

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL

DIVERSIDADE E MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M635d Miguel, Paulo Sérgio Balbino, 1981-
2015 Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto /
Paulo Sérgio Balbino Miguel. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 125f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

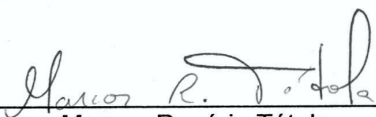
1. Eucalipto - Microbiologia. 2. Fungos.
3. Bactérias endofíticas. 4. Leveduras. 5. Filogenia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

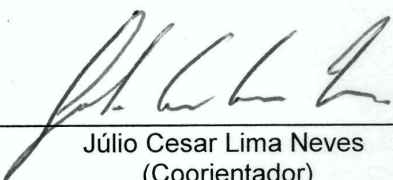
CDD 22 ed. 634.973766

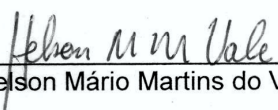
DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

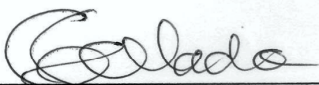
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de maio de 2015.


Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)


Júlio Cesar Lima Neves
(Coorientador)


Helson Mário Martins do Vale


Gleiber Quintão Furtado


Maurício Dutra Costa
(Orientador)

A Deus.

*À minha esposa,
à minha mãe e ao meu irmão.*

Dedico.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; mas os insensatos
desprezam a sabedoria e a instrução”. (Prov.1:7)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor e consumidor da minha fé.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pela orientação e pela confiança.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pela orientação no início deste trabalho.

Aos professores Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves, pela coorientação.

À minha amada esposa Mara, que me incentivou todos os dias com seu amor, dedicação, paciência, confiança e compreensão.

À minha mãe, D. Aparecida, que sempre lutou e me sustentou em oração.

Ao meu irmão Fábio, um grande amigo e incentivador.

Aos amigos Julio Delvaux, Marcelo Nagem e Bruno Coutinho Moreira, pelo apoio, pela amizade e pelo auxílio neste trabalho.

Aos irmãos da Igreja Metodista Wesleyana de Viçosa, pelas orações feitas pela minha vida.

A todos que de alguma forma me ajudaram na condução deste trabalho.

BIOGRAFIA

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL, filho de Francisco de Oliveira Miguel e de Aparecida de Fátima Balbino Miguel, nasceu em Astolfo Dutra – MG, no dia 19 de junho de 1981.

Em dezembro de 2008 graduou-se em Ciências Biológicas pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. Em fevereiro de 2011, obteve o título de *Magister Science* em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, e, em março do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da mesma instituição, submetendo-se à defesa da tese de doutorado em maio de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
CAPÍTULO 1.....	04
INTRODUÇÃO.....	05
REVISÃO DE LITERATURA	06
Endofíticos	06
Colonização da planta.	08
Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos	11
Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos.....	13
Eucalipto	16
Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto	18
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2.....	29
RESUMO	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
Área de estudo.....	32
Amostragem	33
Descontaminação superficial das folhas de eucalipto	34
Extração de DNA metagenômico em folhas e exsudatos xilemáticos.....	34
Análises da diversidade de fungos endofíticos	35
Análise filogenética	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 3.....	57
RESUMO	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS	60
Áreas de estudo	60

Amostragem	61
Descontaminação superficial de folhas.....	61
Extração de DNA metagenômico em folhas.....	62
Extração de açúcares	62
Análise da diversidade de fungos e leveduras	63
Análise filogenética	65
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
CAPÍTULO 4	90
RESUMO	91
INTRODUÇÃO	92
MATERIAL E MÉTODOS	93
Área de estudo	93
Amostragem	94
Descontaminação superficial de folhas	94
Extração de DNA metagenômico	95
Análise da diversidade de bactérias endofíticas totais e diazotróficas.....	96
Isolamento de bactérias endofíticas.....	97
Extração de DNA de culturas puras	97
BOX-PCR.....	98
Amplificação e Sequenciamento do rRNA 16S	98
Análise filogenética	99
RESULTADOS	99
DISCUSSÃO	110
CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS.....	117
CONCLUSÕES GERAIS.....	124

RESUMO

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2015. **Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves.

Árvores pertencentes ao gênero *Eucalyptus* estão entre as mais cultivadas em todo o mundo. O rápido crescimento do eucalipto e a sua adaptabilidade a vários ambientes podem ser compreendidos pelo estudo da comunidade microbiana presente nessa planta. Essa comunidade é composta por micro-organismos endofíticos e epifíticos. Endofíticos colonizam os tecidos internos de plantas saudáveis sem causar sintomas ou efeitos negativos à planta. Neste estudo, foram avaliadas a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de plantas de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco. Avaliou-se, também, a diversidade de bactérias, fungos e leveduras em plantas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo. A diversidade microbiana foi relacionada à concentração de açúcares. Após extração de DNA de folhas e exsudatos xilemáticos, os *amplicons* obtidos por amplificação das subunidades do rRNA 16S, 18S e 26S foram utilizados na DGGE e as bandas eluídas dos géis foram sequenciadas. A avaliação da composição da comunidade bacteriana em folhas do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo também foi comprovada pelo isolamento e sequenciamento do rRNA 16S das colônias. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela idade das plantas e pela sazonalidade. A análise filogenética mostrou a dominância de fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota. Neste estudo, foi apresentado o relato inédito de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos em plantas. No viveiro, a colonização endofítica da parte aérea de eucalipto foi dependente das fases de desenvolvimento da planta. Neste estudo, foi relatada pela primeira vez a presença das leveduras dos gêneros *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia* e das espécies *Rhodosporidium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* como endofíticas em eucalipto. Bactérias dos filos Firmicutes, Proteobacteria, classes Alfa, Beta e Gamma, e Actinobacteria foram identificadas

na comunidade investigada. Nessa comunidade, as espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* foram identificadas pela primeira vez como endofíticas. Proteobacteria foi o filo mais representativo em folhas de mudas nas fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento; e Firmicutes, em plantas a campo. Observaram-se correlações negativas entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de diversidade e riqueza microbianas. A distribuição das espécies de fungos, leveduras e bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento da planta. Algumas espécies bacterianas encontradas apresentam potencial para fixação de nitrogênio.

ABSTRACT

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, May, 2015. **Endophytic microbial diversity in Eucalypts**. Adviser: Maurício Dutra Costa. Co-advisers: Marcos Rogério Tótola and Júlio César Lima Neves.

Plants belonging to the *Eucalyptus* genus are among the most cultivated in the world. Eucalypts are fast-growing plants and their ability to adjust to a variety of environments can be understood by studying the associated microbiome. Eucalypt microbiome is composed by endophytic and epiphytic microorganisms. Endophytes colonize the internal tissues of healthy plants without causing symptoms or negative effects. In this study, the endophytic fungal diversity and distribution were evaluated in leaf and xylematic exudates from 18- and 72-month-old eucalypt plants in the beginning of the rainy season, in the rainy season and in the dry season. The bacterial, fungal, and yeast diversity in plants from different developmental stages was also evaluated: clonal garden, shading, post-shading, expedition and field. The microbial diversity was correlated with the sugar concentration in leaves. Following DNA extraction from leaf and xylematic exudates, amplicons generated by the amplification of 16S, 18S, and 26S rRNA subunits were submitted to DGGE, and the bands excised were sequenced. Bacterial community composition in leaves from the clonal garden, shading, post-shading, expedition, and field was also evaluated and confirmed by isolating bacteria and sequencing the 16S rRNA from bacterial colonies. Endophytic fungal community in leaves was affected by plant age and seasonality. Phylogenetic analyses revealed the dominance of Basidiomycota and Ascomycota phyla during the development stages studied. In this work, the first report of *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi*, and *Teratosphaeriaecea* sp. as inhabitants of the xylematic exudates in plants is provided. In the nursery, endophytic colonization of eucalypt shoots was dependent on the plant developmental stages. In this study, the yeasts *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia*, *Rhodosporidium fluviale*, and *Aureobasidium pullulans* were described as endophytic for the first time. Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, and Gamma- classes) and Actinobacteria were identified in the endophytic community. *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, and *Terrabacter lappili* were identified as endophytic for the first time. Proteobacteria was the most represented phylum in

leaves from the shading and post-shading stages, while Firmicutes was the main phylum found in leaves of plants in the field. Negative correlations were observed between the glucose, fructose, and sucrose contents in leaves and the microbial diversity and richness indices measured. The distribution of endophytic fungal, yeast, and bacterial species in eucalypt revealed to be distinct and specific to the developmental stage of eucalypt plants. Some of the bacterial species found in eucalypt leaves show the potential for nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade de adaptação das plantas ao ambiente envolve interações com diferentes espécies de micro-organismos. Dentre essas, as interações endofíticas são amplamente conhecidas pelos benefícios proporcionados ao hospedeiro, os quais incluem o estímulo ao crescimento pela fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), a síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e a supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006). Os micro-organismos endofíticos encontram-se associados a plantas saudáveis, sem causar sintomas de doença ou danos. Podem melhorar o estado sanitário (CLARKE *et al.*, 2006) e o desenvolvimento da planta (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012), o que justifica o grande volume de pesquisas sobre esses micro-organismos (BRADER *et al.*, 2014).

O eucalipto está entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta e a sua elevada produção de biomassa demandam alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004). Muitos desses nutrientes podem ser absorvidos mais eficientemente quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Portanto, estudos envolvendo essas comunidades podem proporcionar melhor compreensão das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento das plantas (BRADER *et al.*, 2014). O entendimento da diversidade dos endofíticos em associação com as plantas pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

O acesso à diversidade microbiana pode ser obtido por abordagens moleculares por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos, proporcionando novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; DA SILVA *et al.*, 2014). Este estudo compreende quatro capítulos. O capítulo 1 teve como objetivo revisar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração e colonização e os métodos de identificação de micro-organismos na planta. No capítulo 2 foi estudada a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilêmáticos em plantas

de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. No capítulo 3 foi avaliada a diversidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento e relacionada à concentração de açúcares. No capítulo 4 foi investigada a diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto em plantas provenientes do jardim clonal, do sombreamento, recém-saídas do sombreamento, da expedição e do campo e relacionadas à concentração de açúcares.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS:
COLONIZAÇÃO, BENEFÍCIOS, IDENTIFICAÇÃO E
DIVERSIDADE EM EUCALIPTO**

INTRODUÇÃO

As plantas sustentam diversidade variável de micro-organismos, que podem influenciar o seu desenvolvimento (SUMAN *et al.*, 2005). Parte dessa diversidade é composta por bactérias (MIGUEL *et al.*, 2013), fungos (DESHMUKH *et al.*, 2006), arqueas e leveduras (OLIVEIRA *et al.*, 2013) endofíticos, os quais interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença (BULGARELLI *et al.*, 2013). Esses micro-organismos têm alto potencial de adaptação e muitos deles persistem ao longo de vários estádios de desenvolvimento da planta (HARDOIM *et al.*, 2008). Quando em interação, eles são responsáveis por estimular o crescimento por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e pela supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, sendo de grande valor econômico e alternativa viável para a indústria madeireira (FAO, 2015). As espécies e híbridos de eucalipto estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, e a madeira é usada para a produção de celulose em função da rápida taxa de crescimento, da adaptação a várias condições ecológicas e pela qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta demanda alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004), os quais podem ser melhor acessados quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo das comunidades microbianas associadas ao eucalipto pode proporcionar melhor entendimento das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento vegetal (BRADER *et al.*, 2014).

O acesso à diversidade microbiana pode ocorrer por métodos moleculares que dependem (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou não de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A diversidade microbiana em eucalipto é pouco documentada (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), malgrado a importância econômica da cultura para o país, que é o maior produtor mundial. O objetivo desta revisão foi levantar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração, colonização e os métodos de identificação desses micro-organismos na planta, com base em dados atuais sobre o assunto.

REVISÃO DE LITERATURA

Endofíticos

Micro-organismos são essenciais para a manutenção da vida na Terra, mas pouco se sabe sobre a diversidade microbiana presente no solo, nos oceanos, na atmosfera, nos seres humanos e nas plantas (TURNER *et al.*, 2013). No interior das raízes, nas folhas e em outras partes da planta, comunidades microbianas distintas proporcionam melhor acesso da planta aos nutrientes e auxiliam na supressão de diversas doenças (SMITH, 2014). O termo endofíticos se refere a micro-organismos que, em alguma fase de seu ciclo de vida, vivem em associação com plantas saudáveis, sem causar sintoma de doença ou prejuízo ao hospedeiro. Esses micro-organismos adaptam-se ao habitat específico representado pelo corpo das plantas, apresentando potencial metabólico distinto da microbiota do solo (BRADER *et al.*, 2014).

No contexto da interação endofítica, as bactérias que se destacam são pertencentes aos filos Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma), Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (BACON & HINTON, 2007). Já os fungos endofíticos estão distribuídos, em sua maioria, nos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011). A detecção dos micro-organismos endofíticos é realizada por métodos culturais ou moleculares (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A densidade populacional de micro-organismos endofíticos é variável e depende das espécies endofíticas, do genótipo da planta, do estágio de desenvolvimento, das condições ambientais (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO 2006), da localização do cultivo (FISHER *et al.*, 1993) e da parte da planta em associação (MAGNANI *et al.*, 2010). As associações endofíticas podem, ainda, mostrarem-se dependentes de muitos fatores, incluindo o tipo de hospedeiro, a densidade de plantas no local, a disponibilidade de nutrientes no solo e as interações com outros micro-organismos (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011).

O sucesso da colonização endofítica depende da expressão de genes cujos produtos serão importantes para a entrada e a sobrevivência do micro-organismo no interior do hospedeiro (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). A planta que abriga associações endofíticas compartilha recursos com os parceiros microbianos, codificando diversos transportadores no genoma que permitem a transferência de carbono de si para a microbiota associada (TAGHAVI *et al.*, 2010).

A interação endofítica pode impactar a nutrição, a adaptação e o desenvolvimento vegetal (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012) e, por meio

da competição, suprimir patógenos e melhorar a sanidade das plantas (CLARKE *et al.*, 2006; SATHISH *et al.*, 2012). Os micro-organismos endofíticos podem também beneficiar a planta pelo aumento da resistência a estresses abióticos (NAGABHYRU *et al.*, 2013).

A existência da interação planta-micro-organismo endofítico tem sido constatada em frutos (MIGUEL *et al.*, 2013), caules, folhas (PROCÓPIO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2008; TUPPAD & SHISHUPALA, 2014), raízes (TUPPAD & SHISHUPALA, 2014) e em outras partes da planta. Hipotetiza-se que a entrada de micro-organismos endofíticos seja controlada pela planta e pelas condições ambientais (HARDOIM *et al.*, 2008). Algumas evidências sugerem que a planta tem papel ativo na seleção de certos micro-organismos para a vida endofítica. No entanto, os mecanismos pelos quais isso é feito ainda não são conhecidos (HARDOIM *et al.*, 2008). Micro-organismos endofíticos que ocupam o mesmo nicho em diferentes plantas podem ser muito distintos taxonomicamente (TURNER *et al.*, 2013).

