mudas convencionais no plantio e a baixa tecnologia utilizada proporciona a disseminação da doença. A disseminação de esporos pelo vento, não é uma forma eficiente de promover o estabelecimento do fungo em outras áreas, uma vez que os esporos toleram pouco mais de 4 horas de exposição ao ar (ALVES, 1999).

A busca por cultivares resistentes é hoje prioridade para controle do mal-do-Panamá. De acordo com KUPPER (2005) é possível a utilização de novos esquemas de melhoramento genético da bananeira, visando a obtenção de híbridos, não só resistentes à doença, mas também com características agronômicas desejáveis. Porém medidas preventivas devem ser adotadas, como evitar áreas com histórico da doença, utilizar mudas saudáveis, corrigir o pH do solo, dar preferência a solos com alto teor de matéria orgânica, manter as populações de nematóides sob controle, pois estes facilitam a penetração do fungo, manter sempre as plantas bem nutridas (BORGES e SOUZA, 2004). Ainda de acordo com os mesmos autores, nos pomares em que a doença se manifestar recomenda-se a erradicação das plantas, evitando a propagação da doença na área de cultivo. Entretanto, deve-se pensar em métodos alternativos para o controle do *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, como o controle biológico.

### **1.3 - A micropropagação e sua importância em produção de mudas**

A propagação vegetativa convencional é um problema no cultivo da bananeira por apresentar baixas taxas de multiplicação e riscos de disseminação de patógenos. Assim, a técnica da micropropagação tem sido empregada na produção de mudas saudáveis e em maior número que os métodos convencionais (LIMA et al., 2003).

Segundo CORDEIRO (2000b), as mudas produzidas pela micropropagação são as que oferecem maiores garantias fitossanitárias, devido às condições assépticas de produção. São mudas saudáveis, isentas de pragas e doenças, sendo produzidas com maior rapidez.

Considerada essencial para o cultivo de clones livres de agentes infecciosos, a micropropagação é uma técnica que elimina também raças fracas de vírus, conferindo proteção às plantas no campo (SEMAL, 1986; SOUZA et al.,

1993) sendo utilizada com mais freqüência em cultivos comerciais de banana, devido ao fato do material ser sadio e de fácil manipulação (ZAIDAN et al., 1999).

Segundo CASTRO et al. (2009), a produção em larga escala de mudas de bananeira tem sido realizada em laboratório mediante a técnica da micropropagação a partir de ápices caulinares e/ou gemas laterais, nos quais é induzida a formação de novas brotações, em condições controladas de cultivo.

A obtenção de mudas via micropropagação é muito superior se comparada aos diferentes métodos de propagação vegetativa. Enquanto no processo convencional são necessários 12 meses para obtenção de 10 a 30 mudas, dependendo do genótipo utilizado, cerca de dez vezes mais mudas são obtidas em quase metade do tempo pela micropropagação (Tabela 1).

**Tabela 1:** Número de mudas e período necessário para produção a partir de diferentes métodos de propagação da bananeira.

Método	Número de mudas <sup>1</sup>	Período (meses)
Processo convencional	10 a 30 mudas / planta	12
Fracionamento do rizoma	4 a 12 mudas / rizoma	6-8
Micropropagação ( <i>in vitro</i> )	150 a 300 mudas / explante	6-8

<sup>1</sup>Variável de acordo com o genótipo utilizado (CASTRO et al., 2009).

SACARPARE FILHO et al. (1998) realizaram um estudo comparativo entre mudas de bananeira tradicionais com mudas provenientes de cultura de meristema e verificaram que as mudas micropropagadas são mais produtivas.

Segundo GOMES (1983), as mudas constituem um dos itens mais importantes na implantação de um pomar. O sucesso do empreendimento da bananicultura depende, em grande parte, da qualidade das mudas, uma vez, que estas podem influenciar de forma direta no desenvolvimento e produção do bananal, principalmente no primeiro ciclo, as mudas tem papel fundamental na qualidade fitossanitária, pois várias doenças podem ser levadas pela muda e, neste caso, comprometer o sucesso do novo plantio (CORDEIRO, 2000b).

Para GODINHO (1994), na implantação e na reforma de bananais são utilizadas mudas adquiridas de pomares velhos ou em decadência. Entretanto, para SANTOS et al. (2004), essa prática é tecnicamente ultrapassada e desaconselhável, por contribuir para disseminação de plantas daninhas de difícil erradicação, além de pragas e doenças. LEONEL et al. (2004) mostraram que as mudas de bananeiras obtidas por meio da micropropagação crescem mais

vigorosas, mais altas, com maiores períodos de produção e mais uniformemente, além de se estabelecerem mais rapidamente e proporcionarem maior produtividade com relação às propagadas convencionalmente.

As plantas oriundas da micropropagação são mais precoces na emissão de filhos e produzem mais filhos por ano (SCARPARE FILHO et al., 1998; PEREIRA et al., 2001; CASTRO et al., 2009). Chegam a ser 30 % mais produtivas que a muda convencional, desde que as práticas culturais e os tratos fitossanitários sejam realizados adequadamente (LIMA et al., 2003).

As principais vantagens da micropropagação são a produção de mudas em grande escala, em qualquer época do ano, economia de tempo e espaço, homogeneidade no desenvolvimento das mudas, o que permite a uniformização do plantio e a sincronização da colheita, o estabelecimento de um bananal mais uniforme, facilitando o planejamento das práticas culturais, e o manejo das bananeiras, material livre de pragas e doenças (BORGES e SOUZA, 2004).

Segundo CASTRO et al. (2009), basicamente todos os protocolos de micropropagação envolvem as seguintes etapas: seleção de plantas matrizes e dos explantes, limpeza e assepsia do material vegetal, estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação *in vitro*, enraizamento *in vitro*. Após a fase de enraizamento *in vitro* as plantas que apresentarem boa formação de raízes serão encaminhadas para aclimatação em casa de vegetação e após 90 dias disponibilizadas ao agricultor (LINS et al., 2003).

As plantas de banana que saem da etapa *in vitro* estão livres de fitopatógenos, mas também de microbiota natural benéfica (BORGES e SOUZA, 2004). Por este motivo trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de re-introduzir micro-organismos ainda na fase de enraizamento e/ou aclimatação para melhorar a capacidade de adaptação dessas mudas em campo contra efeitos bióticos e abióticos.

Em trabalho pioneiro WEBER et al. (2000) selecionaram bactérias diazotróficas de mudas de bananeira cv. 'Prata Anã' e cv. 'Caipira' e avaliaram a influência dessas bactérias no crescimento de mudas micropropagadas, constatando que a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum* sp. proporcionou melhor crescimento na cv. 'Prata Anã', enquanto a cv. 'Caipira' cresce melhor quando tratadas com a bactéria *Burkholderia* sp. Entretanto a cv. 'Caipira' apresentou

maior crescimento quando tratadas simultaneamente com as duas espécies de bactérias, em comparação com a inoculação individual.

WEBER (2003) constatou que o tratamento de mudas micropropagadas com o isolado endofítico de *Burkholderia cepacia*, aumentou a produtividade das cultivares dos subgrupos 'Cavendish' e 'Gros Michel'.

LINS et al. (2003) visando avaliar o efeito do fungo *Gigaspora margarita* na redução do tempo de formação de mudas de bananeiras micropropagadas, concluíram que o fungo micorrízico arbuscular colonizou intensamente e mostrou-se benéfico para o desenvolvimento das mudas. Ainda, confirmou com seu trabalho que o início da fase de aclimação das mudas pode ser antecipado.

LEAL et al. (2005) realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar o efeito do fungo *Glomus clarum* no crescimento de mudas micropropagadas de bananeira, cultivar 'Prata-manteiga', concluindo que o fungo promoveu o crescimento e o acúmulo de nutrientes nas plantas.

Além de trabalhos constatando a eficiência de micro-organismos na promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira, BORGES et al. (2007) utilizaram o fungo, *Gigaspora margarita* para avaliar a densidade do mal-do-Panamá na variedade de banana 'Maçã' e constataram que a inoculação prévia do fungo micorrízico arbuscular (FMA) reduziu a infecção causada pelo patógeno.

#### **1.4 - Potencial biotecnológico das bactérias endofíticas**

Desde 1870 iniciaram-se os primeiros estudos sobre a colonização dos tecidos internos de plantas sadias por micro-organismos, com trabalhos realizados por alguns pesquisadores inclusive por Pasteur. Porém, foi em 1926, que Perotti descreveu a interação bactérias nativas e seus hospedeiros, denominando-as de micro-organismos endofíticos ou endófitas (HALLMANN et al., 1997). Relatos preliminares as consideravam como contaminantes resultantes da desinfestação superficial dos tecidos ou patógenos fracamente virulentos no interior das plantas. Entretanto, existem indícios de que as bactérias endofíticas influenciam o crescimento vegetal e reduzem a severidade de doenças (HALLMANN et al., 1997). O termo 'Endófito' tem origem grega, onde 'endon' significa 'de dentro' e 'phyte' significa 'planta' (CARROLL, 1988).

Bactérias endofíticas foram definidas por KADO (1992) como micro-organismos que vivem no interior dos tecidos de plantas se beneficiarem ou causar nenhum prejuízo. Porém, HALLMANN et al. (1997) consideram essa definição muito restrita, pois exclui a possibilidade de ação simbiótica entre o micro-organismo e a planta. AZEVEDO e ARAÚJO (2007) definiram como endófitos, os micro-organismos que podem ou não crescer em meio de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e nem produzir estruturas externas emergindo dos tecidos vegetais. Entende-se que bactérias endofíticas são micro-organismos que podem ser isolado de material vegetal superficialmente desinfestado e que não causam danos à planta podendo estar incluídos como micro-organismos endofíticos que colonizam tanto com comportamento neutro como simbiotes, e ainda aqueles que transitam entre colonizando ora endofiticamente ora como epífitas (AZEVEDO, 1999).

Trabalhos relatam desde 1940, a presença de bactérias endofíticas em árvores, gramíneas e, principalmente em culturas agrônômicas (MUSSON, 1994). Vários estudos revelam o isolamento de bactérias endofíticas em diferentes órgãos das plantas em diferentes estádios de crescimento de raízes de cenoura, beterraba, nabo e alfafa; de caule de feijão e de sorgo; de frutos de tomate; de tubérculos de batata e batata-doce; de raízes e de caules de arroz, milho, café e algodão; de tecidos de videira e frutos de melão (HALLMANN et al., 1997; STURTZ et al., 2000). Nestes estudos foram registradas diversas espécies de bactérias endofíticas com predominância as espécies do gênero *Bacillus*, *Erwinea*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium* e *Pseudomonas* (HALLMANN et al., 1997b; STURTZ et al., 2000).

Embora, tenham sido descritos há dois séculos, os micro-organismos endofíticos somente receberam considerável atenção a partir dos anos de 1980, quando foi reconhecida sua capacidade de proteger as plantas contra patógenos e insetos (JACOBS et al., 1985; HALLMANN et al., 1997b; AZEVEDO et al., 2000).

Por colonizarem o interior dos tecidos, os endófitas, possuem diversas vantagens, no que refere à sua sobrevivência, em relação às bactérias residentes do filoplano, pois ficam menos expostas às condições do meio ambiente, radiação ultravioleta, flutuações de temperatura e umidade. Esta vantagem existe também



em relação às bactérias da rizosfera, pois estas estão constantemente expostas à ação dos antagonistas da microbiota do solo (McINROY e KLOEPPER, 1995a; HALLMANN et al., 1997a).

A origem, forma de penetração, transmissão e colonização de tecidos vegetais por bactérias endofíticas ainda gera muitas discussões. Estas bactérias podem ser oriundas do filoplano, de sementes, da rizosfera ou de material propagado vegetativamente (McINROY e KLOPPER, 1995a; HALLMANN et al., 1997b).

Constantemente as plantas interagem com diversos micro-organismos, podendo apresentar uma relação negativa, benéfica ou neutra. A relação endófito-planta ainda não é muito bem compreendida, mas sabe-se que existem relações aparentemente neutras e outras benéficas (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002).

Em relações benéficas, bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas diretamente pela disponibilização de nutrientes e produção de análogos de reguladores de crescimento. Indiretamente, inibem o crescimento de fitopatógenos ou estimulam as defesas da planta (BERG, et al., 2005; AZEVEDO, 1998).

Tais características fazem com que estes micro-organismos sejam estudados para possíveis aplicações a campo, no controle de doenças e crescimento de plantas, resultando em incremento na produção agrícola.

#### **1.4.1- Bactérias endofíticas como promotoras de crescimento de plantas**

Alguns estudos têm demonstrado a eficiência de endófitas na promoção do crescimento de diversas culturas de interesse, entre elas batata (FROMMEL et al., 1991; STURTZ, 1995, ANDREOTE, 2009), milho (HINTON e BACON, 1995), pepino (RAUPACH e KLOEPPER, 1998), arroz (HUREK et al., 1994, SUN et al., 2008), melancia (LIU et al., 1995), cebola (SESSITSCH et al., 2005), cana-de-açúcar (REIS et al., 2004, MENDES et al., 2007, LUVIZOTTO, 2008), soja (KUKLINSKY-SOBRALE et al., 2004, LI et al., 2008), café (SILVA et al., 2006) pimenta do reino (ARAVIND et al., 2009), banana (THOMAS et al., 2008).

BALDANI et al. (2000) confirmaram o potencial de uso de bactérias diazotróficas no crescimento de mudas de cana-de-açúcar micropropagadas. O

inóculo proveniente de misturas de endófitas também tem demonstrado efeitos benéficos no crescimento de plantas (OLIVEIRA et al., 2000).