A capacidade de micro-organismos endofíticos de colonizarem os tecidos internos das plantas pode conferir vantagens ecológicas quando esses são comparados aos micro-organismos epifíticos. O habitat representado pelo ambiente interno do corpo das plantas é mais protegido de variações extremas de temperatura, do potencial osmótico, da radiação ultravioleta e da competição com outros micro-organismos (HALLMAN *et al.*, 1997).

Em relação ao ciclo de vida, os micro-organismos endofíticos podem ser obrigatórios ou facultativos. Micro-organismos endofíticos obrigatórios são estritamente dependentes da associação com a planta para o crescimento e a sobrevivência. Em contrapartida, os facultativos apresentam ciclo de vida bifásico, alternando entre a planta e o ambiente (HARDOIM *et al.*, 2008). O estilo de vida facultativo é o mais comum. Os micro-organismos endofíticos obrigatórios, em face da menor competição com outros micro-organismos no interior da planta, podem apresentar arsenal químico menos rico em relação àqueles da rizosfera e da filosfera. Entretanto, os micro-organismos endofíticos podem produzir metabólitos mais específicos que podem sustentar a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014). Os colonizadores facultativos, por sua vez, têm de ser capazes de sobreviver na rizosfera antes de adentrar a planta, podendo produzir metabólitos inibitórios a outros micro-organismos ou que facilitem a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014).

Colonização da planta

A rizosfera corresponde ao volume de solo influenciado pelas raízes da planta. A diversidade microbiana rizosférica é alta por ser esse ambiente rico em fontes de energia prontamente disponíveis (BRADER *et al.*, 2014), provenientes da rizodeposição de mucilagens e exsudatos (PHILIPPOT *et al.*, 2013). A relação entre micro-organismos endofíticos e rizosféricos é bastante próxima. Muitos deles penetram o hospedeiro pelas raízes (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009) e colonizam novos habitat, escapando da competição intensa vigente na rizosfera (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Entretanto, existem características distintas entre os micro-organismos rizosféricos e os endofíticos, uma vez que nem todas as populações microbianas da rizosfera podem adentrar a planta, modificar seu metabolismo e adaptar-se ao ambiente interno dos tecidos vegetais (TURNER *et al.*, 2013). Muitos micro-organismos competentes na rizosfera podem, coincidentemente, tornarem-se endofíticos após entrarem na planta via raiz, mas a falta de genes-chave para o sucesso ecológico daqueles em endofitismo não permite a persistência no hospedeiro. A competência endofítica é adquirida pela expressão de genes que devem contribuir para a persistência e para o sucesso da colonização dos espaços internos da planta (HARDOIM *et al.*, 2008).

A rizosfera é região de elevada competição entre as populações microbianas aí presentes. Proteobactérias de rápido crescimento, denominadas estrategistas-r, são capazes de se instalar no solo rizosférico e de utilizar ampla diversidade de compostos de carbono derivados das raízes. Não somente bactérias prosperam rapidamente na rizosfera rica em nutrientes, mas também fungos, oomicetos, vírus e arqueas (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Os pontos de emergência de raízes laterais e a zona de diferenciação e alongamento das raízes são locais proeminentes para ingresso ativo de micro-organismos. Nesses locais, os tecidos não completamente diferenciados podem facilitar a penetração microbiana (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Os espaços intercelulares da epiderme, das regiões corticais e das células vegetais lisadas são os principais locais de colonização, com densidades de até 10^{10} células/cm³ (CHI *et al.*, 2005). Os tecidos vasculares e as células do xilema também podem ser invadidos, embora, muitas vezes, em densidades mais baixas (COMPANT *et al.*, 2010). No caso específico de fungos, geralmente, a infecção endofítica nas folhas ocorre horizontalmente por meio de esporos trazidos pelo ar (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

A colonização endofítica bacteriana pode ocorrer em três etapas. Na primeira, ela move-se em direção às raízes da planta passivamente, através do fluxo de água do solo, ou ativamente, por meio da atividade flagelar induzida por compostos liberados pelo hospedeiro (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008), em mecanismo de quimiotaxia. Em *Azospirillum*, por exemplo, a quimiotaxia é induzida por açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outros compostos (COMPANT *et al.*, 2005). Para tal, genes envolvidos no reconhecimento dos compostos e quimiotaxia devem ser ativados. A expressão de genes envolvidos na quimiotaxia em *Pseudomonas aeruginosa*, a exemplo de *cheY*, *cheA* e *pctA*, que codificam, respectivamente, um regulador de resposta de dois componentes, um regulador de resposta de quimiotaxia e uma proteína quimiostática, é regulada negativamente pelos exsudados de uma cultivar de beterraba, mas não por exsudados de outra cultivar. Assim, a composição dos exsudados depende da cultivar, da exposição da planta ao estresse e do estágio de desenvolvimento, o que pode resultar em diferenças na comunidade bacteriana rizosférica e, consequentemente, da endofítica (COMPANT *et al.*, 2010).

Numa segunda etapa, a adsorção não específica da bactéria às raízes, seguida pelo ancoramento das mesmas, vai ocorrer (SPRENT & DEFARIA, 1988). Uma vez ligadas às raízes, as bactérias sofrem várias divisões celulares e se estabelecem em microcolônias (HARDOIM *et al.*, 2008). Por fim, as bactérias endofíticas podem alcançar o interior da planta por meio de tecidos danificados que surgem naturalmente como resultado do crescimento vegetal, pelos radiculares, por junções epidérmicas ou, ainda, via ferimentos (SPRENT & DEFARIA, 1988. HARDOIM *et al.*, 2008). Dentro da planta, a colonização pode ser sistêmica, pela migração através do sistema vascular e do apoplasto, ou local, como nos tecidos do córtex e do xilema (HALLMANN *et al.*, 1997).

Em bactérias gram-negativas, o antígeno-O da camada LPS pode contribuir para a colonização radicular, processo dependente da espécie bacteriana envolvida. Outra estrutura importante na colonização é o pílus do tipo IV, o qual é essencial para o estabelecimento de microcolônias de *Azoarcus* nas raízes de gramíneas (DÖRR *et al.*, 1998).

A colonização bem sucedida inclui genes envolvidos na quimiotaxia, formação de flagelos e pili, além de várias vias metabólicas e sistemas de transporte (COMPANT *et al.*, 2010). A análise do genoma de *Klebsiella pneumoniae* demonstrou que essa espécie apresenta características típicas de bactérias diazotróficas, anaeróbias facultativas e endofíticas, com a presença de genes

envolvidos na degradação de carboidratos, de compostos aromáticos e celulolíticos, na ciclagem de nutrientes e de carbono e na capacidade de formar associações endofíticas (FOUNTS *et al.*, 2008).

A penetração de fungos endofíticos dá-se por hifas de penetração ou apressórios pela parte basal dos pelos radiculares. A ramificação das hifas formam muitos clamidóporos preenchendo todo o pelo radicular (ERNST *et al.*, 2003; DESHMUKH *et al.*, 2006). Essa penetração pode dar-se de maneira semelhante em outras partes da planta, como folhas e caules, e, também, por ferimentos, incluindo os causados por herbivoria e outros mecanismos. Fungos endofíticos não penetram as células das plantas e, geralmente, se abrigam nos espaços intercelulares, enquanto utilizam baixos níveis de nutrientes nos fluidos intercelulares, não proporcionando danos ao hospedeiro (GAO *et al.*, 2005). As sementes podem funcionar como veículo de transporte de propágulos fúngicos para a próxima geração de hospedeiros (ERNST *et al.*, 2003).

A colonização endofítica é possível pela grande diversidade de enzimas produzidas pelo micro-organismo, tais como celulasas, pectinases e xilanasas (SEO *et al.*, 2010; KANNAN *et al.*, 2015). A degradação enzimática da parede celular tem sido observada no momento da colonização da epiderme radicular, mas não nos espaços intercelulares do córtex; porém, muito pouco é conhecido sobre a regulação desses processos. Entretanto, sabe-se que a liberação constitutiva de hidrolases não é desejada, uma vez que poderia resultar em patogenicidade (HALLMAN *et al.*, 1997). Os níveis de enzimas degradadoras da parede celular produzidas por bactérias diferenciam as endofíticas, com baixos níveis, das patogênicas, com níveis altos e danosos (HARDOIM *et al.*, 2008).

A colonização das folhas é afetada por estruturas, como vasos condutores, pelos e estômatos. A comunidade residente no interior da planta, quando comparada ao exterior, está em habitat sujeito a maiores flutuações de temperatura, umidade e radiação (TURNER *et al.*, 2013). Esses fatores alteram a fisiologia da planta e, aliados a outros, como estágio de crescimento, tipo de solo, regime hídrico, manejo e densidade de bactérias, podem promover a mudança na estrutura da comunidade endofítica (HARDOIM *et al.*, 2012). Outro fator que diferencia as comunidades endofíticas é a idade das plantas, com as mais jovens apresentando maior densidade que as mais maduras (TURNER *et al.*, 2013).

A complexidade da interação endofítica e a sua contribuição para as plantas justificam novos estudos. O rápido avanço nas tecnologias de sequenciamento de nova geração e no processamento e interpretação dos dados gerados possibilita o

conhecimento da amplitude da diversidade microbiana nesse ambiente (KEMLER *et al.*, 2013). A abordagem metabolômica possibilita o acesso a informações mais amplas sobre a composição dos metabólitos produzidos pelas plantas (JORGE *et al.*, 2014). A interação de plantas com bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio necessita ser mais bem compreendida e caracterizada (CARVALHO *et al.*, 2014b). O acesso à diversidade desses micro-organismos é a etapa inicial e relevante para esse entendimento (TAGHAVI *et al.*, 2010), e estudos da expressão de genes podem possibilitar a identificação das diversas vias metabólicas envolvidas nessas associações (CARVALHO *et al.*, 2014b).

Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos

A interação entre micro-organismos endofíticos e plantas contribui para a adaptação a diversos nichos e para a produção de vários metabólitos que podem ser importantes na aquisição de nutrientes pela planta (BRADER *et al.*, 2014).

A disponibilidade de nitrogênio é um dos fatores que mais limitam o crescimento vegetal, requerendo a adição do elemento ao solo em altos níveis para a manutenção da produtividade agrícola (OLDROYD & DIXON, 2014). A fixação biológica é importante fonte de nitrogênio na agricultura e representa alternativa promissora à fertilização química. Bactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (SUMMAN *et al.*, 2005; OLDROYD & DIXON, 2014), e os endofíticos podem contribuir significativamente para o sucesso de abordagens biotecnológicas visando o suprimento de nitrogênio às culturas.

A capacidade de fixar nitrogênio é encontrada nos principais grupos filogenéticos bacterianos (OLDROYD & DIXON, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas são geneticamente diversas, sendo identificadas principalmente entre as Proteobacterias (Alfa-, Beta- e Gamma), a exemplo dos gêneros *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Esses micro-organismos possuem o complexo enzimático da nitrogenase (ARAÚJO *et al.*, 2014), sendo a maquinaria de fixação e de regulação do processo muito similar à de *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Interações planta-bactérias diazotróficas ocorrem em diferentes níveis, podendo apresentar especificidade em relação ao hospedeiro (ARAÚJO *et al.*, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas podem expressar os genes *nifH*, além de outros, importantes ao processo de fixação biológica, podendo contribuir com quantidades significativas de N para a planta (TURNER *et al.*, 2013).

Bactérias, leveduras e fungos endofíticos podem produzir fitormônios, principalmente ácido indol acético (AIA) (WAQAS *et al.*, 2012; HOFFMAN *et al.*, 2013; NUTARATAT *et al.*, 2014). Além do AIA, as giberelinas, as citocininas e o ácido abscísico podem também ser sintetizados por esses micro-organismos e disponibilizados para as plantas (KHAN *et al.*, 2012; GAIERO *et al.*, 2013). As auxinas e as citocininas estão envolvidas nos processos regulatórios que determinam a arquitetura da raiz. Já as giberelinas são importantes nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, promovendo o aumento do crescimento caulinar e radicular e da densidade dos pelos radiculares (CARVALHO *et al.*, 2014a). Os fitormônios são os principais agentes que regulam a resposta da planta frente às mudanças ambientais (MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2009). Além disso, podem atuar como antimicrobianos, a exemplo do ácido fenil-acético, produzido por *Azospirillum brasiliense*, com atividade antagonica a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011).

A microbiota endofítica pode melhorar a sanidade vegetal por meio da produção de moléculas antagonistas a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011). A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, pode ser controlada pela secreção de substâncias antimicrobianas que impedem a germinação dos uredósporos (SHIOMI *et al.*, 2006). Os melhores resultados com esse tipo de controle são obtidos com o uso de *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Klebsiella pneumoniae* (SHIOMI *et al.*, 2006).

A proteção da planta por bactérias endofíticas pode ocorrer pela perturbação do *quorum-sensing*, mecanismo necessário para a virulência em alguns patógenos. Esse mecanismo geralmente é mediado pelas *N*-acil homoserina lactonas (AHLs). A produção de lactonases degradadoras de AHLs por bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Klebsiella* pode interferir na comunicação patógeno-patógeno e impedir a expressão de genes de virulência (FRIESEN *et al.*, 2011).

A produção de alcalóides por fungos endofíticos pode reduzir a herbivoria, resultando na diminuição do consumo de folhas e sementes por animais (FRIESEN *et al.*, 2011). Da mesma forma, o uso de endofíticos pode ser estratégia interessante no controle biológico (TURNER *et al.*, 2013). Leveduras endofíticas produzem enzimas hidrolíticas, a exemplo das celulases, quitinases, glucanases e proteases, que degradam quitina, β -1,3-glucana, manoproteínas e celulose, componentes da parede celular de vários fungos fitopatogênicos (NATURAT *et al.*, 2014).

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* são reconhecidamente produtoras de antibióticos, compostos voláteis, substâncias antifúngicas, antivirais e inseticidas (TURNER *et al.*, 2013). Já alguns fungos, principalmente os representantes do filo Ascomycota, são eficientes produtores de compostos antibacterianos (DESHMUKH *et al.*, 2014) e de compostos oxidantes durante a colonização vegetal. A produção de antioxidantes está ligada ao aumento da tolerância ao estresse em plantas hospedeiras (WHITE-JÚNIOR & TORRES, 2010).

Os micro-organismos endofíticos são, portanto, fontes de novos produtos naturais, com potencial biotecnológico. Dada a capacidade dos mesmos de degradar compostos orgânicos, são importantes na biorremediação e na fitorremediação (RYAN *et al.*, 2008). Com a utilização de técnicas de engenharia genética, podem ainda ser melhorados no que concerne ao potencial de degradação de compostos xenobióticos (BARAC *et al.*, 2004).

Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos

O critério para distinguir micro-organismos endofíticos requer a desinfestação da superfície da planta pela utilização de álcool 70%, hipoclorito de sódio 3% e água esterilizada, em tempos variáveis a depender do tecido vegetal utilizado. Essa etapa visa à eliminação de epifíticos presentes na filosfera (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Após a desinfestação das partes vegetais desejadas, a diversidade microbiana endofítica pode ser acessada pela utilização de análises moleculares das comunidades por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.*, 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A comprovação da natureza endofítica dos micro-organismos extraídos das plantas pode ser obtida pelo plaqueamento da última água de lavagem do procedimento de desinfestação da planta, ou pela incubação de partes do material vegetal submetido à desinfestação superficial (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). O tempo de incubação e o meio de cultura utilizado são dependentes do micro-organismo que se deseja estudar.

A análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) é um dos métodos dependentes de cultivo utilizados como discriminadores taxonômicos para a identificação de espécies em comunidades microbianas (HILL *et al.*, 2000). Esse método consiste na esterificação dos lipídeos extraídos da amostra, seguida da

separação e identificação por cromatografia gasosa desses compostos. A identificação é baseada nos tempos de retenção da amostra na coluna cromatográfica, comparados aos tempos de retenção de padrões submetidos ao mesmo processo (KIRK *et al.*, 2004). Esse método é utilizado para se estudar a composição das comunidades microbianas, bem como as mudanças nas populações em razão da presença de contaminantes químicos no ambiente (SICILIANO & GERMIDA, 1998) ou, ainda, para a identificação de isolados de bactérias endofíticas de plantas (VEGA *et al.*, 2008; MIGUEL *et al.*, 2013).

A identificação de isolados bacterianos desconhecidos de uma amostra também pode ser realizada pelo sequenciamento do gene rDNA 16S e subsequente comparação da sequência obtida com as depositadas nos bancos de dados, como o *Genbank* (National Center for Biotechnology Information) (TEMMERMAN *et al.*, 2004). O gene rRNA 16S é alvo de estudos de diversidade porque está presente em todos os organismos procariotos, sendo pouco sujeito à transferência horizontal (KIRK *et al.*, 2004). A sequência do gene rRNA 16S contém regiões variáveis espécie-específica, o que permite a identificação dos isolados bacterianos em nível de espécie (CAI *et al.*, 2003). Esse gene é, portanto, o de escolha para a construção de *primers*, reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e alinhamento de sequências (HARDOIM *et al.*, 2012; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Com esse tipo de análise, é possível conhecer os gêneros bacterianos em mais de 90% dos casos e as espécies entre 65 a 83% (JANDA & ABBOTT, 2007). Quando o poder discriminatório não é suficiente, a análise filogenética exclui outros gêneros e espécies. Assim, os dados de sequenciamento são mais apurados em razão das relações filogenéticas disponíveis (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). Uma limitação considerável da técnica ocorre quando duas espécies bacterianas distintas compartilham sequência rRNA 16S muito similares (WOO *et al.*, 2008).

O sequenciamento do gene rRNA 16S origina dados não ambíguos e reprodutíveis, mesmo para isolados raros (DRANCOURT *et al.*, 2000), tendo se tornado método de referência para a taxonomia e a identificação bacterianas (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). O uso de sequências do rRNA 16S tem levado à reclassificação e à renomeação de gêneros e espécies bacterianas, além de permitir a classificação de micro-organismos não-cultivados e facilitar a descoberta e a classificação de novas espécies (WOO *et al.*, 2008).

A identificação de espécies fúngicas e de leveduras é obtida pela sequência de DNA do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA 18S ou pelo fragmento rRNA

18S (NILSSON *et al.*, 2008). ITS é uma região multicópia que nos eucariotos é compreendida por uma região não codificante, uma codificadora e outra não codificante. A variabilidade dessa região proporciona resolução suficiente para identificação de fungos e leveduras (ARNOLD, 2007). Já a região D1/D2 do gene rRNA 26S e o sequenciamento desse domínio têm proporcionado a identificação de espécies de leveduras de forma rápida e precisa (HESHAM *et al.*, 2014).

A análise do perfil fisiológico das comunidades é outro método dependente de cultivo para análise da diversidade microbiana. Através dele é possível determinar a capacidade do micro-organismo em utilizar diferentes fontes de carbono *in vitro*. Essa metodologia é baseada no uso de microplacas contendo 190 fontes alternativas de carbono. A técnica é importante quando se avalia a diversidade metabólica potencial de comunidades microbianas em diferentes ambientes (KIRK *et al.*, 2004; BOCHNER, 2009). A abordagem polifásica é baseada na combinação entre características morfológicas e bioquímicas das espécies de micro-organismos com informações de sequências e reconstrução filogenética, sendo a escolha para estudos de caracterização da comunidade microbiana (VANDAMME *et al.*, 1996), por tornar as análises mais robustas (STACKEBRANDT & EBERS, 2006).

Diferentemente das endossimbioses ou dos sistemas patogênicos bem estudados, as bases moleculares das interações endofíticas ainda não são bem compreendidas (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Análises genômicas comparativas poderão fornecer melhor compreensão da dinâmica da comunidade, sinalização e funções nas associações endófito-planta (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Estudos dependentes de cultivo são importantes; entretanto, não permitem o acesso à totalidade da diversidade microbiana. A utilização de tecnologias de sequenciamento *high-throughput* nos últimos anos tem permitido a identificação de milhares a milhões de sequências nas amostras, revelando, inclusive, espécies raras. A abordagem metagenômica revela a diversidade da comunidade microbiana em interação com a planta (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação do metagenoma pode ser realizada por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), o qual é satisfatório para avaliação da diversidade, mas limitado para detecção de espécies (DAVID *et al.*, 2014). Os fragmentos de DNA de mesmo tamanho, amplificados por PCR, são submetidos à eletroforese em gel com gradiente desnaturante, geralmente de formamida e ureia, e utilizados para análise da estrutura da comunidade microbiana (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013). Essa técnica

permite a identificação de populações de menor e maior abundância em comunidades rizosféricas e endofíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014) e contribui para elucidar mudanças na estrutura da comunidade microbiana em resposta a determinados fatores ao longo do tempo (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

A tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilita o sequenciamento do DNA de amostras ambientais em plataformas que geram informação em milhões de pares de bases em corrida única. Nessa abordagem é possível a identificação de táxons microbianos com alta resolução (PHILIPPOT *et al.*, 2013). O princípio da NGS é a geração de sequências curtas abundantes que podem ser montadas em elementos contíguos maiores para sequenciar todo o genoma. A técnica requer material genético de alta qualidade, limpo e concentrado (YOCKTENG *et al.* 2013). Essa metodologia é utilizada para se estimar a diversidade em comunidades complexas, permitindo análise mais robusta dos ambientes estudados. Entretanto, a grande quantidade de dados gerados proporciona grandes desafios, especialmente no que diz respeito à bioinformática (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

Eucalipto

Florestas são o ecossistema terrestre dominante na Terra, cobrindo cerca de 4,03 bilhões de hectares, o que significa aproximadamente 30% da área terrestre total do planeta (PAN *et al.*, 2013). Elas contribuem para a biodiversidade e fornecem inumeráveis bens e serviços ambientais, sendo responsáveis pela sustentação de imensa variedade de indústrias, empregos e renda em todo o mundo (FAO, 2015).

As espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, sendo a madeira do tronco utilizada como matéria-prima para a produção de celulose e madeira, devido à sua rápida taxa de crescimento, à adaptação a várias condições ecológicas e pela boa qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). Nativa da Austrália, a planta está distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais, contando até o momento com cerca de 700 espécies descritas (HUDSON *et al.*, 2015). Em muitos países, é a escolha para geração de bioenergia (BAUHUS *et al.*, 2010).

As espécies de *Eucalyptus* mostram alta diversidade de genes para metabólitos especializados, como terpenos, que atuam como defensivos químicos (MYBURG *et al.*, 2014). Espécies desse gênero apresentam ainda grande

diversidade e altas concentrações de óleos de importância ecológica e médica (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009), e, em razão da grande relevância dessa planta, o genoma de *Eucalyptus grandis* foi recentemente sequenciado (MYBURG *et al.*, 2014). Pela importância econômica que apresentam, as espécies de eucalipto são muito utilizadas em estudos de melhoramento genético (HUDSON *et al.*, 2015).

No Brasil, 72% dos 7,6 milhões de hectares de florestas plantadas são eucalipto e pinus. A maioria dessa área (54,2%) está concentrada na região sudeste, sendo Minas Gerais o estado que mais contribui para essa atividade. A maior concentração dos plantios nas regiões Sul e Sudeste do país é justificada pela localização das principais indústrias de papel e celulose, de painéis de madeira, siderurgia a carvão vegetal e madeira processada mecanicamente (IBA, 2014).

O significado social e econômico do setor florestal em 2013 pode ser avaliado pelo número de empregos gerados, mais de 4,4 milhões, pelos 6,4 bilhões de reais obtidos com os produtos exportados e pela contribuição para o Produto Interno Bruto de cerca de 56 bilhões de reais, além de 8,8 bilhões de dólares em impostos arrecadados (IBA, 2014).

A produtividade das áreas plantadas é garantida com a utilização de fertilizantes, os quais mantêm ou restauram a fertilidade dos solos, aumentando o rendimento e a qualidade das plantas cultivadas. O manejo tem sido progressivamente melhorado para reduzir custos e impactos negativos ao ambiente. O plantio de eucalipto é realizado em áreas onde os solos são ácidos, havendo necessidade de adição de quantidades significativas de nutrientes. Entretanto, essa planta apresenta baixa resposta à adubação nitrogenada (GAMA-RODRIGUES *et al.*, 2005).

A propagação clonal de eucalipto por miniestaquia alia a qualidade da muda à redução dos custos da produção. Com essa metodologia obtém-se melhor desempenho de enraizamento, sistema radicular com maior qualidade, maior velocidade de emissão das raízes e redução das atividades operacionais (HOPPE *et al.*, 2004). Após o enraizamento em casa de vegetação, por cerca de 30 dias, as mudas são transferidas para aclimação em casa de sombra, com 50% de incidência de luz, por um período de aproximadamente 10 dias. Nessa etapa, geralmente as plantas recebem uma dose de fertilizante NPK 5-17-3 de 0,25 g/muda. Após esse período, as plantas sem brotos são colocadas a pleno sol para rustificação, sem a utilização de qualquer defensivo agrícola, a menos que haja incidência de doenças, fato que raramente ocorre. Nessa fase, a umidade deve ser

controlada de acordo com o teor de água do substrato. Posteriormente, as mudas são classificadas de acordo com porte apresentado (pequeno, médio e grande) e preparadas para envio ao plantio, sempre considerando o tamanho médio do lote de mudas (HOPPE *et al.*, 2004).

Comunidades microbianas distintas vivem no interior de raízes, folhas e outras partes da planta. Essas interações proporcionam às plantas acesso a nutrientes e auxílio na supressão de doenças, sendo importantes na agricultura (SMITH, 2014). O estudo das comunidades microbianas pode, portanto, contribuir para compreender sua relação com a adaptabilidade do eucalipto a vários ambientes, com sua sanidade e o desenvolvimento dessa planta.

Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto

Endofíticos estão em interação com várias espécies de plantas e compõem a comunidade microbiana de várias espécies de eucalipto (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Esses micro-organismos têm potencial para reduzir a incidência de doenças (CLARKE *et al.*, 2006) e aumentar a produtividade (PAZ *et al.*, 2012), o que pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

A comunidade e a densidade bacteriana endofítica em eucalipto variam de acordo com o órgão e a localização na planta, a área geográfica do cultivo, as condições ambientais, a espécie e o genótipo da planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). As comunidades endofíticas bacterianas em eucalipto reportadas até o momento são compostas por *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia* e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* em raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010). Essa comunidade distinta pode ser transferida das sementes para as mudas e, quando inoculados em sementes ou em mudas, as características benéficas dos micro-organismos podem ser expressas no hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2008).

Árvores tropicais sustentam grande abundância de fungos endofíticos em suas folhas. Essa comunidade fúngica presente (ARNOLD, 2005) afeta a estrutura e a diversidade dos organismos associados às plantas, além da sua adaptabilidade

e evolução (OMACINI *et al.*, 2001). À semelhança do que ocorre em outras plantas, fungos endofíticos também se associam ao eucalipto, e a diversidade deles nessa planta mostra dominância de Ascomycota (KEMLER *et al.*, 2013). Essa interação parece ser dependente da espécie de planta (LUPO *et al.*, 2001; KHARWAR *et al.*, 2010) e do local do cultivo (FISHER *et al.*, 1993). Muitos deles são antagonistas a diversos patógenos (KHARWAR *et al.*, 2010), pela produção de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (SATHISH *et al.*, 2012). A produção desses compostos por esses micro-organismos pode proporcionar maior capacidade competitiva no interior da planta.

A colonização de fungos endofíticos ocorre mais frequentemente pela penetração das hifas de fungos epifíticos na superfície da planta, seguida pela adaptação ao novo habitat (KHARWAR *et al.*, 2010). Entretanto, nem todos epifíticos podem adentrar a planta, modificar o metabolismo e adaptar-se a esse habitat (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação da comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é geralmente baseada em metodologias dependentes de cultivo (FISHER *et al.*, 1993; LUPO *et al.*, 2001), que subestimam a diversidade desses micro-organismos. Abordagens metagenômicas se fazem necessárias a fim de se elucidar a presença de representantes mais raros presentes nessa comunidade.

Para se compreender como a comunidade microbiana endofítica do eucalipto pode afetar a adaptabilidade a vários ambientes, a sanidade e o desenvolvimento, a avaliação da diversidade de endofíticos é etapa importante. Entretanto, pouco é conhecido sobre esse aspecto em eucalipto, sendo que a maioria dos relatos enfatiza o isolamento desses micro-organismos. Portanto, torna-se necessária a investigação desses micro-organismos em outras partes da planta, bem como em outras áreas de cultivo, e a utilização de metodologia independente de cultivo para melhor elucidar a dinâmica dessa interação.