Em trabalhos desenvolvidos por STURTZ (1995), cerca de 10% das bactérias isoladas de tubérculos de batata estimularam o crescimento das plantas. Os efeitos envolvidos na promoção de crescimento incluem o aumento da produção de biomassa da raiz, e do caule, da lignificação de vasos do xilema e produção de tubérculos (FROMMEL et al., 1991; STURTZ, 1995; STURTZ et al., 1997). HUREK et al. (1994) demonstraram que a associação da bactéria *Azoarcus* sp. com arroz resultou em um aumento de crescimento de plantas.

KUKLINSKY-SOBRAL (2003) avaliando a promoção de crescimento por bactérias endofíticas em soja, observou que após 17 dias de semeadura, período em que as plântulas estavam em fase de desenvolvimento, três bactérias endofíticas, *R. pickettii* e *P. oryzihabitans* promoveram aumento da produção de biomassa fresca e seca da raiz e que, o isolado *Pantoea* sp. foi capaz de aumentar o peso da raiz. A análise do peso fresco e seco da parte aérea das plântulas revelou que os isolados *Pantoea* sp. e *P. oryzihabitans* apresentaram efeito significativo sobre esta região.

BARRETTI et al. (2008) observaram após segunda seleção que dez isolados de bactérias endofíticas proporcionaram aumento significativo na altura das plantas em relação à testemunha. Num estudo anterior BARRETTI (2001) verificou aumento de tomateiros tratados com bactérias endofíticas em relação às plantas não tratadas. SILVA (2004) observou que a altura de plantas de tomateiro foi afetada pela introdução de algumas bactérias endofíticas, sendo que isolados de *Acinetobacter johnsonii* e *Bacillus pumilis* promoveram maior incremento na altura das plantas em 9,5,% e 20,2,%, respectivamente, o que representa um papel importante dessas bactérias na promoção do crescimento vegetal.

Segundo CAVALLET et al. (2000), o efeito da bactéria *Azospirillum* sp. tem sido pesquisado quanto ao rendimento no milho. Inoculações a campo revelaram que o gênero *Azospirillum* sp., além da fixação biológica do nitrogênio, promove aumento no rendimento e da superfície de absorção das raízes da planta. Isso ocorre porque a inoculação modifica a morfologia do sistema radicular, alterando o número de radículas e o diâmetro médio das raízes laterais e adventícias.

Existem várias maneiras pelas quais bactérias promotoras de crescimento de plantas podem favorecer o crescimento vegetal, dentre elas fixação de

nitrogênio atmosférico, solubilização de minerais, produção de sideróforos (moléculas que solubilizam e seqüestram o ferro), ou produção de reguladores de crescimento vegetal, que acentuam o crescimento em vários estádios de desenvolvimento. Como agentes de biocontrole, estes micro-organismos diminuem ou inibem os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos colonizando nichos ecológicos similares ao de patógenos, competindo por espaço e nutrientes, produzindo compostos antimicrobianos ou metabólitos, além de serem capazes de estimular as defesas da planta.

Os reguladores de crescimento vegetal são compostos que em baixa concentração atuam diretamente sobre os processos fisiológicos (KUKLINSKY-SOBRAL, 2003). Dentre os vários tipos de reguladores, destacam-se as auxinas (do grego auxein = aumentar) sendo a auxina natural chamada de ácido indolacético (AIA), tendo o triptofano como seu precursor. Apesar de serem conhecidas quatro vias diferentes para a biossíntese do AIA, todas se originam a partir do triptofano RAVEN et al. (1996). Nas plantas essas substâncias são produzidas principalmente no meristema apical (gema) do caule e transportadas por meio das células do parênquima até as raízes. As auxinas promovem o crescimento de raízes e caules, de maneira rápida (aumentando a elongação celular) ou de maneira lenta (por meio da divisão e diferenciação celular) (DOBBELAERE et al., 2003).

Estima-se que 80 % da comunidade bacteriana seja capaz de sintetizar o AIA. Aparentemente sem função na célula microbiana, a produção de AIA pode ser resultado da evolução da interação bactéria-planta (PATTEN e GLICK, 2002) e pode ser influenciada por fatores como genótipo, tanto do hospedeiro quanto do micro-organismo (JAIN e PATRIQUIN, 1985).

Associadas às plantas, têm sido descritas bactérias produtoras de AIA relacionadas ao estímulo de crescimento vegetal, como as espécies pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, entre outras (PATTEN e GLICK, 1996, VERMA et al., 2001).

A resposta da planta ao AIA, liberado por bactérias, pode variar de efeitos benéficos a deletérios dependendo da concentração produzida. Quando em baixas concentrações, pode estimular, enquanto que em altas concentrações,

inibir o crescimento radicular do vegetal. Os níveis de AIA produzidos pelas bactérias dependem do seu crescimento, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de AIA (LAMBRECHT et al., 2000).

Segundo PATTEN e GLICK (2002), as bactérias benéficas sintetizam AIA via ácido indol-3-pirúvico (IPyA) em contraste com patógenos que produzem este composto via ácido indol-3-acetamida (IMA) e estas vias biossintéticas são classificadas segundo seus compostos intermediários, como IAM ou IPyA, sendo ambas dependentes de triptifano.

No estudo de LI et al. (2008) 98 isolados bacterianos endofíticos não simbióticos isolados de nódulos de soja produziram AIA, revelando-se potenciais promotores de crescimento vegetal.

Dentre 58 isolados bacterianos diazotróficos endofíticos da raiz de arroz, KUSS et al. (2007) selecionaram *Azospirillum brasiliense* e UFSM-BD-31-06 como maiores produtores de ácido indolacético.

Trabalho realizado por BARBOSA et al. (2009) mostraram que 86,7 % das bactérias estudadas foram capazes de produzir AIA, podendo estas contribuir para o crescimento e sanidade vegetal.

BALDOTTO et al. (2010) em busca de reduzir o tempo de aclimação trataram mudas de abacaxi propagadas *in vitro* com bactérias endofíticas produtoras de AIA, e observou que estes micro-organismos foram capazes de promover o crescimento das mudas além de favorecer a adaptação em campo.

O fósforo é um dos nutrientes mais importantes e pode ser limitante para o crescimento vegetal, apesar de ser comumente encontrado nos solos, e apresentar-se em diferentes formas orgânicas (derivadas de micro-organismos e plantas) e inorgânicas (originadas de rochas e fertilizantes fosfatados). Apesar dos solos serem ricos em fósforo, a maior parte deste elemento encontra-se em formas insolúveis, portanto, indisponível às plantas. Contudo, existem micro-organismos capazes de solubilizar o fosfato, tornando-o disponível para as plantas. Dentre esses micro-organismos estão as bactérias solubilizadoras de fosfatos, que participam do ciclo do fósforo por meio de secreção de ácidos orgânicos e enzimas como fosfatases que libera íons ortofosfato solúveis tornando-o disponível para a planta (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999).

A alta proporção de micro-organismos solubilizadores de fosfato está concentrada na rizosfera, por ser uma região metabolicamente muito ativa e que, possui diversas fontes de fosfato, dependendo de cada tipo de solo (VAZQUEZ et al., 2000). Entre os gêneros bacterianos endofíticos com esta capacidade estão *Burkholderia* spp., *Erwinia* spp., *Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., *Azotobacter* spp. e *Pseudomonas* spp., sendo *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Bacillus* os mais poderosos solubilizadores (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999).

A adubação fosfatada torna-se bastante dispendiosa, além de poder acarretar problemas ao meio ambiente. Como alternativa, devem-se realizar esforços para melhorar a absorção e disponibilidade pelas plantas, o que pode ser feito pelo controle do pH e pelo uso de micro-organismos que possibilitem melhor aproveitamento do fósforo. Portanto, a habilidade de bactérias endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico tem sido alvo de interesse por parte de microbiologistas agrícolas (INUI, 2009; KUKLINSKY-SOBRAL, et al., 2004). Estudos realizado por VERMA et al. (2001) mostraram bactérias endofíticas *Pantoea agglomerans* isoladas de raízes de arroz com a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico.

O ferro é um elemento de suma importância para o crescimento de todos organismos vivos (COMPANT et al., 2005b). Apesar de abundante é pouco disponível e assimilável para os micro-organismos. Tem importância biológica por ser constituinte do citocromo, proteínas e enzimas (ROMEIRO, 2007a).

Os sideróforos são definidos como moléculas de baixo peso molecular com potencial quelante de íons férricos, sintetizadas principalmente por micro-organismos em ambientes com baixas concentrações de ferro. Nesses ambientes, o papel desses compostos é recolher íons de ferro, tornando-os disponíveis para a célula microbiana (BENITE et al., 2002).

As bactérias que produzem sideróforos podem ter um efeito positivo na absorção de ferro pelas plantas, pois algumas espécies de plantas são capazes de utilizar o complexo Fe-sideróforo no solo. Embora a produção de sideróforos possa ajudar na absorção de ferro pela planta, na maioria dos casos esse efeito é muito pequeno, porém esse efeito depende muito do tipo do solo e disponibilidade do nutriente (GLICK, 1995). Na falta de ferro no solo esse efeito torna-se grande.

Por meio da produção de sideróforos as bactérias podem inibir o crescimento de micro-organismos fitopatogênicos, ou em muitos casos, a

produção de sideróforos pode induzir a resistência sistêmica na planta (COMPANT et al., 2005a; COMPANT et al., 2005b).

AMBROSINI et al. (2007) estudando a promoção de crescimento em (CULTURA) por bactérias endofíticas, observaram que 87 % dos isolados com potencialidade para a promoção de crescimento em plantas eram produtores de sideróforos.

GANGWAR e KAUR (2009) isolaram e caracterizaram bactérias endofíticas da cultura de cana e azevém para verificar potenciais promotores de crescimento. Os testes *in vitro* revelaram que dos oito isolados de cana seis produziram sideróforos e da cultura de azevém dentre os sete isolados selecionados, seis foram capazes de produzir sideróforos.

#### **1.4.2 – Bactérias endofíticas no controle biológico de fitopatógenos**

Diversos estudos têm demonstrado que micro-organismos endofíticos possuem atividade supressiva a nematóides, fungos, bactérias e insetos-praga, impactando positivamente na sanidade das plantas (BAKCMAN e SIKORA, 2008; RYAN et al., 2008).

Micro-organismos endofíticos podem produzir substâncias bioativas envolvidas nas relações com seus hospedeiros denominadas de metabólitos secundários aplicados na agricultura, indústria e medicina. Pesquisas direcionadas para o isolamento, extração e identificação dos compostos vêm aumentando na última década (STROBEL, 2002).

A utilização de bactérias endofíticas como agentes de controle biológico deve-se à capacidade de colonizarem ambientes similares aos de patógenos de plantas (HALLMANN, et al., 1997b). Bactérias endofíticas podem atuar como antagonistas aos fitopatógenos por meio de antibiose, competição por nutrientes, indução de resistência sistêmica, produção de enzimas hidrolíticas e exclusão de nicho (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Espécies de bactérias endofíticas foram relatadas como importantes fontes de agentes de biocontrole (KAVINO et al., 2007). *Pectobacterium carotovorum* é inibida *in vitro* por cepas de *Pseudomonas* sp., *Curtobacterium luteum* e *Pantoea agglomerans* isoladas de tubérculo de batata (STURTZ et al., 1999).

No patossistema algodão vs *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* o uso de bactérias endofíticas e seus metabólitos tem apresentado potencialidades no controle do patógeno (CHEN et al., 1995).

Foi constatado o controle por hiperparasitismo onde uma linhagem de *Burkholderia cepacia*, isolada de aspargos, colonizou os espaços intercelulares de raízes de banana, promovendo o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (PAN et al., 1997). Estes autores observaram que, *in vitro*, esta bactéria colonizava a superfície da hifa do patógeno, causando protuberâncias, que resultaram em deformação do micélio e conseqüentemente redução do potencial patogênico do fungo.

QIU et al. (1990) isolaram bactérias endofíticas de algodão, identificando-as posteriormente como *Pseudomonas* spp. que em testes *in vitro*, apresentaram forte antagonismo à *Colletotrichum gossypii* e *Rhizoctonia solani*. Quando o solo esterilizado foi infestado com *C. gossypii*, estas duas endófitas reduziram a mortalidade das sementes em até 31,1 %. Em solo não esterilizado a redução de mortalidade foi de até 59,5 %.

LIMA et al. (1994) estudando o controle do mal seco em citros, causado pelo fungo *Phoma tracheiphila*, testaram isolados de bactérias endofíticas *in vitro*, e obtiveram nove isolados antagônicos ao patógeno. Estes isolados foram inoculados no caule de plântulas de laranjeira 15 dias antes da inoculação do patógeno. Foi observado que houve um menor índice de doença nas plantas inoculadas com endofíticos, se comparadas ao controle. Observaram também que houve um aumento na população de bactérias endofíticas inoculados.

A comunidade bacteriana endofítica de batata foi amplamente estudada, sendo verificada a alta ocorrência de isolados que apresentam antibiose ao fungo patogênico *Rhizoctonia solani* (STURTZ et al., 1998).

SHIOMI (2004) observou que isolados de *Bacillus lentimorbus* e *Bacillus cereus* inibiram a esporulação e/ou o desenvolvimento do tubo germinativo de *Hemileia vastatrix* na cv. Mundo Novo.

LIN et al. (2009) demonstraram a eficiência de bactérias endofíticas *Bacillus subtilis* no controle da murcha de *Verticillium* na cultura da berinjela em casa de vegetação.

Bactérias endofíticas podem interferir indiretamente no crescimento de fitopatógenos via indução de resistência sistêmica (IRS). Contudo, existem

poucos estudos relacionando indução de resistência sistêmica e endófitas. VAN PEER et al. (1990) foi um dos pioneiros em demonstrar ISR utilizando bactérias endofíticas. Em um dos estudos o sistema radicular de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) foi tratado com a endófito WCS417r e após uma semana o caule das plantas foi inoculado *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. As plantas tratadas com os antagonistas apresentaram menor intensidade de sintomas do que as plantas-controle. Como ocorreu a separação espacial entre o local onde o agente indutor foi aplicado e o sítio de inoculação do patógeno, os autores concluíram que se tratava de um caso de resistência sistêmica induzida.

Trabalhos com plantas de *Arabidopsis thaliana* demonstram que a colonização destas plantas com bactérias endofíticas (WANG et al., 2005) levam à alteração da expressão de um pequeno número de genes na planta hospedeira relacionado ao estado de indução. No entanto, no caso de plantas tratadas com bactérias que induzam ISR, estas apresentam uma resposta mais rápida à inoculação posterior de patógenos, quando comparada às plantas controle (VERHAGEN et al., 2004).

SILVA et al. (2006) avaliaram bactérias endofíticas quanto a capacidade de reduzir a severidade da ferrugem do cafeeiro utilizando testes em discos de folha. Constataram que o isolado 3F (*Brevibacillus choshinensis*) como potencial indutor de resistência reduzindo a severidade da doença em mais de 85 % quando inoculado 72 horas antes da inoculação do patógeno *Hemileia vastatrix*.

JIE et al. (2009) observaram que bactérias endofíticas isoladas de plantas de bananeira sadias, reduziram em 67 % sintomas do mal-do-Panamá e promoveram crescimento de mudas de bananeira micropropagadas.

Um isolado bacteriano de *Pseudomonas* sp. e outro de *Burkholderia* sp. ambos isolados endofíticos de banana, foram indutores da síntese de 4 proteínas PR a saber: peroxidase, fenil-alanina amônialiase, ácido lignotioglicílico, quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase e as plantas tratadas com os isolados expressaram níveis de resistência à *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FISHAL et al., 2010).



---

## **CAPÍTULO 2**

**Indução do enraizamento de mudas micropropagadas de bananeiras por bactérias endofíticas e biocontrole do mal-do-Panamá**

---

## RESUMO

### Ramos, E. M. Indução do enraizamento de mudas micropropagadas de bananeiras por bactérias endofíticas e biocontrole do mal-do-Panamá

Além da importância mundial, no Brasil a bananicultura tem papel preponderante na geração de divisas, além de assumir papel relevante socialmente. Entretanto a propagação de forma convencional vem trazendo sérios prejuízos aos produtores, pois a transmissão de fitopatógenos ocorre de modo considerável e a micropropagação *in vitro* tem sido recomendada para produção de mudas sadias. Considerando a ausência da microbiota benéfica que pode atuar na proteção de mudas micropropagadas contra o ataque de patógenos, o presente estudo teve como objetivos avaliar a utilização de bactérias endofíticas como agentes promotores de crescimento e potenciais antagonistas ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Foram isoladas 200 bactérias endofíticas de bananeira das cultivares Prata anã e Prata comum, das quais foram selecionadas dezessete produtoras de ácido indolacético com potencial para indução de enraizamento e doze com potencial para controle do mal-do-Panamá. O estudo com os isolados foi realizado na fase de enraizamento e aclimatação, onde foi possível perceber que a fase de aclimatação é o melhor momento para o tratamento das mudas com as bactérias endofíticas, as combinações dos isolados APC-33, ARZ-48, BF-03, BRZ-09 e BF-06, BF-10, AR-Z33, ARZ-53 foram as mais promissoras como promotores de crescimento para cultivares 'Grande Naine' e 'Thap Maeo'. A combinação dos isolados BPC-05, BPC-06 e BPC-07 selecionados como agentes de biocontrole proporcionaram a redução na severidade do mal-do-Panamá em até 31,4%. Dentre estes foi possível identificar como *Bacillus* as endófitas BPC-05, BPC-06, BPC-07, BF-10 e ARZ-33. Portanto o presente estudo revelou que bactérias endofíticas têm potencial para atuarem na promoção de crescimento e no controle de doenças de plantas.

**Palavras-chave:** promoção de crescimento, fitopatógenos, bananicultura.

## ABSTRACT

### **Ramos, E. M. Induction of rooting of plantlets micropropagated of banana plants by endophytic bacteria and biocontrol of evil-of-Panama**

Besides the importance of global banana crop in Brazil to play a major role in generating foreign exchange, and will assume an important role in society. However the spread of conventional form has brought serious losses to producers, since the transmission of pathogen occurs considerably and *in vitro* micropropagation has been recommended for the production of healthy seedlings. Considering the lack of beneficial microbes that can act in the protection of micropropagated plantlets against attack by pathogens, this study aimed to evaluate the use of endophytic bacteria growth promoting agents and as potential antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. 200 endophytic bacteria were isolated from banana cultivars Dwarf Silver and Silver common, of which were selected seventeen producing indoleacetic acid with the potential to induce rooting and twelve with the potential to control the evil of Panama. The study was conducted with the isolates during rooting and acclimatization, where it was revealed that the phase of acclimatization is the best time to treatment the plantlets with endophytic bacteria, isolated combinations of APC-33-, ARZ-48, BF-03, BRZ-09 and BF-06 BF-10, ARZ-33, ARZ-53 were the most promising as growth promoters for cultivars 'Grand Naine' and 'Thap Maeo'. The combination of isolated BPC-05, BPC-06, BPC-07 and selected as biocontrol agents provided the reduction in the severity of the ill-Panama up to 31.4%. Among these was identified as the endophytic *Bacillus* BPC-05, BPC-06, BPC-07, BF-10 and ARZ-33. Therefore, this study found that endophytic bacteria have the potential to act in promoting growth and controlling plant diseases.

**Keywords:** growth promotion, plant pathogens, banana plant.

## INTRODUÇÃO

Segunda fruta mais cultivada no Brasil, a banana assume grande importância na alimentação e na socioeconomia do país. De acordo com dados da FAO em 2010 o Brasil ocupou a quinta posição no “ranking” mundial em produção, com uma área plantada de 528 mil hectares. Entretanto, apesar da grande área plantada, é evidente a baixa produtividade da bananicultura nacional, 14 t.ha<sup>-1</sup>, quando comparada a outros países como a Índia, que produz 37 t.ha<sup>-1</sup>. Fatores ambientais adversos, práticas culturais inadequadas e principalmente problemas fitossanitários têm contribuído para este fato (VIEIRA, 2004).

O mal-do-Panamá ou murcha-de-fusário, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F.Smith) Snyder & Hansen gera perdas de até 100 % dependendo da suscetibilidade da cultivar, sendo responsável pela destruição de plantações comerciais em muitos países do mundo (FERNANDES et al., 2006). A infecção pelo patógeno ocorre sempre via raízes e posteriormente atinge o xilema, onde ocorre abundante esporulação, neste caso, os conídios são transportados pelo fluxo da seiva. O mal-do-Panamá é mais freqüente em áreas com baixo pH e o magnésio e o calcário podem ter influência direta no mecanismo de resistência de variedades (CORDEIRO, 2000a).

As plantas infectadas pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* apresentam amarelecimento progressivo das folhas mais velhas evoluindo para as folhas mais novas. Posteriormente as folhas murcham, secam e quebram junto ao pseudocaule ficando pendente, dando à planta uma aparência de guarda-chuva fechado (BOGES e SOUZA, 2004; FERNANDES, 2006). Nota-se notar próximo ao solo, rachaduras do feixe de bainhas, cuja extensão varia com a área afetada no rizoma. Internamente, observa-se descoloração pardo-avermelhada do sistema vascular das raízes, rizoma, pseudocaule e nervura principal das folhas, provocada pela presença do patógeno nos vasos (ALVES, 1999; CORDEIRO, 2000a).

A propagação vegetativa da bananeira por rebentos favorece a disseminação da doença. A técnica da micropropagação mudas uniformes e sadias do ponto de vista fitossanitário. Porém, durante o processamento dessa técnica é eliminada a microbiota endofítica benéfica (BORGES e SOUZA, 2004).

A re-introdução de bactérias endofíticas tem sido estudada como uma alternativa para otimizar o processo de produção das mudas, por meio da promoção do crescimento e o biocontrole de doenças.

Bactérias endofíticas têm sido associadas com a promoção do crescimento devido a produção de substâncias análogas a reguladores de crescimento vegetal, aumento da permeabilidade das raízes, solubilização e disponibilização de nutrientes podem estar envolvidos na promoção do crescimento das plantas, desta forma, contribuem para o estado nutricional da planta e, indiretamente, para melhor eficiência dos mecanismos de defesa (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos, os micro-organismos podem apresentar grande potencial para o controle biológico utilizando diversos mecanismos, como competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira, produção de compostos antimicrobianos e indução de resistência sistêmica (HALLMANN, et al., 1997b).

Em cultura de tecido, quando explantes vegetais são tratados com bactérias endofíticas que apresentam potencial para promoção de crescimento, as plântulas apresentam aumento na altura, na produção de matéria seca, no desenvolvimento do sistema radicular, no número de folhas e no teor de clorofila e lignina foliar.

O presente trabalho teve como objetivos: a) isolar bactérias endofíticas de bananeira, variedades Prata Anã e Prata Comum, do banco Ativo de Germoplasma de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura; b) selecionar *in vitro* isolados com potencial para promoção de crescimento e controle biológico; c) avaliar a resposta das mudas de bananeira microbiolizadas em diferentes fases de produção; d) verificar a severidade do mal-do-Panamá em mudas de bananeira microbiolizadas com endófitas antagônicas ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*); e) identificar em nível de gênero os isolados de melhor desempenho.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios foram conduzidos na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Embrapa Mandioca e Fruticultura e na Companhia de Produção Agrícola S. A. (CAMPO).

### **1. Isolamento e preservação de bactérias endofíticas**

Fragmentos de raízes, pseudocaule e folhas foram coletados de duas variedades de bananeira (Prata Anã e Prata Comum) cultivadas em campo, apresentando bom estado fitossanitário, e acondicionados em sacos de papel e transportados até o laboratório. As amostras foram lavadas em água corrente, separadas em porções de 1 g de material vegetal, e em seguida, desinfestadas superficialmente com álcool 70 % (1 minuto), hipoclorito de sódio 1 % (2 minutos) e lavadas em água destilada esterilizada por três vezes. Para eliminar bactérias epifíticas remanescentes, os fragmentos foram transferidos para tubos de ensaio contendo solução salina (0,85 %) e submetidas a banho de ultra-som por 10 minutos. A maceração foi feita em almofariz e pistilo esterilizados contendo 9 mL de solução salina e o triturado novamente submetido a banho de ultra-som por 10 minutos, desta vez para desagregação das partículas e células bacterianas. Realizou-se uma diluição em série do material macerado em solução salina com fator 1:10. Alíquotas de 100 µL das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar) em triplicata e espalhadas com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 28 °C durante 48 horas. Após esse período, as colônias bacterianas crescidas foram repicadas individualmente para placas contendo o mesmo meio. Para confirmar a natureza endofítica dos isolados, 100 µL da solução salina proveniente do primeiro banho de ultra-som foram transferidos para placas de Petri contendo o meio TSA e incubadas nas mesmas condições para as placas com as diluições do material macerado. Os isolados confirmados como endofíticos, com 24 horas de crescimento, em placas de Petri, foram transferidos para tubos criogênicos, preservados em glicerol a 20 % e armazenados a -80 °C (MARIANO, 2000).

## **2. Seleção *in vitro* de bactérias endofíticas com potencial para promoção de crescimento e biocontrole do mal-do-Panamá**

Os 200 isolados foram submetidos a ensaios qualitativos para detecção *in vitro* de capacidade de sintetizar ácido indolacético, solubilizar fosfatos, produzir sideróforos e inibir o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Três repetições em triplicata para cada teste foram realizados para cada isolado.

### **2.1. Caracterização fisiológica dos isolados de bactérias endofíticas**

#### **2.1.1. Produção de ácido indolacético (AIA)**

As bactérias endofíticas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura TSA diluído dez vezes enriquecido com 5mM de L-Triptofano ( $1,021\text{g L}^{-1}$ ). Em seguida, o meio foi coberto com membrana de nitrocelulose e as placas incubadas a 28 °C por 24 horas. Após este período, as membranas foram removidas do meio e saturadas com solução de Salkowski. Os isolados que formaram halo avermelhado na membrana, no período entre 30 minutos e 2 horas, foram considerados produtores de AIA. Para este teste foram realizadas três repetições para cada isolado (CATTELLAN, 1999).

#### **2.1.2. Solubilização de fosfato**

Segundo CATTELLAN (1999), o bioensaio foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura TSA diluído dez vezes acrescido com  $\text{CaHPO}_4$ . Este precipitado resultou de reação de 50 mL de solução  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,57 M) e de 100 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  a (0,90 M) adicionados a 850 mL de TSA. As soluções e o meio foram autoclavados separadamente. O pH do meio foi ajustado para 7,0. Oito isolados foram transferidos por placa e incubados a 28 °C, por sete dias. Três repetições foram realizadas para este ensaio. As colônias que apresentaram um halo claro ao seu redor, os micro-organismos foram consideradas solubilizadoras de fosfatos.