O sequenciamento de nova geração através das diversas plataformas disponíveis permite a maior cobertura de uma amostra individual. Essa maior cobertura aumenta a possibilidade de detecção de maior número de representantes de filos microbianos, o que é de extrema importância em estudos ecológicos (SIQUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2012). Os avanços das técnicas moleculares como RT-PCR e RNA-Seq (VARGAS *et al.*, 2014) permitem o estudo da expressão de genes envolvidos na fixação de nitrogênio e síntese de hormônios de crescimento vegetal (BRUTO *et al.*, 2014; VARGAS *et al.*, 2014). Com essas técnicas é possível a investigação simultânea do perfil de transcrição de vários genes da planta e do

hospedeiro (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2013). Assim, é possível realizar uma análise detalhada do perfil de genes dos micro-organismos e das modificações que ocorrem na planta em resposta a mudanças ambientais ou a condições impostas (BERTHRONG *et al.*, 2009). Esses avanços, aliados ao estudo da diversidade dos micro-organismos por sequenciamento de genes extraídos de diferentes partes do sistema solo-planta, suportam a ideia de que micro-organismos endofíticos podem ser alternativa para se melhorar a aquisição de nutrientes em plantas importantes, como eucalipto, aumentando a produtividade da planta e sustentabilidade do processo de produção.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. O., VITORINO, A. C. T., MERCANTE, F. M & OLIVARES, F. L. Biological nitrogen fixation by diazotrophic bacteria in association with grasses of economic importance. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 2898-2903, 2014.
- ARNOLD, A. E. 2005. **Diversity and Ecology of fungal endophytes in tropical forests**. Current Trends in Mycological Research (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.
- BACON, C. W & HINTON, D. M. **Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility**. In: GNANAMANICKAM, S. S. 1 ed. Plant-Associated Bacteria. Netherlands: Springer. 2007, p. 155-195.
- BARAC, T., TAGHAVI, S., BORREMANS, B., PROVOOST, A., OEYEN, L., COLPAERT, J. V., VANGRONVELD, J & VAN DER LELIEL, D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water- soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**. v. 22, p. 583–588, 2004.
- BAUHUS, J., VAN DER MEER, P., KANNINEN, M (Ed.). **Ecosystem goods and services from plantation forests**. Routledge, 2010.
- BERTHRONG, S. T., SCHADT, C. W., PINEIRO, G & JACKSON, R. B. Afforestation alters the composition of functional genes in soil and biogeochemical processes in South American grasslands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6240-6248, 2009.
- BOCHNER, B. R. Global phenotypic characterization of bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p.191–205, 2009.
- BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F & SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.
- BRUTO, M., PRIGENT-COMBARET, C., MULLER, D & MOËNNE-LOCCOZ, Y. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-

- promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-10, 2014.
- BULGARELLI, D., SCHLAEPPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.
- CAI, H., ARCHAMBAULT, M & PRESCOTT, J. F. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p. 465–469, 2003.
- CAMILIOS-NETO, D., BONATO, P., WASSEM, R., TADRA-SFEIR, M. Z., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., VALDAMERI, G., DONATTI, L., FAORO, S., WEISS, V. A., CHUBATSU, L. S., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M, Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, v. 15, p. 378, 2014.
- CARVALHO, T. L. G., BALSEMÃO-PIRES, E., SARAIVA, R. M., FERREIRA, P. C. G & HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 2014, p. 1-12, 2014a.
- CARVALHO, T. L. G., PIRES, E., SARAIVA, R., VARGAS, L., BOMFIM, A. C. J., BALLESTEROS, H & HEMERLY, A. S. Nitrogen fixation in grasses-gluconacetobacter activates genes in sugarcane. **BMC Proceedings**, v. 8, p. –20, 2014b.
- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CHEEWANGKON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**. V. 23, p. 55-85, 2009.
- CHI, F., SHEN, S. H., CHENG, H. P., JING, Y. X., YANNI, Y. G., DAZZO, F. B, Ascending migration of endophytic Rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7271-7278, 2005.
- CLARKE, B. B., WHITE JR, J. F., HURLEY, R. H., TORRES, M. S., SUN, S & HUFF, D. R. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. **Plant Disease**, v. 90, p. 994-998, 2006.
- COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT C & AIT BARKA, E. 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, 2005.
- COMPANT, S., CLÉMENT, C & SESSITSCH, A, Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization,

mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

DAVID, V., TERRAT, S., HERZINE, K., CLAISSE, O., ROUSSEAU, S., TOURDOT-MARÉCHAL, R & ALEXANDRE, H. High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 811-821, 2014.

DESHMUKH, S., HÜCKELHOVEN, R., SCHÄFER, P., IMANI, J., SHARMA, M., WEISS, M & KOGEL, K. H. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 18450-18457, 2006.

DESHMUKH, S. K., VEREKAR, S. A & BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-43, 2014.

DÖRR, J., T., HUREK & B. REINHOLD-HUREK. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 7-17, 1998.

DRANCOURT, M., BOLLET, C., CARLIOZ, A., MARTELIN, R., GAYRAL, J. P & RAOULT, D. 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3623–3630, 2000.

ERNST, M., MENDGEN, K. W & WIRSEL, S. G. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 580-587, 2003

FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.

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

FISHER, P. J.; PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, p. 338-345, 1993.

FOUNTS, D. E., TYLER, H. L., DEBOY, R. T., DAUGHERTY, S., REN, Q., BADGER, J. H., DURKIN, A. S., HUOT, H., SHRIVASTAVA, S., KOTHARI, S., DODSON, R. J., MOHAUD, Y., KHOURI, H., ROESCH, L. F. W., KROGFELT, K. A., STRUVE, C., TRIPLETT, E. W & METHE, B. A. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella*

- pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 7, p. 1-18, 2008.
- FRIESEN, M. L., PORTER, S. S., STARK, S. C., VON WETTBERG, E. J., SACHS, J. L. & MARTINEZ-ROMERO, E. Microbially mediated plant functional traits. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 23-46, 2011.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S. & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAMA-RODRIGUES, E. D., BARROS, N. D., GAMA-RODRIGUES, A. D. & SANTOS, G. D. A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 893-901, 2005.
- GAO, X. X., ZHOU, H., XU, D. Y., YU, C. H., CHEN, Y. Q., & QU, L. H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology letters**, v. 249, p. 255-266, 2005.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HARDOIM, P. R., HARDOIM, C. C., VAN OVERBEEK, L. S. & VAN ELSAS, J. D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS One**, v. 7, p. e30438, 2012.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HESHAM, A. E. L., WAMBUI, V., JO, H. O & MAINA, J. M. Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8 S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, p. 37-43, 2014.
- HILL, G. T., MITKOWSKI, A., ALDRICH-WOLFE, L., EMELEA, L. R., JURKONIE, D. D., FICKE, A., MALDONADO-RAMIREZA, S., LYNCHA, S. T & NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 25–36, 2000.
- HOFFMAN, M. T., GUNATILAKA, M. K., WIJERATNE, K., GUNATILAKA, L., & ARNOLD, A. E. Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. **PloS one**, v. 8, p. e73132, 2013.
- HOPPE, J. M., & BRUN, E. (2004). Produção de sementes e mudas florestais. Caderno didático, v.1, 388p.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N: Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**. v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUDSON, C. J., FREEMAN, J. S., MYBURG, A. A., POTTS, B. M & VAILLANCOURT, R. E. Genomic patterns of species diversity and divergence in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, v. 2015, p. 1-15, 2015.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- JACKSON, C. R.; RANDOLPH, K. C.; OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- JANDA, J. M & ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2761–2764, 2007.
- JORGE, T. F., RODRIGUES, J. A., CALDANA, C., SCHMIDT, R., VAN DONGEN, J. T., THOMAS-OATES, J & ANTÓNIO, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: metabolite responses to abiotic stress. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 2015, p. 1-30, 2015.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHAN, A. L., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., JUNG, H. Y., LEE, J. H & LEE, I. J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-14, 2012.
- KHARWAR R. N., GOND S. K., KUMAR A & MISHRA A. A. Comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KIRK, J., BEAUDETE, L., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIROMONOS, J., LEE, H & TREVORS, J. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.

- MAGNANI, G. S., DIDONET, C. M., CRUZ, L. M., PICHETH, C. F., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Journal Genetics and Molecular Research**, v. 9, n.1, p.250-258, 2010.
- MALHOTRA, M & SRIVASTAVA, S. Stree-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 73–80, 2009.
- MIGNARD, J. P & FLANDROIS, S. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 574–581, 2006.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffee canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- MYBURG, A. A., GRATTAPAGLIA, D., TUSKAN, G. A., HELLSTEN, U., HAYES, R. D., GRIMWOOD, J *et al.* The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-362, 2014.
- NAGABHYRU, P., DINKINS, R. D., WOOD, C. L., BACON, C. W., & SCHARDL, C. L. Tall fescue endophyte effects on tolerance to water-deficit stress. **BMC Plant Biology**, v. 13, p.127, 2013.
- NILSSON, R. H., KRISTIANSSON, E., RYBERG, M., HALLENBERG, N., & LARSSON, K. H. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics online**, v. 4, p. 193, 2008.
- NUTARATAT, P., SRISUK, N., ARUNRATTIYAKORN, P & LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-694, 2014.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, p. 78-81, 2001.
- PAIVA, J. A.; PRAT, E.; VAUTRIN, S.; SANTOS, M. D.; SAN-CLEMENTE, H.; BROMMONSCHENKEL, S.; FONSECA, P. G. S.; GRATTAPAGLIA, D.; SONG, X.; AMMIRAJU, J. S. S.; KUDRNA, D. WING, R. A.; FREITAS, A. T.; BERGÈS, H.; PETTENATI, J. G & GRIMA-PETTENATI, J. Advancing *Eucalyptus* genomics: identification and sequencing of lignin biosynthesis

- genes from deep-coverage BAC libraries. **BM Genomics**, v. 12, p. 1-13, 2011.
- PAN, Y., BIRDSEY, R. A., PHILLIPS, O. L & JACKSON, R. B. The structure, distribution, and biomass of the world's forests. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 44, p. 593-622, 2013.
- PAZ, I. C. P., SANTIN, R. C. M., GUIMARÃES, A. M., ROSA, O. P. P., DIAS, A. C. F., QUECINE, M. C & MATSUMURA, A. T. S. *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 11, p. 3711-3720, 2012.
- PHILIPPOT, L., RAAIJMAKERS, J. M., LEMANCEAU, P & VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789-799, 2013.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T, Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, p. 14:435–443, 2011.
- RINCON-FLOREZ, V. A., CARVALHAIS, L. C & SCHENK, P. M. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. **Diversity**, v. 5, p. 581-612, 2013.
- RODRIGUEZ, R. J., WHITE JR, J. F., ARNOLD, A. E & REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 82, p. 314e330, 2009.
- ROSENBLUETH, M & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.
- RYAN, R. P., GERMAINE, K., FRANKS, A., RYAN, D. J & DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SATHISH, L., PAVITHRA, N., & ANANDA, K. Antimicrobial activity and biodegrading enzymes of endophytic fungi from *Eucalyptus*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 2574, 2012.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against

- pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SHIOMI, H. F., SILVA, H. S. A., MELO, I. N. S., NUNES, F. V., BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, n.1, p.32-39, 2006.
- SICILIANO, S. D & GERMIDA, J.J. Biolog analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that *Pseudomonad* inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1717–1723, 1998.
- SIQUEIRA-JÚNIOR, J. F., FOUAD, A. F & RÔCAS, I. N. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, P. 1-15, 2012.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- SMITH, P. A. Foliage Friendships. **Scientific American**, v. 311, n. 2, p. 24-25, 2014.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. “Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards,” **Microbiology Today**, v.33, p. 152-155, 2006.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TAGHAVI, S., DER LELIE, D. V., HOFFMAN, A.; ZHANG, Y. B., WALLA, M. D.; VANGRONSVELD, J., NEWMAN, N & MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2010.
- TEMMERMAN, R., HUYS, G & SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.348–359, 2004.
- TUPPAD, D, S & SHISHUPALA, S. Evaluation of endophytic fungi from *Butea monosperma* for antimicrobial and enzyme activity. **Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 4, p. 38-45, 2014.
- TURNER, T. R.; JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.

- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., VOS, P., KERSTERS, K & SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407–438, 1996.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VARGAS, L., SANTA BRÍGIDA, A. B., MOTA FILHO, J. P., DE CARVALHO, T. G., ROJAS, C. A., VANEECHOUTTE, D.; VAN BEL, M.; FARRINELLI, L.; FERREIRA, P. C. G.; VANDEPOELE, K & HEMERLY, A. S. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PloS One**, v. 9, p. e114744, 2014.
- VEGA, F. E., PAVA-RIPOLL, M., POSADA, F & BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal Basic Microbiology**, v 45, p371–380, 2005.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209–216, 2010.
- WHITE, J. F & TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. **Physiologia Plantarum**, v. 138, 440-446, 2010.
- WOO, P. C. Y., LAU, S. K. P., TENG, J. L. L., TSE, H & YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p. 908-934, 2008.
- YOCKTENG, R., ALMEIDA, A. M., YEE, S., ANDRE, T., HILL, C & SPECHT, C. D. A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next-generation sequencing and gene expression analyses. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, p. 1300070, 2013.

CAPÍTULO 2

COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NAS FOLHAS E EXSUDATOS XILEMÁTICOS DE EUCALIPTO

RESUMO

As espécies de eucalipto estão entre as mais cultivadas e mais valorizadas economicamente em todo o mundo. No Brasil, apresentam grande importância ambiental e econômica pela geração de milhares de empregos e por ser alternativa à utilização de madeira de florestas nativas. Em ecossistemas florestais, a parte aérea das plantas é considerada habitat comum para vários micro-organismos, e a família Myrtaceae é fonte relevante de biodiversidade de fungos. Entretanto, muito pouco é conhecido sobre a diversidade e a distribuição da microbiota em folhas e exsudatos xilemáticos em eucalipto. O objetivo desse estudo foi mostrar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade. As folhas e os exsudatos xilemáticos foram coletados no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A diversidade foi obtida empregando-se extração de DNA, amplificação da subunidade rRNA 18S, DGGE e sequenciamento das bandas eluídas. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela localidade das plantas e pela sazonalidade entre as épocas de coleta. Mudanças observadas na distribuição dos grupos filogenéticos encontrados nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos indicam que a composição da comunidade endofítica em eucalipto é dependente da posição das folhas na copa das árvores e do local de cultivo. A análise filogenética mostrou a dominância dos filos Basidiomycota e Ascomycota nos ambientes estudados. Esse é o primeiro relato da presença de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos de uma planta.

Palavras-chave: diversidade, fungos endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

As espécies de eucalipto estão entre as mais utilizadas em florestas plantadas, em razão de suas características de crescimento, adaptabilidade a condições de clima e solo distintos e valor de sua madeira (FAO, 2015). A madeira do eucalipto pode ser utilizada de várias maneiras, incluindo a produção de papel e celulose, de painéis, de madeira processada mecanicamente e na siderurgia a carvão vegetal (IBA, 2013). Além disso, também pode fornecer fonte rentável de lignocelulose para a produção de energia e biocombustíveis avançados (ROCKWOOD *et al.*, 2008). No Brasil, as plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) apresentam crescimento uniforme e alta produção de celulose, características que impulsionaram o crescimento das florestas plantadas a partir da década de 1990 (IGLESIAS-TRABADO & WILSTERMANN, 2008).