### **2.1.3. Produção de sideróforos**

As bactérias foram cultivadas em Erlenmeyers contendo 10 mL em meio líquido TS diluído dez vezes e em seguida foram incubadas a 28 °C por 24 horas sob agitação constante. Após este período, a suspensão de células foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos. Transferiu-se 1,0 mL do sobrenadante para o tubo de ensaio e adicionou-se 1,0 mL da solução indicadora de Cromo Azurol S (CAS). Os isolados que converteram a cor azul da solução de CAS para amarelo, dentro de 15 minutos foram consideradas produtoras de sideróforos (CATTELLAN, 1999).

### **2.1.4. Testes de antagonismo: Inibição do crescimento micelial do fungo pelos isolados endofíticos**

Os isolados foram testados *in vitro* quanto a capacidade de inibir o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Discos de micélio do patógeno de 1,0 cm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubados à temperatura ambiente. Após 48 horas, três diferentes bactérias endofíticas foram semeadas em posições equidistantes do centro da placa e incubadas a 28 °C por sete dias. Como controle utilizou-se placas com sem os isolados endofíticos. Foi considerado antagonismo quando verificada presença de um halo de inibição do crescimento micelial fúngico, procedendo-se três repetições de cada isolado para confirmação do antagonismo (OLIVEIRA, 2009).

## **3. Antibiose entre bactérias endofíticas produtoras de ácido indolacético e com capacidade de inibir o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

Foi realizado bioensaio para verificar se existia antibiose entre as bactérias selecionadas, objetivando a possibilidade do uso de combinações de isolados. O teste usado foi o da dupla camada, de acordo com metodologia de ROMEIRO (2007b). Os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio TSA, com auxílio de uma alça de platina em pontos equidistantes na superfície do



meio. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 h. Em seguida adicionou-se, com auxílio de pipeta esterilizada, 1,0 mL de clorofórmio na tampa de cada placa por 20 minutos com as mesmas invertidas. Após este período, as placas foram entreabertas em ambiente asséptico durante 30 minutos para evaporação de resíduos de clorofórmio. Adicionou-se sobre as colônias mortas 5 mL de meio TSA semi-sólido, contendo 0,1 mL de suspensão aquosa de células do isolado. Estas placas foram incubadas a 28 °C e examinadas após 1, 2 e 5 dias para verificar a presença de halos de inibição.

#### **4. Ensaio de estágio de aplicação de bactérias endofíticas**

Este estudo foi realizado com 29 isolados de bactérias endofíticas que apresentaram potencial na promoção de crescimento e biocontrole do mal-do-Panamá e verificar seu desempenho em minimizar o tempo de enraizamento e aclimação, reduzindo o custo de produção das mudas de bananeira micropropagadas. Sendo assim, estes micro-organismos podem ser destinados a se tornarem componentes no processo de produção de mudas micropropagadas de bananeira.

##### **4.1. Obtenção do inóculo de bactérias endofíticas e do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

Os isolados bacterianos foram cultivados separadamente em meio líquido TS (Tryptona-Peptona-NaCl), e incubados por 24 h a 28 °C. Posteriormente, uma alíquota de 1,0 mL do meio líquido contendo células bacterianas foi retirada e semeada em placas de Petri contendo meio de cultura TSA, com auxílio da alça de Drigalsky procedeu-se o espalhamento. Estas placas foram incubadas por 24 h a 28 °C, e decorrido este intervalo as colônias foram ressuspendidas em água destilada e esterilizada. A concentração de cada suspensão foi ajustada para  $10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup>. Após ajustada a concentração, os isolados foram combinados compondo quatro tratamentos: T1 (APC33, ARZ48, BF3 e BRZ9) + CB1 (APC5, BF09, BF39); T2 (BF6, BF10, ARZ33 e ARZ53) + CB2 (ARZ04, BPC02, BPC03); T3 (BF27, ARZ 35, ARZ56 e ARZ42) + CB3 (BPC05, BPC06, BPC07) e T4 (BF36, BF38, ARZ34, ARZ46 e ARZ47) + CB4 (BPC08, BPC12, BPC34).

Para obtenção de inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, raça 1, o fungo foi cultivado durante sete dias em meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA) em temperatura ambiente. Decorrido este período, adicionou-se água destilada às placas e com um pincel fino procedeu-se a raspagem das colônias crescidas e liberação dos conídios. Para a remoção de fragmentos de micélio, a suspensão foi filtrada utilizando-se duas camadas de gaze. Por meio de hemacitômetro tipo Neubauer, a concentração da suspensão foi ajustada para  $10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.2. Prospecção de combinações de isolados de bactérias endofíticas no enraizamento de mudas micropropagadas de bananeira**

Combinações de bactérias endofíticas selecionadas foram usadas na microbiolização dos explantes de bananeira cultivar Maçã, conforme tratamentos a seguir: T1 (APC33, ARZ48, BF3 e BRZ9), T2 (BF6, BF10, ARZ33 e ARZ53), T3 (BF27, ARZ 35, ARZ56 e ARZ42), T4 (BF36, BF38, ARZ34, ARZ46 e ARZ47). A aplicação dos isolados na etapa de enraizamento foi realizada por imersão dos explantes em suspensão aquosa de células (200 mL) por 5 minutos.

Metade dos explantes microbiolizados na suspensão bacteriana foi transferida para frascos de 263 mL, contendo 60 mL de meio de cultivo, composto de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) contendo 1,35 µM de ácido naftalenoacético (NAA); 10 g.L<sup>-1</sup> sacarose, e adicionado de 4,7 g.L<sup>-1</sup> de agar. A outra metade dos explantes foi transferida para frascos contendo o mesmo meio, porém sem adição do ácido naftalenoacético (NAA). Cinco repetições por tratamento foram utilizadas, sendo três explantes por repetição. Explantes não tratados compuseram o controle. Os frascos foram mantidos em estufas tipo PAD & FAN, com controle de temperatura e umidade, tendo como fonte de luz a irradiação solar, por 20 dias. Ao final desse período foi avaliada a indução do enraizamento dos explantes pelas endófitas.

#### **4.3. Prospecção de combinações de isolados de bactérias endofíticas como promotoras de crescimento de mudas de bananeira micropropagadas na fase de aclimação**

Neste ensaio as combinações entre as bactérias endofíticas selecionadas foram usadas na microbiolização das mudas de bananeira das cultivares 'Maçã', 'Thap Maeo' e 'Grande Naine' após cinco dias do plantio. As combinações entre os isolados resultaram nos tratamentos T1 (APC33, ARZ48, BF3 e BRZ9), T2 (BF6, BF10, ARZ33 e ARZ53), T3 (BF27, ARZ 35, ARZ56 e ARZ42), T4 (BF36, BF38, ARZ34, ARZ46 e ARZ47). As mudas cedidas pela CAMPO (Companhia de Promoção Agrícola), empresa parceira do projeto, foram cultivadas em tubetes plásticos (19 cm de altura x 5,4 cm de largura), contendo uma formulação de substrato composta de 1 parte de substrato vegetal Plantmax estaca: 1 parte de pó de fibra de coco, adicionados de 0,2 % da fórmula PG MIX e 0,2 % da fórmula OSMOCOTE, e mantidos em casa de vegetação.

O experimento foi montado com dez repetições por tratamento, sendo uma muda por repetição para as cultivares 'Thap Maeo' e 'Grande Naine'. Para a cultivar 'Maçã' o experimento foi composto de vinte repetições por tratamento com uma muda por repetição. Após trinta dias, apenas metade das mudas da cultivar 'Maçã' (dez repetições) foram tratadas com isolados com potencial controle biológico. A dispensa dos isolados bacterianos endofíticos combinados foi realizado pela aplicação de 40 mL da suspensão ( $10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup>), no substrato de cada muda.

Após sessenta dias da implantação do ensaio foram avaliadas a altura das plantas, peso seco da parte aérea e do sistema radicular. Quanto à altura, as mudas foram medidas utilizando-se fita métrica da base do pseudocaulo até a última intersecção foliar. Em seguida, foi separada a parte aérea do sistema radicular. As raízes foram lavadas em água corrente para retirada do substrato aderido, colocadas em sacos de papel, identificadas e encaminhadas à estufa a 72 °C por sete dias. Após este período, foi realizada a pesagem do material para determinação da biomassa seca.

Para a avaliação do índice de crescimento, a média das dez repetições, para cada parâmetro de crescimento do controle foi considerada como valor 100, e feitas as devidas comparações em relação aos outros tratamentos. Somados os três valores atribuídos, o controle apresentava índice de crescimento igual a 300. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo uma planta por repetição. O controle foi constituído de mudas

não tratadas. A comparação entre os tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

#### **4.4. Biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* por bactérias endofíticas em mudas micropropagadas de bananeira**

Foi realizada, apenas em mudas da cultivar 'Maçã', provenientes do ensaio anterior, a aplicação de combinações de isolados bacterianos selecionados como antagonísticos à de *F. oxysporum* f. sp. *ubense*, constituiu os tratamentos T1 (APC33, ARZ48, BF3 e BRZ9) + CB1 (APC51, BF09, BF39); T2 (BF6, BF10, ARZ33 e ARZ53) + CB2 (ARZ04, BPC02, BPC03); T3 (BF27, ARZ 35, ARZ56 e ARZ42) + CB3 (BPC05, BPC06, BPC07) e T4 (BF36, BF38, ARZ34, ARZ46 e ARZ47) + CB4 (BPC08, BPC12, BPC34). A dispensa dos isolados bacterianos endofíticos combinados foi realizado pela aplicação de 40 mL da suspensão ( $10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup>), no substrato, com auxílio de becker, trinta dias após o plantio das mudas.

Decorrido trinta dias do tratamento das mudas com bactérias endofíticas com potencial para o biocontrole foi realizado a inoculação do patógeno. As mudas foram retiradas do substrato de cultivo e suas raízes imersas na suspensão do inóculo contendo  $10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>, por 20 minutos. Em seguida, foram transplantadas para vasos com capacidade para 3,0 litros, contendo solo previamente autoclavado, com pH corrigido com adição de CaCO<sub>3</sub>. As mudas foram mantidas em viveiro telado até a avaliação.

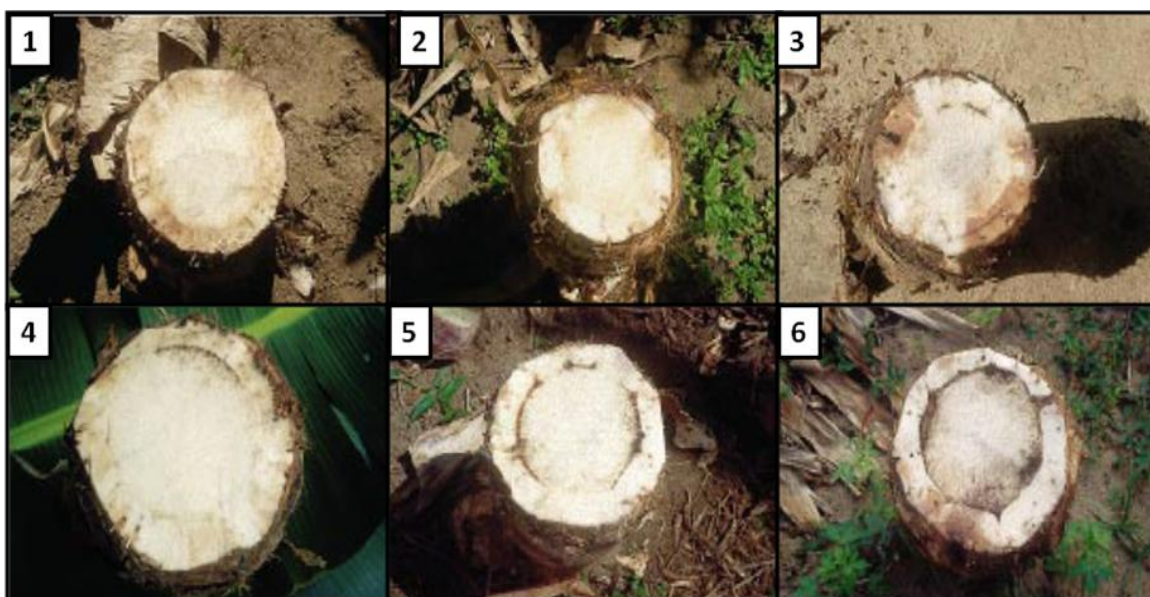
O índice de infecção (ID) foi calculado trinta dias após a inoculação do fungo, tendo como base a avaliação da severidade das lesões no rizoma, por meio da adaptação da fórmula proposta por CIRULLI E ALEXANDER (1966) atribuindo as notas de 1 a 6, de acordo com a escala de avaliação de sintomas proposta por CORDEIRO et al. (1992) em que 1- tecido vascular completamente claro, sem descoloração vascular; 2 - pontos isolados de descoloração no tecido vascular; 3 - descoloração em 1/3 do tecido vascular; 4 - descoloração entre 1/3 e 2/3 do tecido vascular; 5 - descoloração maior que 2/3 do tecido vascular; 6 - descoloração total do tecido vascular (Figura1).

O índice de infecção foi calculado pela fórmula:

ID = 100 [(nota x no de mudas com a mesma nota) / (nota máxima x no de repetições)].