As partes aéreas das plantas são habitat comum para vários micro-organismos (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015), sendo a interação com elas importante na manutenção do equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos, dos fluxos de gases e de outros processos determinantes no ecossistema (LINDOW & BRANDL, 2003). Assim, os significados agrônomo e ambiental dos micro-organismos que habitam a parte aérea da planta podem ser expressos na adaptabilidade de populações de plantas e também na qualidade e produtividade das culturas (TURNER *et al.*, 2013). Em escala global, a diversidade de fungos tem se mostrado maior em florestas tropicais, onde a diversidade de plantas terrestres também é maior; porém, a verdadeira escala de diversidade dos endofíticos associados ainda não é bem conhecida (LUO *et al.*, 2014).

Fungos endofíticos estão presentes nas plantas terrestres e são especialmente abundantes e diversos em folhas de várias árvores tropicais. Esses micro-organismos são considerados componentes importantes da biodiversidade em escala global (ARNOLD, 2005). A diversidade de fungos endofíticos na estrutura da comunidade fúngica pode afetar a adaptabilidade e evolução da planta no ambiente em que se encontra (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015).

A caracterização da comunidade microbiana associada às plantas do eucalipto em florestas comerciais brasileiras, além de contribuir para o conhecimento da interação planta-micro-organismo, é de suma importância quando se pretende maximizar a produtividade e o manejo de uma cultura de grande expressão para a economia do país. A maioria dos trabalhos sobre a diversidade de fungos endofíticos têm sido realizados com métodos dependentes de cultivo desses

micro-organismos, o que permite acesso a apenas uma pequena fração dessa diversidade (TORSVIK & OVREAS, 2002). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos e proporcionado novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição e a diversidade da comunidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

As duas áreas de estudo foram as florestas plantadas com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) situadas nos municípios de Catas Altas (Área 1 – Projeto Catas Altas I) e Santa Bárbara (Área 2 – Projeto Serra do Pinho), Minas Gerais, Brasil, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A floresta correspondente a Catas Altas está no sétimo ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1970, e a de Santa Bárbara está no terceiro ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1989. A produtividade média das duas áreas é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos (Tabela 1) e os solos são altamente intemperizados, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o Latossolo Amarelo.

Tabela 1: Georreferenciamento das áreas das florestas plantadas de eucalipto, classe de solo predominante, ano do primeiro plantio e produtividade média da floresta (m³ ha⁻¹)/rotação.

Área/ Projeto	Latitude (w)	Longitude (s)	Altitude (m)	Classe Solo	Implantação/ plantio de eucalipto	Produtividade (m ³ ha ⁻¹)/ rotação
I (Catas Altas)	43° 24' 54"	19° 57' 32"	750	LAd1	1970	340
II (Serra do Pinho)	43° 24' 28"	20° 4' 30"	750	LAW2	1989	340

A vegetação natural dessas áreas era de floresta estacional semidecidual, a qual foi substituída pela cultura do café e por pastagens, respectivamente. Posteriormente, áreas de floresta nativa e extensas áreas de pastagens, em sua maioria compostas por áreas degradadas, foram ocupadas com a cultura do eucalipto (CENIBRA). A idade das plantas à época da amostragem era de 18 meses em Catas Altas (área 1) e de 72 meses em Santa Bárbara (área 2).

Nas duas áreas, o clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão (Tabela 2). As médias de temperaturas máxima, média e mínima nos últimos anos foram de 26,4; 16,9 e 21,6°C, respectivamente, a umidade relativa de 67% e a precipitação e o déficit hídrico de 122,9 e 15,3 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Tabela 2: Histórico de precipitação na região estudada (Catás Altas/Santa Bárbara).

Ano	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
-----mm ³ -----												
2011	243	123,4	329,5	93,7	21,3	8,9	1,8	1	8,9	231,4	431	664,2
2012	328,3	28,7	166,1	21,8	138,6	16,5	0	5,3	36,8	-	-	-

Amostragem

Após o corte de uma árvore de cada área avaliada, foram coletadas amostras de exsudato xilemático e de folhas em terços equidistantes da copa (superior, médio e inferior). As coletas foram realizadas no início do período chuvoso (outubro de 2011), no período chuvoso (dezembro de 2012) e no período seco (abril de 2012). Cerca de 50 folhas sem sintomas de doenças (150 g) dos terços superior, médio e inferior da parte da copa foram coletadas separadamente. O exsudato xilemático foi coletado após o corte do tronco da árvore em porções de aproximadamente 1 m de comprimento, utilizando motosserra desinfestada em álcool 70%. Após 30 segundos de exsudação, o líquido foi coletado em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL. As amostras foram acondicionadas em caixa contendo gelo para o transporte ao Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. No LEM, as amostras foram estocadas em freezer a - 20°C por cerca de um mês até o processamento.

Descontaminação superficial das folhas de eucalipto

A descontaminação superficial de oito folhas saudáveis provenientes de cada terço das copas das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato ($0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, e individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Aliquotas de 100 μL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas e exsudatos xilemáticos

As folhas amostradas de cada terço das copas que se mostraram superficialmente esterilizadas após a incubação em meio R2A foram maceradas em nitrogênio líquido, e o macerado, transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL. Aos eppendorfs contendo as amostras maceradas foram adicionados tampão de extração composto de [(2% (p/v) brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), $1,4 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl, 20 mmol.L^{-1} EDTA, 100 mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH 8,0 e 1g de polivinilpirrolidona e 0,2% (v/v) de β -mercaptoethanol]. As amostras de exsudatos xilemáticos foram inicialmente homogeneizadas em vórtex e uma alíquota de 500 μL transferida para tubos de polipropileno com capacidade para 2 mL. Aos tubos foram adicionados 1000 μL de tampão de extração, 0,5 g de *beads* de 106 μm , 50 μL de SDS 4% (dodecil sulfato de sódio) e 400 μL de fenol-clorofórmio (1:24). A mistura foi submetida a agitação em homogeneizador por 10 min, e colocada em banho-maria a 60°C durante 10 min. Os tubos foram centrifugados a $15000g$, e o sobrenadante, transferido para tubos contendo 400 μL de fenol-clorofórmio, seguindo-se nova centrifugação a $15000g$ por 5 min. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 0,6 volumes de isopropanol, seguindo-se a centrifugação a $15000g$ por 20 min. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% e ressuspensionado em 100 μL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram

comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc).

Análise da diversidade de fungos endofíticos

Para se examinar a diversidade de fungos endofíticos de folhas e exsudatos xilemáticos foram utilizadas a DGGE e a estratégia Nested-PCR. Para isso, em uma primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram utilizados para a primeira reação. Os fragmentos gerados foram utilizados como molde para uma segunda PCR, e a região V7-V8 foi amplificada utilizando-se os *primers* FF390 (VAINIO & HANTULA, 2000) e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000), contendo grampo GC incorporado à região *forward* desse oligonucleotídeo.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µM de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 µM do *primer* NS1, 0,16 µmol do *primer* EF3, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72° C e extensão final a 72°C durante 10 min. A segunda PCR foi realizada utilizando-se 1,0 µL da primeira reação como molde e substituição dos *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC. Nessa reação, as condições foram: desnaturação inicial a 94° C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50° C por 1 min, extensão por 1 min a 72° C e extensão final a 72°C durante 10 min.

Os *amplicons* resultantes foram submetidos a DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermophilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo, para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8% (p/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma), em gel com gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ de Tris–HCl, pH 8 e 20 mmol·L⁻¹ de ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ de EDTA,

pH 8,0), 0,09% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina) e 0,7% (p/v) de persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ de ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis foram registradas sob luz UV (300 nm) utilizando um equipamento Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise da comunidade fúngica endofítica, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, eluídas em tubos de polipropileno contendo 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos a 4°C *overnight*. Uma alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1 (sem o grampo GC). Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência foi realizada busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando-se o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença de uma banda correspondente a uma unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de diversidade foram realizadas utilizando-se o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software SigmaPlot 13.0.

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank* utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97% foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S obtidas no NCBI, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados

manualmente e o cálculo para análise filogenética baseada no alinhamento dessas sequências foi feito pelo Método de *Neighbor Joining*. A robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram determinados pela análise de *bootstrap* com 1000 réplicas, e os valores acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

O protocolo de extração de DNA e a amplificação do gene rRNA 18S resultaram em *amplicons* e migração distintos no perfil eletroforético, comprovando a eficiência para acessar a diversidade de fungos endofíticos por DGGE em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2).

O perfil eletroforético na DGGE mostrou bandas mais intensas na mesma posição relativa e número expressivo de UTOs detectadas nas folhas analisadas. A presença de UTOs de menor e maior intensidade é um indicativo de que a Nested-PCR propiciou a resolução necessária às análises de diversidade (Figuras 1 e 2). Os fragmentos de DNAs nas bandas excisadas em diferentes posições do gel da DGGE foram identificados como de membros pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota. Embora outros autores não tenham obtido resultados satisfatórios com a utilização da técnica de excisão de bandas (LIANG *et al.*, 2008), essa estratégia foi bem sucedida no acesso à diversidade de fungos endofíticos de eucalipto no presente trabalho (Figuras 1 e 2).

A análise dos fragmentos do gene rRNA 18S de fungos presentes em folhas e nos exsudatos xilemáticos revelou uma comunidade fúngica distinta, de acordo com as áreas de cultivo. O número e a densidade das bandas de fungos no gel dos exsudatos xilemáticos foram menores em relação aos das folhas, embora nas duas áreas avaliadas, a similaridade delas seja pouco mais de 30% e com o perfil distinto (Figuras 1, 2 e 3). A DGGE permitiu discriminar diferenças entre as comunidades endofíticas em eucalipto cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 2).

Nas folhas de eucalipto coletadas na região de Catas Altas, a análise por UPGMA gerou cinco grupos distintos, sendo o maior valor de similaridade (52,3%) o correspondente à coleta realizada no início do período chuvoso em folhas da parte inferior da copa da árvore (Figura 3A). A maior similaridade encontrada na região de Santa Bárbara foi 55,3%, em período seco, também na parte inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs (23 e 22) nas folhas de eucalipto independe do período de coleta. Outras UTOs exibem flutuações entre os períodos

de coleta, a exemplo da maior incidência de UTOs específicas no período chuvoso em Catas Altas, enquanto na localidade de Santa Bárbara esse fato se deu no período seco (Figura 4).

Os índices de diversidade de Shannon em Catas Altas variaram entre 2,56 a 3,02, e os de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3). Em Santa Bárbara, essa variação foi menor, com índices de diversidade entre 2,09 e 2,4, e de riqueza, entre 7,5 e 11,3 (Tabela 4). Já os índices de Shannon nos exsudatos xilêmáticos variaram entre 1,8 e 2,5, e os de riqueza, entre 6 e 16 (Figura 2).

A comunidade de fungos endofíticos em folhas de eucalipto na região de Catas Altas é distinta com relação à posição das folhas na copa da árvore e entre os períodos chuvoso e seco. Essa distinção indica que a colonização ou a permanência das espécies de fungos é influenciada pela posição das folhas e pela sazonalidade. Nessa área foram identificadas 14 espécies, sendo o maior número delas encontrado no início do período chuvoso (Tabela 5).

A comunidade endofítica das folhas de Santa Bárbara é composta por sete espécies (Tabela 6), que em sua maioria são as mesmas que as encontradas em Catas Altas (Tabela 6). Entretanto, *Anomoloma albolutescens*, *Rhodotarzetta rosea* e *Rizoctonia solani* foram exclusivas de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6).

A posição das folhas e a sazonalidade influenciaram mais a composição da comunidade de fungos endofíticos de Catas Altas que a de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6). Em Catas Altas, a maior prevalência de endofíticos foi encontrada no início do período chuvoso (Tabela 5), e em Santa Bárbara, no período chuvoso (Tabela 6). Nessa área, das espécies fúngicas identificadas por sequenciamento, apenas *Boletus rubropunctus* foi encontrada em mais de um terço da copa da árvore e em mais de uma época de coleta (Tabela 6). Em eucalipto, existem diferenças na colonização e na persistência de fungos endofíticos em relação à sazonalidade (Tabelas 5 e 6).

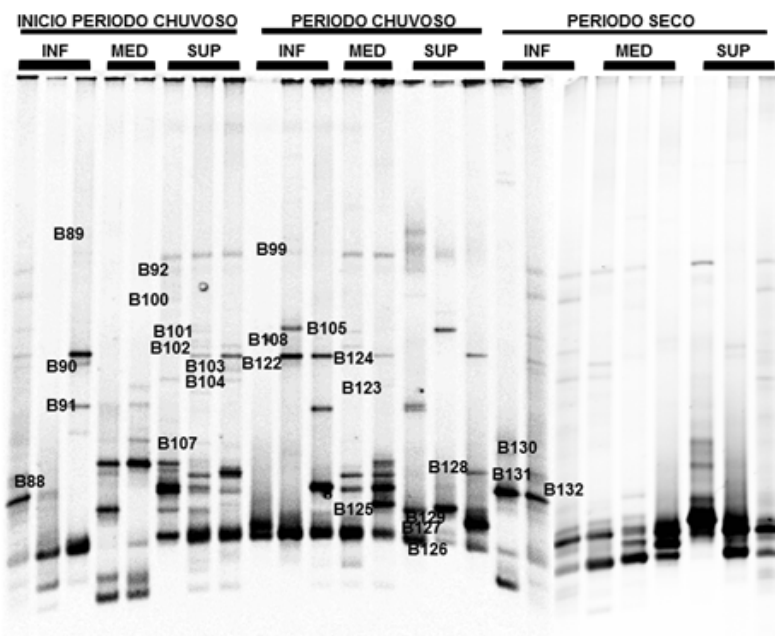
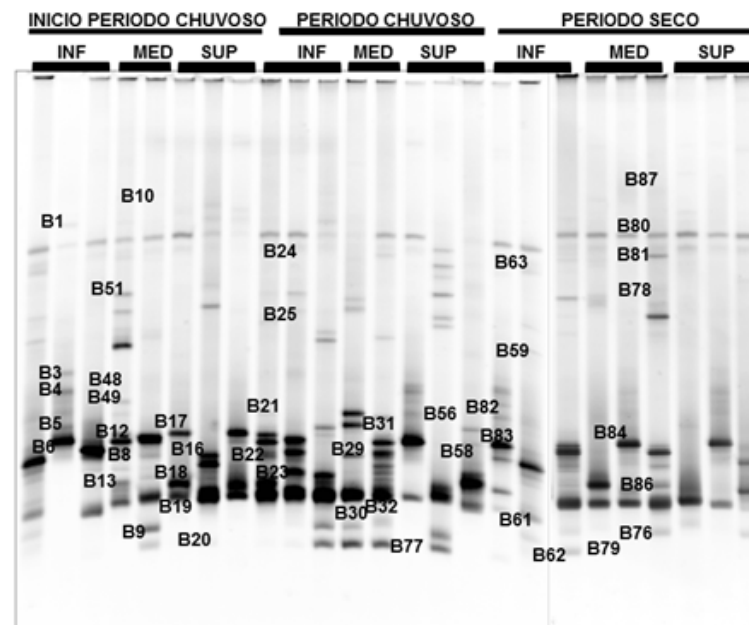
A**B**

Figura 1: Perfis eletroforéticos de DGGE da comunidade de fungos endofíticos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior (em triplicata) da copa das árvores de eucalipto cultivadas em áreas distintas: (A) - Árvores com 18 meses de idade cultivadas no município de Catas Altas, (B) – Árvores com 72 meses de idade cultivadas no município de Santa Bárbara. INF: folhas do terço inferior da copa da árvore; MED: folhas do terço médio da copa da árvore; SUP: folhas do terço superior da copa da árvore. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso; período chuvoso e período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas.