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo uma planta por repetição. O controle foi constituído de mudas não tratadas com suspensão de bactérias endofíticas. A comparação entre os tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

**Figura 1** – Escala de severidade do mal-do-Panamá no rizoma



(CORDEIRO et al., 1992)

## 5. Extração e ampliação de DNA para verificar em nível de gênero os isolados selecionados

Para extração do DNA genômico, os isolados bacterianos selecionados nos testes anteriores foram cultivados em meio de cultura TSA por 24 h em temperatura ambiente. Após esse período, colônias de cada isolado foram transferidas para eppendorfs esterelizados contendo 200 µL de tampão de extração – tampão de lise celular (NaOH 0,05 M + SDS 0,25 %) e incubados em banho seco a 100 °C, 1.500 rpm, por 20 minutos. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 10.000 rpm por 3 minutos em microcentrífuga (Herolab MicroCen 16) e o DNA no sobrenadante foi coletado diluído 10 vezes em água MilliQ e preservado a -20 °C. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1 % para confirmar a eficiência da extração do DNA. Amostras de DNA de cada

isolado foram amplificadas pela técnica de PCR. As reações de amplificação foram feitas em volume de 25 µL contendo 2,5 µL de solução tampão, 2,5 µL de DNTPs, 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µL de cada *primer* específico para identificação do gênero *Pseudomonas* (PSMG- 5' CCT TCC TCC CAA CTT e 9-27- 5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G) (JOHNSEN et al., 1999) e de *Bacillus* (B-K1/F- 5' TCA CCA AGG CRA CGA TGC G e B-K1/R- 5' CGT ATT CAC CGC GGC ATG) (WU et., al 2006) 3,0 µL de DNA diluído em água ultrapura e 13,7 µL de água MilliQ para completar a reação de PCR. A reação foi feita em termociclador PeQLab Biotechnologie GmbH, programado com as seguintes seqüências para *Bacillus* spp., 94 °C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos iniciais com temperatura de 94 °C por 3 minutos, 64 °C por 3 minutos, 72 °C por 2 minutos com extensão final de 72 °C por 10 minutos. Para *Pseudomonas* spp. 94 °C por 6 minutos, seguidos de 35 ciclos com temperaturas de 92 °C por 3 minutos, 54 °C por 3 minutos, 68 °C por 1 minuto e extensão final de 6 minutos por 68 °C. As bactérias que não anelaram para *primers* de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. foi realizado PCR para região 16S (16S rDNA) sendo utilizado *primers* universais 8FN e 1429R procedendo-se os seguintes passos: 94 °C por 2 minutos, seguidos de 9 ciclos iniciais na temperaturas de 94 °C por 45 segundos, 58 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, em seguida foram iniciados mais 29 ciclos com temperaturas de 94 °C por 45 segundos, 58 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto com posterior extensão final de 72 °C por 5 minutos. Após a separação dos produtos amplificados pela PCR, foram adicionados a cada amostra 3 µL de corante (azul de bromofenol a 0,25 % ) e aplicadas em gel de agarose (1,0 %) contendo brometo de etídio, submerso em tampão TAE (Tris-Acetato 90 mM e EDTA 1 mM). O DNA *ladder* de 100 pb foi utilizado como marcador de peso molecular. A separação eletroforética foi de 40 minutos a 100 Volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados em transiluminador de UV e fotodocumentados.

## RESULTADOS

### 1. Isolamento e caracterização fisiológica de bactérias endofíticas de bananeira

Duzentos isolados de bactérias endofíticas foram obtidos de bananeira das cultivares 'Prata Comum' e 'Prata Anã' do Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas, Bahia.

Dezessete endófitas (APC-33, BF-03, BF-06, BF-10, BF-27, BF-36, BF-38, ARZ-33, ARZ-34, ARZ-35, ARZ-42, ARZ-47, ARZ-48, ARZ-53, ARZ-56 e BRZ-09) foram positivos para produção de ácido indolacético. Entretanto nenhum isolado foi capaz produzir sideróforos ou solubilizar fosfato, nos ensaios realizados.

No ensaio para detecção de atividade antifúngica a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, doze isolados (APC-51, BF-09, BF-39, BPC-02, BPC-03, BPC-05, BPC-06, BPC-07, BPC-08, BPC-12, BPC-34 e ARZ-04) inibiram o seu crescimento.

Os isolados a seguir foram selecionados com base nos ensaios de produção de ácido indolacético e no teste de antagonismo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Tabela 1).

**Tabela 1-** Isolados bacterianos selecionados *in vitro* como potenciais promotores de crescimento e biocontroladores.

Isolado	Cultivar	Origem	Promotor	Biocontrolador
APC33	Prata Anã	Pseudocaule	X	
APC51	Prata Anã	Pseudocaule		X
BF03	Prata Comum	Folha	X	
BF06	Prata Comum	Folha	X	
BF09	Prata Comum	Folha		X
BF10	Prata Comum	Folha	X	
BF27	Prata Comum	Folha	X	
BF36	Prata Comum	Folha	X	
BF38	Prata Comum	Folha	X	
BF39	Prata Comum	Folha		X
ARZ04	Prata Anã	Raiz		X
ARZ33	Prata Anã	Raiz	X	
ARZ34	Prata Anã	Raiz	X	
ARZ35	Prata Anã	Raiz	X	
ARZ42	Prata Anã	Raiz	X	
ARZ46	Prata Anã	Raiz	X	
ARZ47	Prata Anã	Raiz	X	
ARZ48	Prata Anã	Raiz	X	
ARZ53	Prata Anã	Raiz	X	
ARZ56	Prata Anã	Raiz	X	
BRZ09	Prata Comum	Raiz	X	
BPC02	Prata Comum	Pseudocaule		X
BPC03	Prata Comum	Pseudocaule		X
BPC05	Prata Comum	Pseudocaule		X
BPC06	Prata Comum	Pseudocaule		X
BPC07	Prata Comum	Pseudocaule		X
BPC08	Prata Comum	Pseudocaule		X
BPC12	Prata Comum	Pseudocaule		X
BPC34	Prata Comum	Pseudocaule		X

## 2. Ensaio de antibiose entre bactérias endofíticas produtoras de ácido indolacético e com capacidade de inibir o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Não foi observada a formação de halo de inibição evidenciando a ausência de mecanismos de antibiose recíproca.

## 3. Aplicação de bactérias endofíticas com potencial de promoção de crescimento na fase de enraizamento em mudas micropropagadas de bananeira



Em um período de 20 dias, foi possível verificar que todos os tratamentos ocasionaram a morte da totalidade dos explantes, tanto nos tratamentos em que no meio de cultura foi adicionado NAA quanto nos quais não continham ácido naftalenoacético.

#### 4. Aplicação de bactérias endofíticas com potencial de promoção de crescimento na fase de aclimação em mudas micropropagadas de bananeira

Para cultivar 'Grande Naine' três tratamentos T1, T2 e T3 foram capazes de promoverem o crescimento de mudas. Para a cultivar 'Thap Maeo', somente o tratamento T2 foi capaz de promover o crescimento de mudas. Na cultivar 'Maçã', não houve efeito da aplicação das bactérias endofíticas sobre o crescimento das mudas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira cultivares 'Grande Naine', 'Thap Maeo' e 'Maçã' tratadas com bactérias endofíticas na fase de aclimação.

Tratamentos	Cultivares / IC*		
	Grande Naine	Thap Maeo	Maçã
T1	467,13a**	380,35ab	308,33 <sup>a</sup>
T2	476,65 <sup>a</sup>	444,52a	297,87 <sup>a</sup>
T3	437,23ab	386,07ab	311,59 <sup>a</sup>
T4	343,08bc	292,15b	279,67 <sup>a</sup>
TC	300,00c	300,00b	300,00a
CV%	20,04	21,98	23,30

\* Índice médio de crescimento. \*\*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $\alpha = 5\%$ ).

#### 5. Biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* por bactérias endofíticas

Foi possível verificar *in vivo* efeito significativo em mudas tratadas com combinações de endófitas antagônicas ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* quando comparado o tratamento T3 (BF27, ARZ 35, ARZ56 e ARZ42) + CB3 (BPC05, BPC06, BPC07) aos demais tratamentos. Verificou-se que os tratamentos T1 + CB1 (APC05, BF09, BF39), T2 + CB2 (ARZ04, BPC02, BPC03) e T4 + CB4 (BPC08, BPC12, BPC34) não foram capazes de controlar a doença (Tabela 3). Em casa de vegetação, aos 15 dias após a implantação do

experimento o tratamento T1 e T2 já apresentavam alterações visíveis ao ataque do patógeno, tais como amarelecimento das folhas, e após 25 dias ocorreu necrose foliar em algumas parcelas evoluindo para morte das plantas.

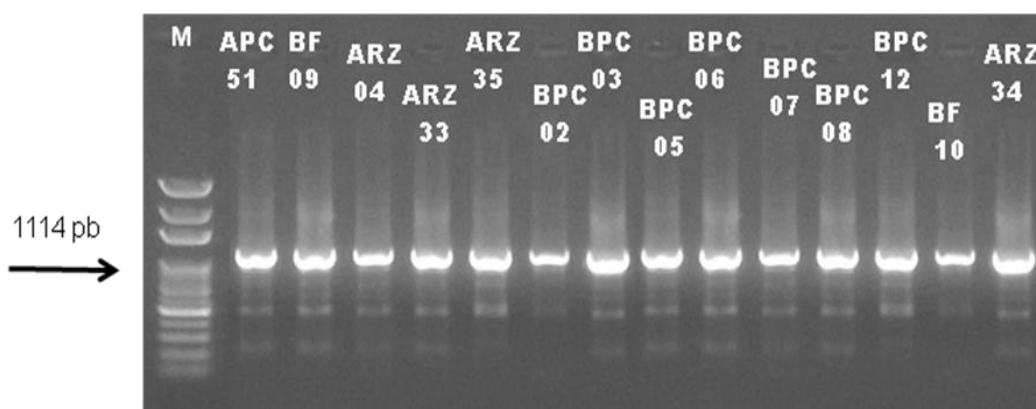
**Tabela 3** - Índice de doença em mudas de bananeira variedade Maçã tratadas com bactérias endofíticas e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Tratamentos	ID*
T1	42,40 c**
T2	27,20 b
T4	20,46 b
TC	19,40 b
T3	13,30 a

\*Índice médio de doença. \*\*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $\alpha = 5\%$ ).

## 6. Identificação em nível de gênero dos isolados selecionados

A qualidade do DNA genômico foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. O aparecimento de uma única banda indicou que o processo de extração do DNA foi bem sucedido (Figura 1). De acordo com os *primers* específicos quatorze endófitas (APC-51, ARZ-04, ARZ-33, ARZ-34, ARZ-35, BF-09, BF-10, BPC-02, BPC-03, BPC-05, BPC-06, BPC-07, BPC-08, PBC-12) são pertencentes ao gênero *Bacillus*. Não foi confirmado, dentre os vinte e nove isolados, o gênero *Pseudomonas*. Os isolados APC-33, BF-03, BF-06, BF-27, BF-36, BF-38, BF-39, ARZ-42, ARZ-46, ARZ-47, ARZ-48, ARZ-53, ARZ-56, BPC-34 e BRZ-09 foram confirmados como sendo de origem bacteriana por meio de *primer* específico que codificou a região 16S rDNA, mas não foi determinado o gênero.



**Figura 1** - Perfil eletroforético dos produtos de PCR utilizando *primers* específicos para identificação bacteriana. Seta indica as bandas características de *Bacillus* spp.

## DISCUSSÃO

Existe uma constante influência da vida microbiana no desenvolvimento das plantas, seja por espécies habitantes da rizosfera, distribuídas no solo, vivendo endofiticamente ou epifiticamente.

No presente trabalho foram isoladas bactérias endofíticas de bananeira e ensaios *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos para identificar quais destas apresentam capacidade de atuar na promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira e no controle biológico do mal-do-Panamá.

Nos testes realizados com intuito de detectar bactérias endofíticas produtoras de ácido indolacético (AIA), o meio enriquecido com L-Triptofano confirmou a importância deste aminoácido na rota metabólica para produção deste regulador de crescimento. Apesar de serem conhecidas quatro vias diferentes para a biossíntese do AIA, todas se originam a partir do triptofano (RAVEN et al., 1996). De acordo com PATTEN e GLICK (2002), cerca de 80% da comunidade bacteriana são capazes de sintetizar AIA, e este efeito pode estar relacionado com resultado da evolução da interação planta-bactéria.

Embora tenha sido utilizado o método qualitativo (positivo/negativo) por meio de reagente de Salkowski, apenas 8,5 % dos isolados, produziram ácido indolacético, que pode ser observado na membrana de nitrocelulose com coloração avermelhada bastante acentuada, revelando que estes isolados têm potencial de promoverem o crescimento vegetal, tendo em vista que o AIA aparentemente não funciona como regulador de crescimento em células bacterianas (PATTEN e GLICK, 2002) .

Nos ensaios, os isolados foram cultivados em meio sólido, o que segundo ASSUMPÇÃO et al. (2009) reduz os níveis de AIA produzido pela bactéria. A quantidade produzida depende do crescimento bacteriano, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de AIA (LAMBRECHT et al., 2000). Contudo, AMBROSINI et al. (2009) utilizando a mesma metodologia do presente experimento, demonstrou que 86,7% das bactérias endofíticas produziram AIA, demonstrando que o cultivo desses isolados no meio sólido não interferiu na produção de ácido indolacético .

A síntese de sideróforos por micro-organismos pode ser influenciada por vários fatores, entre eles: pH, o teor de ferro e ferro fundido à forma de íons, a presença de outros oligoelementos, e uma oferta adequada de carbono, nitrogênio e fósforo (VAZQUEZ et al., 2000).

A análise universal com Cromoazulrol S pode detectar sideróforos em meios quimicamente definidos independente da natureza química do sideróforos. No presente estudo, nenhuma endófito foi capaz de produzir sideróforos. Alguns trabalhos relatam que a produção de sideróforos é uma característica mais comum entre as rizobactérias, entretanto, AMBROSINI et al. (2007) avaliando a promoção de crescimento por bactérias endofíticas, observaram que dos 24 isolados selecionados, 87 % produziram sideróforos. Porém, estas endófitas foram isoladas do sistema radicular que está intimamente relacionada com o solo possibilitando maior contato com o ferro disponível no meio. No entanto os isolados endofíticos do presente estudo foram obtidos de diferentes partes da planta e possivelmente estes não utilizam ferro como elemento essencial para sua sobrevivência.

A capacidade de bactérias em solubilização de fosfato inorgânico também é um fator envolvido na interação bactéria-planta, visto que esta característica aumenta a disponibilidade de fósforo para o vegetal (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999). Nenhum isolado deste estudo demonstrou esta capacidade.

Resultado semelhante foi encontrado por GOMES (2003) onde dos 80 isolados endofíticos selecionados nenhum foi solubilizador de fosfato. A alta proporção de micro-organismos solubilizadores de fosfato está concentrada na rizosfera, por ser uma região metabolicamente muito ativa, e que possui diversas fontes de fosfato, dependendo de cada tipo de rizosfera (VAZQUEZ et al., 2000). Porém, os resultados encontrados não descartam a possibilidade de estas bactérias endofíticas serem solubilizadoras de fosfato por outras vias tais como Fe-P e Al-P, uma vez que, nos testes, foi utilizada somente a fonte de Ca-P. Esta fonte é a mais utilizada pelos micro-organismos para realizar a solubilização do fosfato.

As bactérias endofíticas podem produzir ácidos orgânicos tais como acetato, lactato, oxalato, tartarato, succinato, citrato, gluconato e glicolato que atuam na solubilização de fosfato (FILHO e VIDOR, 2000). Além disso, outras fontes de carbono que compõe o meio de cultura, como frutose, glicose,

sacarose, xilose podem influenciar na solubilização de fosfatos pelos micro-organismos selecionados (FILHO e VIDOR, 2000). Também deve ser levado em consideração que o crescimento do isolado, capacidade e intensidade solubilizadora e o potencial de solubilização variam conforme o micro-organismo e as fontes de carbono e de fósforo. Alterações nas condições do meio de cultura podem modificar o mecanismo envolvido e, ou a eficiência do processo de solubilização do fosfato. Torna-se necessário a realização de outros ensaios para verificar o potencial dessas bactérias endofíticas na solubilização do fósforo, empregando-se outras fontes inorgânicas (Fe-P ou Al-P), além de verificar se o tempo de incubação de sete dias é suficiente. A não solubilização de fosfato pelos isolados pode estar associado à localização destas endófitas na planta, bem com, este mecanismo pode não ser essencial para o desenvolvimento do micro-organismo e estas endófitas não possuem esta capacidade.

Várias bactérias podem estimular o crescimento vegetal por meio da supressão de patógenos, competindo com estes por nutrientes e sítios de infecção, inibindo seu crescimento por meio da produção de antibióticos, enzimas líticas ou induzindo resistência sistêmica. Em testes preliminares, avaliando os duzentos isolados endofíticos de bananeira apenas doze, APC-51, BF-09, BF-39, BPC-02, BPC-03, BPC-05 BPC-06, BPC-07, BPC-08, BPC-12, BPC-34 e ARZ-04, ou seja, 6 %, apresentaram antagonismo *in vitro* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, por meio da inibição do crescimento micelial do fungo.

A literatura relata que seleções preliminares para bactérias são realizadas com grande número de isolados, principalmente porque menos de 1 % são capazes de promover o controle de doenças em plantas (CHEN et al., 1996). GOMES (2003) em estudos realizados encontrou 2,5 % de isolados bacterianos benéficos na cultura da alface controlando cercosporiose em casa de vegetação. ASSIS (2002) selecionou 6% dos isolados em helicônia com capacidade de controlar doenças na cultura, concordando com os resultados encontrados neste estudo nos ensaios *in vivo*.

O teste de antibiose recíproca demonstrou não existir antagonismo entre os isolados bacterianos endofíticos o que possibilitou o uso conjunto dos 29 isolados selecionados. De acordo com ASSUMPCÃO et al. (2009) a aplicação de endófitas de forma combinada pode representar um importante mecanismo de otimização da ação sinérgica dos isolados.

Na fase de indução de enraizamento *in vitro*, explantes selecionados pela CAMPO - (Companhia de Produção Agrícola – SA) cultivados em meios MS sem e com NAA (ácido naftalenoacético) morreram após aplicação dos bacterianos. Embora algumas bactérias endofíticas neste trabalho sejam capazes de produzir AIA, nenhuma induziu o enraizamento em mudas micropropagadas de banana 'Maçã' *in vitro*. Isso pode ter ocorrido pela alta quantidade de ácido indolacético produzido por estes isolados, já que foi testado meio de cultivo com e sem regulador de crescimento vegetal, e neste estudo não foi medida a concentração do fitorregulador produzido pelas endófitas.

Trabalho realizado por SILVA et al. (2004) relataram que qualquer variação no meio de cultivo na fase de enraizamento dos explantes pode provocar a morte dos mesmos, já que neste momento os explantes são altamente sensíveis.

Uma concentração reduzida, assim como uma excessiva produção de AIA pelas bactérias podem atuar negativamente na diferenciação radicular, podendo causar a morte da planta (PAZ, 2009). PATTEN e GLICK (1996) sugerem que a concentração do AIA microbiano pode inibir o crescimento da planta e, portanto, a quantidade do inóculo pode influenciar a promoção do crescimento, sendo um fator crítico no enraizamento. Desta forma, pode ter ocorrido uma elevada produção de AIA pelos isolados combinados que provavelmente interferiu negativamente na indução do enraizamento ocasionando na morte de todos os explantes, uma vez que no controle, onde o meio de rotina da CAMPO não foi alterado, os explantes apresentaram emissão de raízes.

A concentração da suspensão ajustada para  $10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup> para tratamento dos explantes pode também ter contribuído para morte dos mesmos, já que não foram realizados ensaios preliminares para ajuste de uma concentração ótima. Trabalhos reportam bons resultados na promoção de crescimento de plantas tratadas com endófitas em uma concentração em torno de  $10^6$  a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (ASSUMPÇÃO et al., 2009; MELNICK et al., 2008).

Ensaio devem ser realizados avaliando diferentes concentrações das endófitas selecionadas e tempo de exposição dos explantes às suspensões bacterianas para que se possa obter concentração e tempo ótimos de microbiolização para indução do enraizamento, uma vez que as células de raiz são mais sensíveis à adição de auxinas (AIA) (GLICK, 1995).

Trabalhos adicionais também devem versar sobre a quantificação de AIA produzido por essas bactérias endofíticas, utilizando um método preciso, como HPLC (cromatografia líquida de alta performance) (CROZIER et al., 1988) ou pelo método colorimétrico seguido da quantificação em espectrofotômetro (AMBROSINI et al., 2007; ASSUMPÇÃO et al., 2009; BALDOTTO et al., 2010). Desta forma poderá ser aferida a quantidade ótima de AIA a ser utilizada por cada isolado endofítico e verificar viabilidade das misturas, para que realmente possa proporcionar o crescimento radicular do explante. Esse ensaio seria realmente válido para elucidar os problemas da morte dos explantes e como uma ferramenta auxiliar na seleção, pois a indução do enraizamento é um momento crucial para produção de mudas e neste caso, seriam selecionados apenas isolados com concentração ótima de produção de AIA.

Na fase de aclimação para a cultivar 'Grande Naine', os tratamentos T1, T2 e T3 foram capazes de promover o crescimento de plantas. Para cultivar 'Thap Maeo' o tratamento T2 teve esse efeito, indicando que esses tratamentos possuem potencialidade para o uso na promoção de crescimento nas respectivas cultivares.

Sugere-se assim, que o aumento da produção de biomassa seca da raiz esteja associado à produção de AIA pelas bactérias consorciadas, uma vez que células de raiz são mais sensíveis à adição de auxinas (GLICK, 1995). WEBER et al. (2000) demonstraram que misturas de bactérias endofíticas do tipo *Herbaspirillum* e *Burkholderia* atuaram na promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeiras cv. Caipira na fase de aclimação. Em pesquisas realizadas por TING et al. (2009) revelaram que isolado endofítico bacteriano UPM39B3 (*Serratia*) promoveu o crescimento de raízes e da parte aérea em bananeiras.

No presente estudo, além da maioria das endófitas não promoverem o crescimento, em alguns casos houve efeito negativo sobre o desenvolvimento das plantas, embora esse fato seja comum quando se estudam bactérias com o objetivo de promoção de crescimento de plantas (ENEBAK et al., 1998). A cultivar 'Maçã' quando tratada com a combinação de isolados que compuseram os tratamentos T2 e T4, e Thap Maeo com o tratamento T4 apresentaram redução da produção de biomassa seca dos parâmetros avaliados em comparação com o tratamento controle.

A interação entre o estágio de desenvolvimento da planta e a produção de reguladores de crescimento vegetal pelas bactérias endofíticas pode resultar no incremento da matéria fresca e/ou seca do vegetal. Segundo COSTA et al. (2008), a interação estabelecida entre o genótipo da bactéria e o da planta hospedeira, bem como os tipos de tecidos vegetais colonizados vai determinar a relação de sucesso ou não entre vegetal e o micro-organismo. Esse fator pode ter sido uma possível causa dos isolados não terem favorecido o crescimento das mudas de bananeira cultivar 'Maçã', embora tenham promovido o aumento da produção de biomassa seca e da parte aérea nas cultivares 'Grande Naine' e 'Thap Maeo'. Fica evidente a influência do genótipo da planta na relação planta-bactéria e que a promoção de crescimento é um processo complexo e é alcançado em que atuam simultaneamente vários micro-organismos (KUKLISNSKY-SOBRAL, 2003).

Trabalhos foram realizados e comprovaram a relação benéfica entre bactérias endofíticas e plantas. Estudos com bactérias endofíticas *Bacillus* sp. produtores AIA, demonstram sua atuação na promoção de crescimento de culturas como alface (GOMES et al., 2003), pepino (SILVEIRA et al., 2004), soja (ASSUMPÇÃO et al., 2009), aumentando significativamente o peso fresco e seco das plântulas em casa vegetação. No presente trabalho, os dois isolados BF10 e ARZ33 foram identificados em nível de gênero como *Bacillus* produtores de AIA, apresentaram efeito significativo sobre a produção de massa seca nos tecidos radiculares e da parte aérea, corroborando com trabalho citados na literatura. Espécies de *Bacillus* são citadas em alguns trabalhos como a principal bactéria endofítica que ocorre em determinadas plantas (HALLMANN et al., 1997a).

O fato de os isolados não proporcionarem, na sua grande maioria, o crescimento das mudas de bananeira pode ser atribuído a diversos fatores como estresse sofrido pelas plantas, uma vez que, durante o processo de produção da muda, não foi adicionado nenhum elemento nutritivo. Também pequenas mudanças no balanço da população bacteriana endofítica, podem ocasionar um desequilíbrio entre os micro-organismos e no modo de ação destes na planta (ASSUMPÇÃO, 2009). Entretanto, é possível que esses isolados, simplesmente não promovam crescimento pelo fato de que uma pequena parcela de micro-organismos apresente esse potencial (CHEN et al., 1996).



Mesmo que as bactérias avaliadas no experimento sejam provenientes de bananeiras com bom estado fitossanitário, a aplicação nas mudas é um processo artificial. Além disso, a população de bactérias endofíticas nas plantas é controlada por diversos fatores, como: temperatura, disponibilidade de nutrientes e competição com outros micro-organismos. Na aplicação bacteriana em mudas, milhões de células podem se tornar patogênicas ou saprofíticas, impedindo o desenvolvimento da planta (PATTEN e GLICK, 2002).

Embora o efeito benéfico de bactérias promotoras de crescimento seja mais ressaltado, a ocorrência de efeitos deletérios também pode ocorrer e foram observadas por SANTOS et al. (2005) por diferentes espécies de bactérias endofíticas e epifíticas sobre o desenvolvimento de helicônia (*Heliconia psittacorum* L.f.).

Na fase de enraizamento, explantes tratados com combinações de bactérias endofíticas não apresentaram efeito no crescimento o que pode ter ocorrido devido à disponibilidade excessiva de AIA pelas endófitas. Também se deve considerar a sensibilidade dos explantes às alterações do meio de cultivo.

A associação das endófitas APC-33, ARZ-48, BF-03, BRZ-09, BF-06, BF-10, ARZ-33 e ARZ-53, na fase de aclimação, demonstrou efeito positivo sobre o crescimento das de bananeira fato, que revela que plantas cultivadas na presença de micro-organismos podem apresentar melhor desenvolvimento vegetal. A promoção de crescimento pode ter ocorrido provavelmente pela interação da quantidade de AIA produzida pelos isolados combinados e o estágio de desenvolvimento da planta. Nesta fase a associação das bactérias com as mudas pode ter ocorrido segundo COSTA et al. (2008) pela interação estabelecida entre o genótipo da bactéria e o da planta hospedeira, bem como do tipo de tecido vegetal colonizado.

Mudas de bananeira tratadas com os isolados BF-27, ARZ-35, ARZ-56, ARZ-42, BF-36, BF-38, ARZ-34, ARZ-46 e ARZ-47 selecionados *in vitro* como produtores de AIA não apresentaram efeito no crescimento quando comparados com as mudas da testemunha. Pode-se levantar a hipótese de que não houve incremento dos parâmetros analisados para promoção de crescimento possivelmente por não ter ocorrido estabelecimento entre o genótipo das bactérias e das plantas hospedeiras.