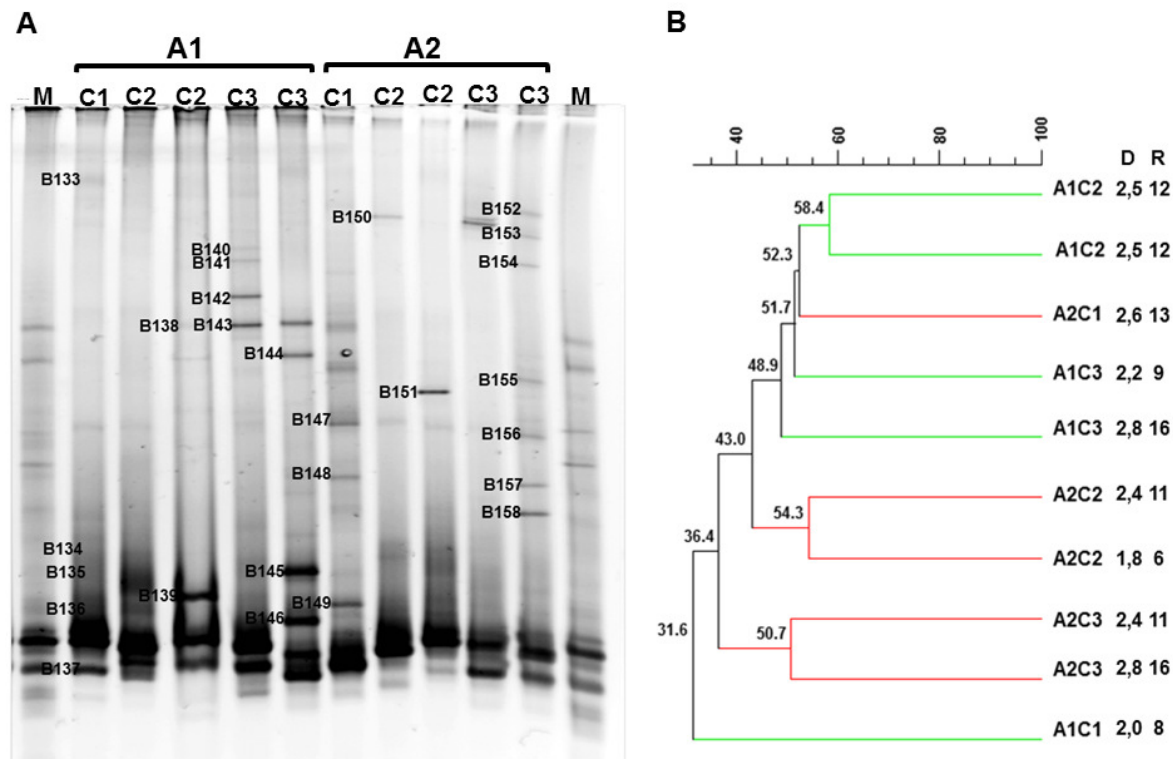


Figura 2: (A) - Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos extraídos dos exsudatos xilêmáticos de eucalipto em áreas distintas. A1 - Árvores com 18 meses de idade, cultivadas no município de Catas Altas. A2 – Árvores com 72 meses de idade, cultivadas no município de Santa Bárbara. M: marcador; C1: coleta realizada no início do período chuvoso; C2: coleta realizada no período chuvoso; C3: coleta realizada no período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas. (B) Análise de agrupamento a partir do perfil eletroforético da DGGE e índices de diversidade de Shannon (D) e Riqueza (R) das amostras de exsudatos xilêmáticos.

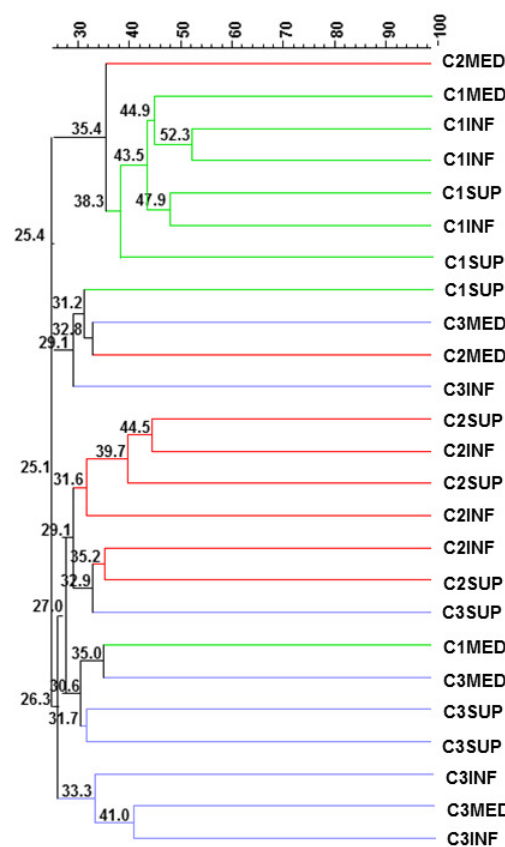
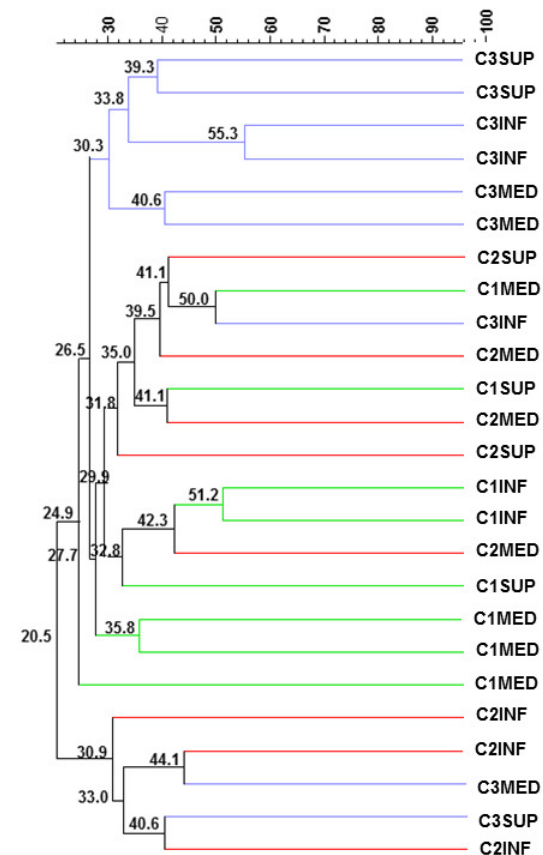
A**B**

Figura 3: Análise de agrupamento e índices de similaridades obtidos a partir do perfil eletroforético da DGGE das amostras de fungos endofíticos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto cultivadas em A - Catas Altas (árvores com 18 meses de idade) e em B - Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade). C1 – Coleta 1 (início do período chuvoso); C2 – Coleta 2 (período chuvoso); C3 – Coleta 3 (período seco). INF – parte inferior da copa; MED – parte média da copa; SUP – parte superior da copa.

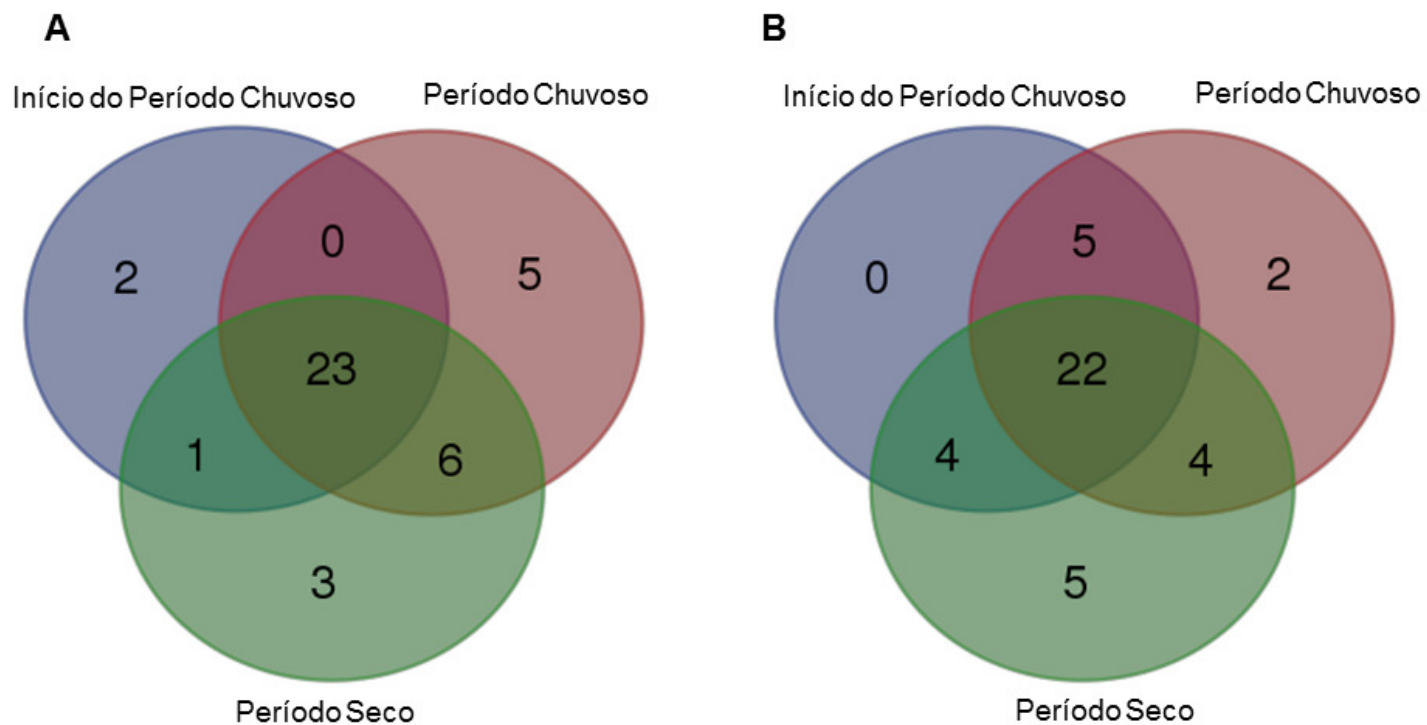


Figura 4: Distribuição de UTOs pelo diagrama de Venn em folhas de eucalipto no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Catas Altas (árvores com 18 meses de idade). B – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade).

O sequenciamento dos *amplicons* a partir das bandas excisadas dos exsudatos xilemáticos mostrou a presença de oito espécies de fungos endofíticos nesse habitat (Tabela 7), sendo que a maioria delas foi identificada em Santa Bárbara. Entre os fungos endofíticos encontrados, apenas um deles, *Fusarium solani*, foi encontrado em folhas provenientes da região de Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* em Santa Bárbara. Entre as espécies encontradas, cinco são exclusivas de Santa Bárbara, uma de Catas Altas e duas são comuns às duas áreas, indicando que a interação endofítica em exsudatos xilemáticos é moldada pela sazonalidade (Tabela 7). Basidiomycota é o filo de fungo que predomina em folhas e exsudatos de eucalipto (Tabelas 5, 6 e 7). Até o momento, esse é o primeiro relato da presença de fungos em exsudatos xilemáticos.

A análise filogenética das sequências revelou que todas pertencem aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 5). A maioria dos agrupamentos formados apresentou valores de *bootstrap* acima de 70, os quais são considerados entre moderados e fortes, o que confere robustez à análise. Em Catas Altas, as bandas 1 (B1), 4 (B4), B8 (B8), 25 (B25), 62 (B62) e 87 (B87) formaram os agrupamentos com maior sustentação filogenética, com *bootstraps* maiores que 80, a maioria deles entre 98 e 100. Esses *bootstraps* são considerados fortes e proporcionaram robustez à análise filogenética.

As UTOs provenientes dos *amplicons* extraídos das bandas excisadas dos géis referentes às folhas coletadas na região de Santa Bárbara formaram os agrupamentos com maiores *bootstraps* para as bandas 99 (B99) e 101 (B101), com *bootstraps* de 97 e 99, respectivamente. As UTOs agruparam com alta sustentação filogenética e formaram dois clados distintos, ambos pertencentes ao filo Ascomycota. A sustentação da árvore filogenética é garantida pelo valor 99 do nó mais externo a ela (Figura 5), embora alguns dos valores de *bootstrap* sejam considerados moderados e baixos.

A análise filogenética para as bandas excisadas a partir de amostras de exsudatos xilemáticos também demonstrou *bootstrap*, em sua maioria, entre moderados a fortes, sustentados filogeneticamente pelo alto valor do nó mais externo. Nos exsudatos, as bandas que apresentaram maiores *bootstraps* foram a 144 (B144) e a 151 (B151) (Figura 5).

Tabela 3: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços superior, médio e inferior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior
Riqueza	17,3	15,5	15,7	13	19,5	15,7	18,3	21	16
Diversidade	2.84	2.73	2.75	2.56	2.89	2.75	2.9	3.02	2.76

Tabela 4: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Média	Superior
Riqueza	11,3	7,5	11	10	9,5	8,7	9,3	9,7	8,3
Diversidade	2,35	2,2	2,4	2,3	2,2	2,15	2,22	2,24	2,09

Tabela 5: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terço inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-Value</i>	Acesso/NCBI
Início do período chuvoso	Inferior	<i>Laetisaria fuciformis</i>	99	1 e ⁻¹⁵³	AY293139.1
		<i>Trametes versicolor</i>	99	1 e ⁻¹⁴³	KM222266.1
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	99	2 e ⁻¹⁵⁵	JQ698926.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	99	5 e ⁻¹⁴²	HQ832428.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	Médio	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832427.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Acidomyces acidothermus</i>	98	4 e ⁻¹³⁷	JQ172747.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Knufia petricola</i>	98	6 e ⁻¹³⁷	KC988739.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
Período Chuvoso	Inferior	<i>Aspergillus glaucus</i>	100	1 e ⁻¹⁵³	AY083218.1
	Médio	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Marasmius alliaceus</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	NG_013179.1
Período Seco	Inferior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Coniophora puteana</i>	95	48e ⁻¹¹⁵	GU187631.1
		<i>Sistotrema brinkmanni</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	KM232435.1
	Médio	<i>Coniophora puteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Microdochium nivale</i>	95	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Coniophora pauteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1

Tabela 6: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Início do período chuvoso	Médio	<i>Anomoloma albolutescens</i>	97	8e ⁻¹⁴⁵	GU187618.1
		<i>Malassezia restricta</i>	98	1e ⁻⁶⁰	AAYY01000016.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
Período Chuvoso		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
		<i>Rhodotarzetta rósea</i>	97	4e ⁻¹⁴⁷	DQ646550.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
	Superior	<i>Microdochium nivale</i>	97	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Rizoctonia solani</i>	97	1e ⁻¹⁴³	D85644.1
Período Seco	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1

Tabela 7: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S, nos exsudatos xilemáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente.