A capacidade de atuação dos isolados pode ter sido interferida pela condição de cultivo das mudas, já que no substrato não foi adicionado nenhum elemento nutritivo, o que de acordo com ROMEIRO (2007a) interfere na capacidade de competitividade e sobrevivência dos micro-organismos.

Portanto, a confirmação da combinação dos isolados APC-33, ARZ-48, BF-03, BRZ-09, BF-06, BF-10, ARZ-33 e ARZ-53 com potencial biotecnológico revelou a importância da adoção de endófitas na fase de aclimatação, sendo esta fase crucial no processo de produção de mudas micropropagadas.

Neste trabalho o tratamento das mudas de bananeira foi realizado com combinações de isolados compatíveis, porém é preciso utilizá-los de forma isolada para que se possa avaliar a capacidade de promoção de crescimento individualizada.

A busca por medidas complementares ao uso de cultivares resistentes e controle químico, como o controle biológico é uma dessas medidas que têm sido propostas (ROMEIRO et al., 2000).

O conhecimento de um organismo em realizar controle biológico de pragas e doenças de plantas é importante para a seleção de linhagens com potencial de exploração biotecnológica. Existem inúmeros trabalhos relatando a utilização de micro-organismos endofíticos no controle de fitopatógenos (STURTZ et al., 1998).

Dos doze isolados de bactérias endofíticas selecionados *in vitro* por inibirem o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, três deles, BPC-05, BPC-06 e BPC-07 reduziram a severidade do mal-do-Panamá em até 31,4 % nas mudas de bananeira.

Em experimento realizado por WEBER et al. (2007) utilizando mudas de bananeira 'Maçã' tratadas com bactérias endofíticas apresentaram redução considerável da severidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

No biocontrole do mal-do-Panamá, os resultados demonstram que a co-dispensa dos antagonistas foi eficiente. A aplicação de grupos de micro-organismos relacionados tem sido postulada como uma alternativa para a melhoria da eficiência do controle biológico. Segundo ROMEIRO e GARCIA (2009), bactérias benéficas, quando dispensadas em plantas são capazes de promover o controle biológico de enfermidades por antagonismo direto, por indução de resistência ou por ambos os mecanismos. Entre as mais comuns e

que atuam de forma efetiva, estão as bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* (SILVEIRA et al., 2004).

Neste estudo os antagonistas com potencial controle biológico, BPC-05, BPC-06 e BPC07 são pertencentes ao gênero *Bacillus*, corroborando com que já está escrito na literatura.

Em trabalho realizado por LIAN et al. (2008) bactérias endofíticas *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. isoladas de plantas de banana foram eficientes antagonistas contra o mal-do-Panamá. Espécies de *Bacillus* têm sido amplamente testadas no controle biológico uma vez que produzem endósporos, o que facilita a formulação dos produtos para aplicação comercial. Para o controle de doenças, produtos como Companion, EcoGuard, HiStick N/T, Kodiak, Rhizo-Plus, Serenade, Subtilex e YieldShield, a base de *Bacillus*, são registrados para uso agrícola nos Estados Unidos (Mariano et al., 2004).

Bactérias antagônicas, como as do gênero *Bacillus*, de modo geral agem significativamente por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo ou competição. Micro-organismos que agem por antibiose, geralmente têm amplo espectro de ação, de forma que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido (KUPPER et al., 2003).

Isolados de *B. subtilis* produzem uma grande variedade de metabolitos antifúngicos, entre os quais se podem ser citados a surfactina, iturina e fengicina. Embora estruturalmente semelhantes, surfactinas, iturinas e fengicinas são diferentes em alguns aspectos biológicos em relação a sua atividade. Como exemplo, iturinas e fengicinas exibem uma forte atividade antifúngica e são inibitórios para o crescimento de uma ampla gama de fitopatógenos. No tocante a surfactinas, as mesmas não são fungitóxicas, mas exercem algum efeito sinérgico antifúngico, quando em companhia da iturina A (MAGET-DANA et al., 1992).

Endófitas, APC51, BF09, BF39, BPC02, BPC03, BPC08, BPC12, BPC34 e ARZ4, selecionadas *in vitro* por apresentarem potencial de controle do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* não controlaram a doença em mudas de bananeira. O tratamento T1 que corresponde à mistura dos isolados APC51, BF09 e BF39 fez com que a planta ficasse mais sensível a doença e elevou em mais de 100% o nível de severidade do mal-do-Panamá. WELLER (1988) e

ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO (2006) citam como fatores responsáveis pelo desempenho inconsistente de um biocontrolador a perda da competitividade ecológica devido à alteração de alguma característica da bactéria, a variação na colonização pelo antagonista, e a interferência de fatores bióticos e abióticos. Esses resultados podem ter sofrido influência do meio já que o solo de cultivo das mudas de bananeira estava desprovido de elementos nutritivos, o que como citado anteriormente influencia negativamente na capacidade de sobrevivência e competitividade das endófitas, prejudicando a ação biocontroladora destas bactérias.

Além disso, a relação entre o endofítico e seu hospedeiro é variável podendo, por diversos fatores, deixar de ser simbiótica ou mutualística, se tornando saprofítica ou oportunística, nesse caso fitopatogênica, conforme revela (STROBEL e DAIAY, 2003). Segundo MUSSON (1994), alguns organismos endofíticos podem se comportar como não patogênicos em um hospedeiro e patogênicos em outros. CAMERON (1970) observou que isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos de tecidos sadios de cerejeira revelaram-se, posteriormente, fitopatogênicos. O autor sugere que a endofítia poderia ser uma das formas de sobrevivência e de escape de tratamentos fitossanitários de superfície. Adicionalmente, WHITESIDES e SPOTTSS (1991) encontraram isolados de *Pseudomonas syringae* no interior de raízes de pereira que não eram patogênicos nem a cerejeira nem a pereira e sugeriram que os tecidos internos de pereira poderiam servir de reservatório de inóculo para outras plantas. Dessa forma, a endofítia pode ser visualizada como um mecanismo de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas, posto estarem elas numa posição protegida (LEBEN, 1981).

Contudo os resultados apresentados nesse trabalho ratificam que é possível a utilização de agentes de biocontrole como método alternativo-complementar de controle de doença de plantas assim como na promoção de crescimento de plantas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sustentabilidade da agricultura requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produção de alimentos sem acarretar prejuízos ao meio ambiente, à saúde humana e animal. Uma alternativa para atingir esse objetivo consiste no uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas e com potencial para o controle biológico de pragas e doenças.

Foi possível observar neste estudo que bactérias endofíticas isoladas da cultura de bananeira possuem potencial uso para promoção de crescimento. Dos dezessete isolados produtores de AIA *in vitro*, oito proporcionaram resultados significativos no crescimento das mudas de bananeira na fase de aclimação. Apesar disso, não se deve descartar a possibilidade do uso dos outros isolados, pois pode ter ocorrido uma não adaptação desses micro-organismos ao ambiente que lhe foi exposto. É interessante realizar, ainda, estudos com o objetivo de compreender melhor a ecofisiologia destas endófitas nas plantas cultivadas no campo para que possa obter resultados na produtividade agrícola.

O fato da produção de mudas micropropagadas ser realizada pela empresa CAMPO (Companhia de Promoção Agrícola) localizada dentro da Embrapa Mandioca e Fruticultura - Cruz das Almas, instituição onde foi desenvolvido este trabalho, facilitará a continuidade deste estudo com relação as alterações na metodologia e sobre a futura aplicação desses micro-organismos com comprovada eficiência para disponibilização destas mudas as diversas regiões produtoras de banana.

Algumas bactérias endofíticas selecionadas nos testes *in vitro* foram capazes de reduzir a severidade do mal-do-Panamá causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* nas mudas de banana 'Maçã', que é altamente suscetível ao fungo. Estes resultados abrem novos caminhos para pesquisas em controle biológico do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no

sentido de elucidar quais mecanismos estariam envolvidos na supressão do fungo, intencionando um melhor entendimento das relações entre as bactérias endofíticas, o patógeno e a planta hospedeira, para que haja, no futuro, a possibilidade de desenvolvimento de produtos biológicos capazes de exercer o controle deste fitopatógeno em condições de campo.

## REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 Edition. Academic Press, London. p.635, 2005.

ALVES, E. J. **A cultura da banana. Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2ed. Revisada. EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação-SPI. Brasília, 1999, 585p.

ALVES, E. J. **Cultivo da bananeira tipo Terra**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura EMBRAPA/CNPMPF, 176p. 2001.

ANDRADE, F.W.R., AMORIM, E. P. R., ELOY, A. P.; RUFINO, M. J. Ocorrência de doenças em bananeiras no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.305-309, 2009

ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; van ELSAS, J.D. ROCHA, U.N.da; van OVERBEEK, L.S. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* Strain P9, and its effect on associated bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n.11, p. 3396-3406, 2009.

ARAVIND, R.; KUMAR, A. EAPEN, S.J.; RAMANA, K.V. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. **Applied Microbiology**, v 48, p.58-64, 2009.

ASSIS, S.M.P. *Heliconia psittacorum* L.f. Doenças, pragas e utilização de rizobactérias na promoção de crescimento. 191 p. Tese Doutorado em Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 2002.

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

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S. de.; AZEVEDO, J. L. de. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – Meio Ambiente, p. 445-461. 1998.

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

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; MACHERONI Jr., W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.(Ed) **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA- Meio Ambiente, p. 57-93. 2000.

BACKMAN, P.A.; SIKORA, R. Endophytes: An emerging tool for biological control. **Biological Control**. v.46,p.1-3, 2008.

BALDANI, J.I.; OLIVEIRA, L.M.; GUIMARAES, S.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS Jr, F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs. **Embrapa Agrobiologia**, p.397-4000, 2000.

BALDOTTO, L.E.B.;BALTOTTO, M.A.;OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**,v.34, p.349-360, 2010

BARBOSA, M.V.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; OLIVEIRA, M. Seleção de bactérias produtoras de auxina associadas à cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 12-13, 2009

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

BARRETTI. P. B.; SOUZA. R. M.; POZZA. A. E. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência Agrotecnológica**, v. 32. n. p. 731-739, 2008.

BENCHIMOL, R.L.; CHU, E.Y.; MUTO, R.Y.DIAS FILHO, M.B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,v.35,n.7,1343-1348p. 2010.

BENITE, A. M. C.; MACHADO,S.P., MACHADO, B.C. SIDERÓFOROS: “Uma resposta dos microrganismos”. **Química Nova**, São Paulo, v.25, p.1155-1164, 2002.

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

BORGES, A L; SOUZA, L S. **O cultivo da banana**. Cruz das Almas. Mandioca e Fruticultura, 279p. 2004.

BORGES, A. J. S.; TRINDADE, A. V.; MATOS, A. P.; PEIXOTO, M. F.S. Redução do mal-do-Panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**; v. 24, n. 1, p. 35-41, 2007.

CAMERON, H.R. Pseudomonas content of cherry trees. **Phytopathology**, v.60, p.1343-1346, 1970.

CARDOSO, K. J. V.; Rizobactérias promotoras do crescimento de mudas micropropagadas de bananeira e agentes de biocontrole do mal-do-Panamá *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. 59 p. Dissertação Mestrado em Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v.69, p.2-9. 1988.

CASTRO, A. C. R. de. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas – Cruz das Almas**: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p.385, 2009.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R.S. e GUPTA, V.K. (Ed.). **Management of soil born diseases**. Ludhiana: Kalyani Publishers, p.165-184.1996.

CHEN,C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J. W. Biological control of *Fusarium Wilt* on cotton by uso of endophytic bacteria. **Biological Control**, n.5, p.83-91, 1995.

CIRULLI, M.; ALEXANDER, L. J. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytopathology**, v. 56, p.1301-1304, 1966.

COELHO, E.F. **Curso de bananicultura irrigada**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 13 p. 2009.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK,J.; CLEMENT, C.; BARKAI, E.A. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71,p.1685-1693, 2005a.

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

CORDEIRO, Z.J.M. (Org). **Banana produção: aspectos técnicos**. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 143 p. 2000a.

CORDEIRO, Z.J.M. **Banana Fitossanidade**. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Frutas do Brasil; v 8, 121p. 2000b.



CORDEIRO, Z.J.M. Doenças fúngicas da bananeira: sigatoka-amarela, sigatoka-negra e mal-do-Panamá. **Summa Pytopathologica**, v.25, n.1, p.58-59, 1999.

COSTA, D. P.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, F. J.; SILVA, M. O.; BARBOSA, M. V.; SILVA, M. C. B.; ANDRADE, P. A. M. Caracterização do potencial de promoção de crescimento vegetal de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**; v. 48, p. 32-38, 2008.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of índole-3-acetic acid and related in culture médium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S. Classificação botânica, origem e evolução. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.) **Banana**. Produção: aspectos técnicos. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.12-16. 2000.

DOBBELAERE, S.; VANDELEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in rihizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22,p.107-149, 2003.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. New York: **Academic Press**, 859p. 1980,

DONATO, S. L. R. et al. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.), em dois ciclos de produção no sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 139-144, 2006.

**FAO**. Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 22 de dezembro de 2010. 2008.

**FAO**. Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 28 de dezembro de 2010.

ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedling. **Forest Science**,v.44, n.1, p.139-144, 1998.

FERNANDES, C. F.; COSTA, J. N. M.; HOLANDA FILHO, Z. F.; SOUZA, F. F.. Doenças da bananicultura: mal-do-Panamá. Embrapa (**Circular Técnica 86**) 1ª edição.p. 1-3, 2006.

FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, SP, v.33, n.10, 2003.