Coleta	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Catatas altas	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
Santa Bárbara	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Alloclavaria purpurea</i>	99	6e ⁻¹³¹	DQ437679.1
	<i>Wallemia sebi</i>	98	3e ⁻⁸⁰	KM582658.1
	<i>Coniophora puteana</i>	93	3e ⁻¹⁰⁸	GU187631.1
	<i>Boletus rubropunctus</i>	85	4e ⁻⁶²	FJ480426.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
	<i>Teratosphariacea sp.</i>	99	9e ⁻¹³⁴	GU250359.1

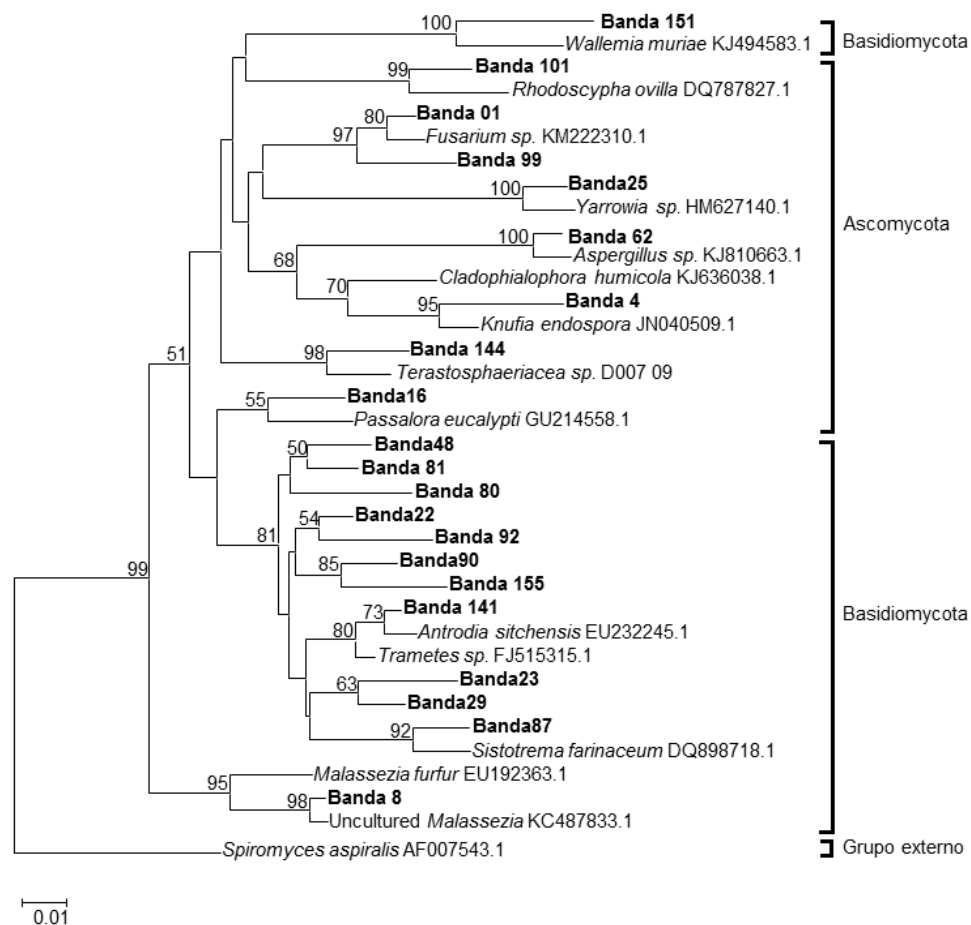


Figura 5: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos identificados em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto com 18 e 72 meses de idade cultivados em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos endofíticos na parte aérea de eucalipto determinada por Nested-PCR e DGGE, ao revelar número expressivo de UTOs, demonstrou ser apropriada para se avaliar a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2). Ressalte-se que esse método foi desenvolvido há mais de 20 anos (MUYZER *et al.*, 1993) e tem sido o de escolha em estudos de diversidade microbiana de vários ambientes, como no solo (BRESOLIN *et al.*, 2010), em plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e em animais (KITTELMANN *et al.*, 2012).

A abordagem Nested-PCR é a recomendada para facilitar a análise por DGGE de diferentes grupos microbianos em comunidades complexas, como, por exemplo, as de frutos de café (OLIVEIRA *et al.*, 2013), uma vez que também revela as populações menos abundantes.

A distribuição dos fungos endofíticos nos cinco grupos distintos gerados pela análise por UPGMA, em que o maior valor de similaridade (52,3%) foi o correspondente à coleta de folhas do terço inferior da copa da árvore no início do período chuvoso na região de Catas Altas. Tal fato indica a existência de mudança na composição da comunidade fúngica endofítica em função da sazonalidade e posição das folhas. Essa mudança é menos acentuada em folhas mais velhas da região de Santa Bárbara onde há menor número de clados distintos (Figura 3B). O maior valor de similaridade encontrado nessa área foi 55,3%, em período seco, no terço inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs nos três períodos de coleta das folhas de eucalipto (23 e 22) é similar; entretanto, existem UTOs específicas, as quais refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos endofíticos. Além disso, também exibem as flutuações dos períodos chuvoso e seco, a exemplo da maior incidência delas no período chuvoso em Catas Altas; ao contrário de Santa Bárbara, onde a maior incidência ocorreu no período seco (Figura 4).

As variações nos índices de diversidade de Shannon em Catas Altas, entre 2,56 a 3,02, e as de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3), e as de Santa Bárbara em que foram menores, com diversidade entre 2,09 a 2,4 e riqueza entre 7,5 a 11,3 (Tabela 4), foram interpretadas como indicativo de que os terços da copa da árvore e a sazonalidade são fatores que modificam a distribuição de UTOs (Figura 4). A diversidade de espécies é medida em termos de riqueza e uniformidade, e o índice mais comum e amplamente utilizado é o de Shannon-Wiener (H'); os valores usualmente encontrados estão entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Em

virtude disso, comunidades mais diversas tendem a apresentar maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2010), o que explica a discrepância encontrada nos índices de diversidade em folhas das localidades de Catas Altas e Santa Bárbara (Tabelas 3 e 4). Portanto, a sazonalidade molda a diversidade de fungos endofíticos em eucalipto, fato que pôde ser observado pela presença de UTOs comuns e específicas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 4 – Tabelas 3 e 4). A sazonalidade também pode de influenciar no ganho, na perda, na latência ou na manutenção de uma dada espécie microbiana na comunidade (Tabelas 3, 4 e 5). Embora o significado funcional dessas mudanças na estrutura da comunidade microbiana em função da sazonalidade não tenha sido demonstrado, alguns relatam que elas são influenciadas por fatores, como o antagonismo entre fungos, e por variáveis abióticas, que podem afetar a planta hospedeira e, assim, moldar a dinâmica da microbiota associada (GHIMIRE *et al.*, 2010).

A colonização endofítica é geralmente influenciada pela ontogenia das folhas (ARNOLD *et al.*, 2003). As variações na diversidade e na abundância observadas neste trabalho podem estar associadas com as propriedades nutricionais e de defesa em cada estágio de desenvolvimento desses órgãos (SANCHEZ-AZOFEIFA *et al.*, 2012). Entretanto, as diferenças na diversidade de fungos endofíticos entre as plantas de Catas Altas (mais juvenis) e as de Santa Bárbara (mais velhas), não podem ser atribuídas somente à idade das plantas. Outras variáveis, a exemplo dos ciclos de cultivo e rotação, dos teores de nutrientes e açúcares nas folhas e de outras características, podem, em conjunto, ter influenciado as diferenças entre os índices de diversidade nas duas áreas (Tabelas 5 e 6). Ciclos de cultivo e de rotação podem interferir na comunidade fúngica do solo (ELLOUZE *et al.*, 2014) e, conseqüentemente, na colonização endofítica, já que muitos dos micro-organismos endofíticos presentes em folhas são originários do solo (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009). Adicionalmente, outros fatores também podem contribuir para as diferenças das comunidades endofíticas, tais como mudanças na fisiologia das folhas e presença de substâncias químicas, a exemplo de compostos fenólicos que podem limitar a riqueza de espécies microbianas. Por serem esses compostos inibidores naturais da colonização fúngica, em especial de representantes do filo Ascomycota, como *Aspergillus* (BANSO & RAI, 2008) e *Fusarium* (KAUR *et al.*, 2011), esses compostos podem ter inibido a presença desses táxons nas plantas mais velhas de Santa Bárbara.

A presença de maior número de UTOs nos terços médio e inferior da copa de plantas da área de Santa Bárbara (Tabela 6) possivelmente resultou de condições abióticas mais favoráveis, como maior umidade e menor incidência de radiação ultravioleta. A quantidade e a qualidade da luz incidente nas folhas, pode ter contribuído para a menor frequência de fungos nos terços superiores da copa bem como para as diferenças observadas entre as árvores de Catas Altas e de Santa Bárbara. Na literatura, há relatos de que as condições de luminosidade podem diminuir a viabilidade de propágulos fúngicos ou causar efeitos deletérios em conídios, especialmente a radiação UV-B (ISAAC, 1995; ARNOLD & HERRE, 2003; POSADAS *et al.*, 2012).

As diferenças na distribuição de fungos endofíticos nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos (Tabelas 5, 6 e 7), pode indicar que a colonização endofítica seja dependente do local ou órgão da planta amostrado. As espécies *Pachylepyrium carbonicola* e *Malassezia restricta* (Tabela 5), presentes em Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* (Tabela 6), observado em Santa Bárbara, podem ocupar diferentes micro-habitats no corpo da planta, indicando comportamento mais generalista (Tabelas 5 e 6). É relatado na literatura que fatores como altitude, umidade, densidade da copa, entre outros fatores, podem influenciar o nível de infecção da planta (QI *et al.*, 2012). O fato de as folhas abrigarem mais espécies fúngicas endofíticas (Tabelas 5 e 6) do que os exsudatos xilemáticos (Tabela 7) pode ser atribuído às diferenças nas barreiras à infecção vigentes nesses dois locais, bem como a capacidade do xilema em selecionar os micro-organismos nesse ambiente (ARNOLD & LUTZONI, 2007).

Os principais colonizadores encontrados nesse estudo (Tabelas 5, 6 e 7) diferem dos encontrados em *Eucalyptus nitens* cultivados na Austrália e Inglaterra (FISHER *et al.*, 1993). Isso pode ser atribuído à espécie da planta e às condições ambientais distintas das do presente trabalho. Além disso, as diferenças encontradas na estrutura da comunidade fúngica endofítica em diferentes espécies de eucalipto podem estar relacionadas à estratégia metodológica utilizada, já que Fisher *et al.* (1993) utilizaram métodos dependente de cultivo. A diversidade de fungos endofíticos nos exsudatos xilemáticos de eucalipto é influenciada pelo local e pela sazonalidade (Tabela 7). Na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre diversidade de fungos em exsudatos xilemáticos de árvores de eucalipto de florestas plantadas. Os exsudatos xilemáticos apresentam compostos nitrogenados e ácidos orgânicos (PFAUTSCH *et al.*, 2009), além de açúcares como sacarose, frutose, glicose, galactose e arabinose em pequenas concentrações

(MATTIELLO *et al.*, 2009). Em razão dessa composição o xilema pode ser considerado como um habitat oligotrófico para o crescimento e desenvolvimento microbiano em várias plantas, incluindo eucalipto (YADETA & THOMMA, 2013).

Os fungos endofíticos mais frequentes observados em eucalipto cultivado em Catas Altas e Santa Bárbara foram *Fusarium solani*, *Malassezia restricta*, *Pachylepyrium carbonicola* e *Boletus rubropunctus* (Tabelas 5 e 6). A alta identidade das sequências obtidas com as do banco de dados do NCBI (Tabelas 5, 6 e 7) foi o critério utilizado para a confirmação dessas espécies como pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (Figura 5). Embora muitas delas sejam patogênicas para algumas plantas, no presente trabalho, mostraram-se como de natureza endofítica. Ressalte-se que a desinfestação da superfície de folhas sadias, sem sintomas de infecção, foi comprovada pela ausência de crescimento fúngico em R2A da última água de lavagem. A alta dominância de alguns grupos fúngicos (Tabelas 5, 6 e 7) é uma indicação de que eles possam ter papel relevante na fisiologia da planta. Espécies fúngicas podem produzir ampla variedade de reguladores de crescimento, como giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) e auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012) e também conferir tolerância a fatores bióticos e abióticos adversos (HUBBARD *et al.*, 2014).

Os fungos endofíticos presentes no xilema apresentaram altos *bootstraps* (Figura 5) e similaridade com aqueles que são geralmente encontrados no solo e nas folhas de eucalipto, fato que pode explicar a origem da colonização xilemática. Micro-organismos endofíticos podem colonizar a planta por meio de ferimentos, nos sítios de emergência de raízes laterais (HALLMAN *et al.*, 1997) ou pela liberação de enzimas hidrolíticas (ROBL *et al.*, 2013) que lhes permitem adentrar e colonizar a planta (HALLMAN *et al.*, 1997). Dentro da planta, os exsudatos xilemáticos podem funcionar como meio de transporte para a colonização endofítica, seguindo o fluxo ascendente da seiva do xilema. Tal fato pode explicar a ocorrência de *Fusarium solani* e *Marasmius alliaceus* em folhas e exsudatos xilemáticos de Catas Altas (Figuras 5 e 7) e *Boletus rubropunctus* em folhas e exsudatos de Santa Bárbara (Figuras 6 e 7).

As comunidades fúngicas nas folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto mostraram-se distintas uma da outra. Somente os fungos *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* estavam presentes nas duas comunidades (Tabelas 5, 6 e 7). As espécies de *Fusarium* são relatadas como as mais frequentemente isoladas como endofíticas em plantas tropicais (VEGA *et al.*, 2010). Fungos do gênero *Marasmius* são reconhecidos pela produção de

metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli* (ROSA *et al.*, 2003). Esse grupo já foi descrito como endofítico (NGIENG *et al.*, 2013). Entretanto, na literatura consultada, não foi encontrada relatos de endofitismo para a espécie *Marasmius alliaceus*. O gênero *Boletus* apresenta espécies descritas como endofítica em folhas de *Pinus* sp., (ARNOLD *et al.*, 2007). No entanto, a espécie *Boletus rubropunctus* é relatada aqui como endofítica pela primeira vez.