FISHAL, E.M.; MEON, S.; YUNA, W.M. Induction of tolerance to *Fusarium* Wilt and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible berangan banana pre-inoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burkholderia* sp. (UPMB3). **Agricultural Sciences in China**, v.9, 1140-1149p. 2010.

FOURIE, G.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T.R.; VILJOEN, A. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* vegetative compatibility groups. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4770-4781, 2009.

FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and development modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non fluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, v. 96, p. 928-936, 1991.

GANGWAR, M.; KUAR, G. Isolation and characterization of endophytic bacteria from endorhizosphere of sugarcane and ryegrass. **The Internet Journal of Microbiology**, v.7,n.1, 2009.

GLICK, B. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Journal of Microbiology**, v.41, p. 109-117, 1995.

GODINHO, E.P.de. Mudanças de bananeira: Tecnologia de produção. Belo Horizonte: EPAMIG: (**Boletim Técnico**, 4). 44p. 1994.

GOES, A. de, MORETTO, K.C.K. Mal-do-Panamá. In: RUGGIEIRO, C. **Banicultura**. FUNEP: Jaboticabal, p. 419-435, 2001.

GOMES, P. **Fruticultura Brasileira**. 9 ed. São Paulo. Editora Nobel. 441p. 1983.

GOMES, A.M.A. Cultura da alface: produção de mudas utilizando *Bacillus* spp., escala diagramática para cercosporiose e levantamento da doença em Pernambuco. 90 p. Tese Doutorado em Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2003.

GROENEWALD, S. Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. Faculty of Natural and Agricultural Science. Pretoria, p.19,2005.

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

HINTON, M.D.; BACON, C.W. Enterobacter cloacae in the endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, v. 129, p. 117-125, 1995.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; van MONTAGU, M.; KELLEMBERGER, E. Root colonizing and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1913-1923, 1994.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Disponível em: <[www.sidra.ibge.gov.br/bda](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda)> Acesso em 06 set. 2010.

Instituto Brasileiro de Frutas e Derivados - IBRAF. Disponível em <<http://www.ibraf.org.br>> Acesso em 26/01/2011.

INUI, R.N. Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar. 78p, Dissertação Mestrado

em Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

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

JAIN, D. Y.; PATRIQUINI, D.G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* wich causes branching of wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.206-210, 1985.

KADO, C.I. Plant pathogenic bacteria. In: BALOWS, A., TRÜPER, H.G., DWORKIN, M., HARDER, W., SCHLEIFER, K.H. (Eds.). **The Prokaryotes**. Springer-Verlag: New York, p. 660-662, 1992.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; DAMODARAN, T.; SOORIAANATHASUNDARAM, K.; SAMIYAPPAN, R. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top vírus. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.1087-1098, 2007.

KUKLINSK-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L. ; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244–1251, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine Max*) e estudo da interação endófito-planta. 174p, Tese de Doutorado em Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo.2003.

KUPPER, K. C. Mal-do-Panamá. **ANAIS XIII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**. p.28-31, 2005.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.251-257, 2003.

KUSS, A. V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300,2000.

LEAL, P. L.; MARTINS, M. A.; RODRIGUES, L. A.; SCHIAVO, J. A. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira micorrizadas em diferentes recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27,n.1, p. 84-87, 2005.

LEBEN, C. How plant pathogens survive. **Plant Disease**, v.65, p. 633-637, 1981.

LEONEL, S.; GOMES, E. M.; PEDROSO, C. J. Desempenho agrônomo de bananeiras micropropagadas em Botucatu – SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, 2004.

LEONG, S.K.; LATIFFAH, Z.; BAHARUDDIN. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* of banana. **Journal of Applied Sciences**. v.6, p.1301-1307,2009.

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

LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, M. Attempts in the biological control of citrus mal secco (*Phoma tracheiphila*) using endophytic bacteria. **Difesa Delle Piante**, v.17, n.1-2, p.43-49, 1994.

LIMA, M. B.; SILVA, S. de O.; FERREIRA, C. F. **Banana: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Mandioca e Fruticultura.(Coleção 500 perguntas, 500 respostas).182p. 2003.

LIN, L.; QIAO, Y.S.; JU, Z.Y.;MA, C.W.; LIU, Y.H.;ZHOU, Y. J.;DONG, H.S. Isolation and characterization of endophytic *Bacillus subtilis* jaas ad1 antagonist of eggplant *Verticillium wilt*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.73. 1489-1493p. 2009.

LINS, G. M. L.; TRINDADE, A.V.; ROCHA, H. S. Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas micropropagadas de bananeira em diferentes estágios de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 143-147, 2003.

LIU, Z.; PILLAY,V.; NOWARK, J.; ZHY-DE WEI. *In vitro* culture of watermelon and cantaloupe with and without beneficial bacterium. **Acta Horticulturae**, v. 402,p.58-60, 1995.

LUVIZOTTO, D. M. Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar. p. 94. Dissertação Mestrado em Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

MAGET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAK, M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v.74, p.1047–1051, 1992.

MANICA, Ivo. **Fruticultura tropical: 4. banana**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. 485 p.

MARIANO, R.L.R. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: [s.n.], 171p. 2000.

MARIANO,R.L.R.;SILVEIRA,E.B.;ASSIS,S.M.P.;GOMES,A.M.A.;NASCIMENTO,A .R.;DONATO,V.M.T.S. Importância das bactérias promotoras de crescimento e de

biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 1, p.89-111, 2004.

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

MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R.; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v.28, n.3, p.222-228, 2002.

MELLO, M.R.F. Efeito de bactérias na promoção de crescimento e no biocontrole da fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas. 84p. Dissertação Mestrado em Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2002.

MELNICK, R. L.; ZIDACK, N. K.; BAILEY, B. A.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M.; BACKMAN, P. A. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**, v.46, p. 46-56, 2008.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L. RAAIJMAKERS, J.M. Endophytic bactéria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**,v. 73,p.7259-7267,2007.

MOREIRA, R. S. **Banana**: teoria e prática de cultivo. Campinas: Fundação Cargill, 335 p. 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.

MUSSON, G. Ecology and effects of endophytic bacteria in plants. Auburn: Auburn University, Ala. (Masters thesis). 1994.

NOTÍCIAS DA BAHIA. Adab libera exportação de banana produzida na Bahia para a Argentina. IN: Bananicultura: Pesquisas voltadas para a agricultura familiar. MARTINS, A.N.; FURLANETO,F.P. **Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária**, p. 77-86, 2008.

OLIVEIRA, A. L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. Biological nitrogen fixation (BNF) in micropropagated sugarcane plants inoculated with different endophytic diazotrophic bacteria In: PEDROSA, F, O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W.E. (Ed.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers,v.38, p. 425, 2000.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p.631-634, 2002.

OLIVEIRA, Z.M. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional. 164p. Tese Doutorado em Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2009.

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

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42,p.207-220, 1996.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpsS. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.635-642, 2002.

PAZ, I.C. P. Bactérias endofíticas de eucalípito e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais.112p. Tese Doutorado em Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. F. S.; VÉRAS, S. M. **Doenças da bananeira no Estado do Amazonas**. Manaus: Embrapa-CPAA, 27p. (Embrapa-CPAA. Circular Técnica, 7). 2000.

PEREIRA, L. V.; SILVA, C. R. R; ALVARENGA, A. A. Influência do tipo de muda no comportamento vegetativo e produtivo da bananeira cv. Prata-anã, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.1, p.164-167, 2001.

QIU, X.; PEI, Y.; WANG, Y.N.; ZHANG, F.X. Isolation of pseudomonads from cotton plants and their effect on seedling diseases. **Acta Phytophylacica Sinica**, v.17, n.4, p.303-306, 1990.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.EICHHORN, S.E. Regulação do crescimento e do desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.EICHHORN, S.E.(Ed) **Biologia Vegetal**. Ed. Guanabara Koogan S.A: Rio de Janeiro, p.508-533, 1996.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.;STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogenfixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2155-2162, 2004.

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

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de resistência em plantas a patógenos por elicitadores de natureza bacteriana. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.85-99, 2009.

ROMEIRO, R.S. Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos/Visçosa. Ed.UFV, 269p. 2007 a.

ROMEIRO, R.S. Controle biológico de enfermidades de plantas: procedimentos Visçosa. Ed.UFV, 172p. 2007b.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **American Phytopathological Society**, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

RYAN, P. R.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 278, 1-9p. 2008.

SANTOS, J. de A. dos; SILVA, C. R. de R; CARVALHO, J. G. de; NASCIMENTO, T. B. do. Efeito do calcário dolomítico e nitrato de potássio no desenvolvimento inicial de mudas da bananeira Prata-Anã (AAB), provenientes de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n.1, p. 145-149, 2004.

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

SCARPARE FILHO, J. A.; MINAMI, K.; KLUGE, R. A.; TESSARÍOLI NETO, J. Estudo do primeiro ciclo produtivo da bananeira 'Nanicão' (*Musa* sp.) desenvolvida a partir de diferentes tipos de mudas. **Scientia Agrícola**, v. 55, n. 1, 1998.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Annual Biochemistry** v. 160, p. 47-56, 1987.

SEMAL, J. Somaclonal variations and crop improvement. Dordrecht: Martinus Nijhoff. p. 8-13. 1986.

SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURTZ, A. V.; VANDAMME, P. BARKA, E.A. SALLES, J. F.; van ELSAS, J. D.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B. R. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55,p. 1187-1192, 2005.

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

SHIOMI, H. F. Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro no controle da ferrugem. Dissertação Mestrado em agronomia/Proteção de Plantas. 58p. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2004.

SILVA, H.S.A.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C.R.F.; TOZZI, J.P.L.; MELO, I.S.; NUNES, F.V. **Microrganismos endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 38, 25p. 2006.

SILVA, J.R.C. Bactérias endofíticas no controle da mancha *Xanthomonas vesicatoria* e a da pinta preta do tomateiro. 160 p. Dissertação Mestrado em Fitopatologia Universidade Federal de Lavras: Lavras, 2004.

SILVA, M. de C.A. da; TARSITANO, M. A. A; BOLIANI, A. C. Análise técnica e econômica da cultura da banana Maçã (*Musa spp.*) na região noroeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p.1399-142. 2005.

SILVA, S. de O. e; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA J. R. da S. Bananeira. In: BRUCKNER C. H. (Ed). **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**.Viçosa: UFV, p.101-157. 2002.

SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A; MARIANO, R.L.R.; SILVA NETO, E.B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.2, p.217-221, 2004.

SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura**. São Paulo, Agronômica Ceres, 530p. 1971.

SIMMONDS, N. W. **Los plátanos**. Barcelona: Blume, 539 p. 1973.

SIVAMANI, S.; GNANAMANICKAM, S. S. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*, **Plant and Soil**, v. 107, n.1,p.3-9, 1988.

SYNDER, W. C.; HANSEN,H.N. Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. **Phytopatology**, v.44, p. 338-342, 1953.

SOTO BALLESTERO, M. **Bananas: cultivo y comercialización**. 2. ed. San José: Litografía e Imprensa LIL, 674 p. 1992.

SOUZA, A. S.; SHEPHERD, K.; SOUZA, F. V. D.; ZAIDAN, H. A. Micropropagação e variação somaclonal de bananeira (*Musa spp.*). In: Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal, 1., Brasília, 1993. **Resumos**. Brasília: EMBRAPA, p. 77. 1993.

STEINER, U.; SCHONBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Eds). Induced resistance to disease in plants **Developments in Plant Pathology**, v4.p. 86-110, 1995.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**. v.35, p. 235-270, 1997.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactives products. **Critical Review in Biotechnology**, v.22, n.4,p.315-333, 2002.



STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.67: p.491-502,2003.

STURTZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, v. 175, p. 157-263, 1995.

STURTZ, A.V., CHRISTIE, B.R., MATHESON, B.G., NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, p.13-19, 1997.

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

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G. Associations 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.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. Micro-organismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.1, p.43-49, 2007.

TING, A.S.Y; MEON, S; KADIR, J; RADU, S; SINGH, G. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **BioControl**, v. 53, n.3, 2009.

VAN PEER, R., NIEMANN, G.J., SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology**, v.81, p.728-734, 1990.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTEZ, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.460-468, 2000.

VERHAGEN, B.W.M.; GLAZEBROOK, J.; ZHU,T.; CHANG, H.S.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p.895-908, 2004.

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

VIEIRA, D. P. Esperam-se progressos na bananicultura. **AGRIANUAL 2005: Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**, São Paulo, p. 221-225, 2004.

VIEIRA, L.M. Banana. **EPAGRI/CEPA**. 2009. [www.cepa.epagri.sc.gov.br](http://www.cepa.epagri.sc.gov.br)  
Acessado em: 27 de dezembro de 2010.

WANG, Y.Q.; OHARA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18,p. 385-396, 2005.

WEBER, O.B.; BALDANI,J.I.;DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.11, p.2277-2285, 2000.

WEBER, O. B.; MUNIZ, C. R.; VITOR, A. O.; FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, V. M. Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on plantlets of banana 'Maça'. **Plant and Soil**, n.1-2, v.298, p.47-56. 2007.

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

WHITESIDES, S.K.; SPOTTS, R.A. Frequency, distribution and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. **Phytopathology**, v.81, p.453-457,1991.

ZAIDAN, H. A.; BROETTO, F.; OLIVEIRA, E. T.; GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. Influence of potassium nutrition and the nitrate/ ammonium ratio on the putrescine and spermidine contents in banana vitroplants. **Journal of Plant Nutrition**, v 22, n. 7, 1999.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas fruteiras**, v. 2, 1309 p. 2002.