A presença de *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* nos exsudatos xilemáticos de eucalipto indica que esses micro-organismos podem ser transportados às folhas por meio do fluxo ascendente da seiva do xilema, após adentrarem a planta via raiz. A presença de fungos endofíticos em folhas e exsudatos aqui relatada amplia a compreensão da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de fungos endofíticos nessa importante espécie florestal é etapa importante para o acesso a esse patrimônio genético na busca de metabólitos e processos que possam contribuir para a melhoria no desenvolvimento da planta.

CONCLUSÕES

A DGGE foi eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade.

Os filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica endofítica em eucalipto.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilemáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W.; MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410. 1990.
- ARNOLD, A. E., HENK, D. A., EELLS, R. L., LUTZONI, F., & VILGALYS, R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v. 99, p. 185-206, 2007.

- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, 88, p. 541–549, 2007.
- BANSO, D. S & RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 81-88, 2008.
- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 391-403, 2010.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. (2014). Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- ELLOUZE, W., ESMAEILI TAHERI, A., BAINARD, L. D., YANG, C., BAZGHALEH, N., NAVARRO-BORRELL, A., HANSON, K & HAMEL, C. Soil fungal resources in annual cropping systems and their potential for management. **BioMed Research International**, 2014.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- FISHER, P. J., PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, p. 338-345, 1993.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 19-27, 2011.
- HALLMAN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** v. 4, p. 9, 2001.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUBRRARD, M., GERMIDA, J. J. & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 109-122, 2014.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- IGLESIAS-TRABADO, G & WILSTERMANN, D. *Eucalyptus universalis*. Global cultivated eucalypt forests map, 2008.
- ISAAC, S. Mycology Answers: Old papers, manuscripts and books often develop brown spots and patches; are these caused by fungi?. **Mycologist**, v. 9, n. 3, p. 138-139, 1995.
- KAUR, S., SINGH, H. P., BATISH, D. R & KOHLI, R. K. Chemical characterization and allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*. **Journal of Plant Interactions**. v. 6, p. 297-302, 2011.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) Suitable for Large-Scale Sequence-Based Community Structure Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LIANG, Z., DRIJBER, R. A., LEE, D. J., DWIEKAT, I. M., HARRIS, S. D & WEDIN, D. A. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 956-966, 2008.
- LINDOW, S. E & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875–1883, 2003.
- LUO, J., WALSH, E., NAIK, A., ZHUANG, W., ZHANG, K., CAI, L & ZHANG, N. Temperate pine barrens and tropical rain forests are both rich in undescribed fungi. **PloS One**, v. 9, p. e103753, 2013.
- MATTIELLO, E. M., RUIZ, H. A., SILVA, I. R. D., SARKIS, J. E. S., NEVES, J. C. L & PUCCI, M. M. Phloem mobility of boron in two eucalypt clones. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1695-1704, 2009.
- MAY, L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 829-841, 2001.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C & UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p.695–700, 1993.

- NGIENG, N. S., ZULKHARNAIN, A., ROSLAN, H. A., & HUSAINI, A. Decolourisation of synthetic dyes by endophytic fungal flora isolated from Senduduk plant (*Melastoma malabathricum*). **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PFAUTSCH, S., GESSLER, A., ADAMS, M. A & RENNENBERG, H. Using amino-nitrogen pools and fluxes to identify contributions of understory *Acacia* spp. overstory *Eucalyptus regnans* and stand nitrogen uptake in temperate Australia. **New Phytologist**, v. 183, p. 1097-1113, 2009.
- POSADAS J. B., MARICEL, A. L., MINI J. I & LECUONA R, E. Natural Tolerance to UV-B and Assessment of Photoprotectants in Conidia of Six Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Griv) Vuillemin. **World Applied Sciences Journal**, v. 20, p. 1024-1030, 2012.
- QI, F., JING, T & ZHAN, Y. Characterization of endophytic fungi from *Acer ginnala* Maxim. in an artificial plantation: media effect and tissue-dependent variation. **PLoS ONE**, v. 7, p. 46785-46785, 2012.
- REASONER, D. J & GELDREICH, E. E A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, p. 1-7, 1985.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C., VICENTE, V. A., PRADELLA, J. G. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v.13, p. 1-12, 2013.
- ROCKWOOD, D. L., RUDIE, A. W., RALPH, S. A., ZHU, J. Y & WINANDY, J. E. Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1361-1378, 2008.
- ROSA, L. H., MACHADO, K. M. G., JACOB, C. C., CAPELARI, M., ROSA, C. A., & ZANI, C. L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 967-974, 2003.
- SANCHEZ-AZOFEIFA, A., OKI, Y., FERNANDES, G. W., BALL, R. A & GAMON, J. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees**, v. 26, p. 291–299, 2012.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.

- TORSVIK, V & OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p. 240-245. 2002.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- VEGA, F. E., SIMPKINS, A., AIME, M. C., POSADA, F., PETERSON, S. W., REHNER, A., INFANTE, F., CASTILLO, A & ARNOLD, E. A. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, n. 3, p. 122–138, 2010.
- YADETA, K. A & THOMMA, B. P. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-12, 2013.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 3

FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS ENDOFÍTICOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As folhas do eucalipto sustentam diversidade variável de fungos filamentosos e de leveduras que podem exercer influência na sanidade e no desenvolvimento da planta. Endofíticos interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença. Fungos simbiossiontes podem utilizar açúcares solúveis simples, como glicose e frutose, os quais podem funcionar como principal fonte de carbono para esses micro-organismos. O eucalipto é cultivado em todo o mundo e é a espécie da família Myrtaceae mais amplamente distribuída e utilizada em plantios comerciais. Neste estudo, a diversidade e a distribuição de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos do híbrido eucalipto urograndis foram determinadas e relacionadas à concentração de açúcares em folhas provenientes de plantas em cinco fases de desenvolvimento, incluindo as mudas de viveiro e plantas em campo. O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Foram identificadas: 15 espécies e dois gêneros de fungos e duas espécies e sete gêneros de leveduras. As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a estrutura da comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em folhas. Muitas das espécies identificadas são específicas de determinada fase de desenvolvimento. Os fungos endofíticos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos de folhas de plantas da fase de jardim clonal; *Chaetomella acutisetata* e *Ascotricha chartarum* de folhas da fase de sombreamento; *Erratomyces patellii* e *Saxomyces* sp. de folhas da fase de saída do sombreamento; *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da fase de expedição, e *Mycosphaerella populicola*, das folhas de plantas do campo. As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* são específicas das folhas das fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento, respectivamente. Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar folhas de plantas provenientes de mais de uma fase de desenvolvimento. O fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem em plantas nas fases de expedição e de campo, e o gênero *Candida*, nas de jardim clonal, sombreamento e saída do sombreamento. Neste estudo é apresentada pela primeira vez a presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

Palavras-chave: diversidade, fungos, leveduras, endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

A parte aérea das plantas, especialmente as folhas, é considerada habitat de grande importância agrônômica e ecológica, por hospedar grande diversidade de micro-organismos endofíticos e epifíticos, incluindo fungos e leveduras. Os micro-organismos endofíticos, em particular, já foram encontrados em várias espécies de plantas, sendo importantes componentes da biodiversidade (ARNOLD *et al.*, 2000). *Eucalyptus* spp. são as plantas da família Myrtaceae mais amplamente distribuídas e utilizadas em plantios comerciais em muitos países (FAO, 2015), devido ao seu rápido crescimento, à sua adaptabilidade e ao valor comercial de sua madeira (BROOKER, 2000). A avaliação da diversidade e abundância de fungos filamentosos e de leveduras em eucalipto, com a utilização de metodologia independente de cultivo, reconhecidamente retrata, com maior fidelidade, a complexidade dessas comunidades e suas interações com a planta (KEMLER *et al.*, 2013). Assim, a complexidade da microbiota fúngica endofítica tem sido subestimada até o momento.

As leveduras compreendem o maior grupo de micro-organismos epifíticos em interação com plantas (WHIPPS *et al.*, 2008), enquanto fungos endofíticos são abundantes em folhas assintomáticas de várias árvores tropicais (ARNOLD, 2005). Esses micro-organismos apresentam grande influência sobre a planta, por afetarem a estrutura da comunidade e a diversidade de organismos a ela associados ou a adaptabilidade e evolução do hospedeiro (OMACINI *et al.*, 2001; BRUNDRETT, 2006). Além disso, são fontes de várias enzimas de interesse industrial, como celulasas, xilanases, lacases, pectina liase, hemicelulasas, entre outras, e, por isso, estão entre os micro-organismos de maior interesse para produção de biocompostos industriais (LUMYONG *et al.*, 2002; ROBL *et al.*, 2013).

Endofíticos são organismos que vivem interiormente nos tecidos da planta, não causando sintomas de doenças (ARNOLD *et al.*, 2007), e, em associação com árvores, podem reduzir danos às folhas e as perdas ocasionadas por patógenos (ARNOLD *et al.*, 2003). Apesar de o Brasil ter a maior área de plantio de eucalipto no mundo e da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de fungos nessa planta (CHEEWANGKON *et al.*, 2009; SÁNCHEZ MÁRQUEZ *et al.*, 2011), pouco se conhece sobre a dinâmica das comunidades microbianas endofíticas durante as fases de desenvolvimento da planta em viveiro e no campo. A compreensão do impacto das práticas de produção de mudas em viveiros sobre a estrutura das comunidades microbianas endofíticas é fundamental para a produção de mudas mais saudáveis e resistentes ao transplante para o campo.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de fungos filamentosos e de leveduras endofíticas associados às folhas de eucalipto em fases distintas do desenvolvimento da planta, em viveiros comerciais e em campo, e relacioná-la às concentrações de açúcares foliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Este estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP – etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e a campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato.

Fertilizantes	Doses* (kg/m ³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira

(CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é 19° 24' 54", a longitude 42° 25' 56" e a altitude 318 m. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulinitico ou caulinitico-oxídico ou gibbsítico-oxídico, hipoférrico ou mesoférrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente; a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56, 39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Amostragem

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20 °C. Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato (0,05 mmol.L⁻¹), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi

repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspendido e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspendido *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Extração de açúcares

As amostras de folhas de eucalipto foram analisadas quanto ao conteúdo de glicose, frutose e sacarose (LISEC *et al.*, 2006) por metodologia adaptada. O extrato das amostras de folhas de cada uma das cinco fases de desenvolvimento

da planta foi preparado por maceração, em almofariz e pistilo, de cerca de 50 a 60 mg de tecido foliar, seguindo-se a transferência do macerado para tubo de polipropileno e adição de 1000 µL de metanol (100%). Essa mistura foi aquecida a 70°C sob agitação de 950 rpm durante 60 min, seguindo-se a centrifugação a 14000g por 10 min. Cerca de 600 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos contendo 500 µL de clorofórmico e 800 µL de água. Após centrifugação a 12000g por 15 min, a fase polar foi coletada (1000 µL), e os açúcares quantificados por ensaios enzimáticos acoplados, pelo aumento da densidade óptica a 340 nm da razão NADP/NADPH⁺H⁺ detectada (Multiscan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As enzimas utilizadas foram glicose 6-fosfato (0,2 mg/mL), hexoquinase (0,2 mg/mL), fosfoglicose isomerase (0,2 mg/mL) e invertase (1 mg/mL). Sucessivamente, essas enzimas foram adicionadas ao extrato de folhas e as concentrações de glicose, frutose e sacarose expressas em mmol/kg de massa seca. A concentração de sacarose foi estimada como correspondente à metade da concentração de hexose. As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise da diversidade de fungos e leveduras

A diversidade de fungos e de leveduras em folhas de eucalipto foi examinada por DGGE, e a estratégia Nested-PCR foi utilizada. Na primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos e dos domínios D1-D2 de rRNA 26S de leveduras. Os oligonucleotídeos iniciadores NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram os utilizados para amplificação de fungos, e o NL1 (COCOLIN *et al.* 2000) e NL4 (PRAKITCHAIWATTANA *et al.*, 2004), para leveduras. Os fragmentos específicos gerados foram utilizados como molde para segunda PCR, sendo a região V7-V8 amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000) para amplificação de fungos e NL1GC e LS2 (COCOLIN *et al.* 2000) para leveduras. Esses oligonucleotídeos continham grampo GC incorporado à região *forward*.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µmol de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mmol de cloreto de magnésio, 0,16 µmol dos *primers* NS1, EF3, NL1 e NL4, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações para fungos foram realizadas sob as seguintes

condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72°C e extensão final durante 10 min a 72°C. Para a amplificação dos *amplicons* das leveduras a temperatura inicial foi de 95°C e a de anelamento 52°C. A segunda PCR foi realizada com 1,0 µL da primeira como molde, e substituição do *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC e NL1 e NL4 por NL1GC e LS2. Os *amplicons* de fungos filamentosos foram amplificados em desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min, extensão por 1 min a 72°C e extensão final a 72°C durante 10 min. Com os *amplicons* de leveduras, a desnaturação inicial foi a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, 52°C e 72°C durante 2 min para anelamento e extensão, e, extensão final a 72°C por 7 min.

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após a Nested-PCR foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermo-lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização das bandas dos géis com utilização do software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (m/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09 % (v/v) TEMED (N,N,N=,N=tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% (fungos filamentosos) e 40%-60% (leveduras) ureia/formamida [(100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida)]. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis obtidos por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, os *amplicons* eluídos em 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos *over night* a 4°C. Uma

alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela MacroGen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência dos fungos filamentosos e das leveduras foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos filamentosos e de leveduras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e a ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software Sigma plot (Systat Software, Inc. 2008). Foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificar a correlação entre os teores de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e os índices de riqueza e diversidade a 5% de probabilidade (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S ou 26S, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética foi baseado no alinhamento dessas sequências, utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram realizados por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a estrutura da comunidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em fases distintas de desenvolvimento das plantas foram examinadas por DGGE e sequenciamento do rRNA 18S e 26S. O protocolo de extração de DNA e a amplificação dos genes rRNA 18S e 26S foram eficientes para acessar a diversidade dessas comunidades endofíticas em folhas de eucalipto (Figura 1).

A análise por DGGE mostrou que o número de táxons representados pelas UTOs, é afetado pelas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2), indicando mudança na comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em interação com a planta. O padrão obtido pelos *primers* proporcionou a observação de bandas mais e menos intensas no perfil eletroforético (Figuras 1 e 2), permitindo a análise de populações de maior e menor abundância.

O perfil da comunidade de leveduras mostrou maior complexidade (Figura 2) e homogeneidade nas diferentes amostras em comparação ao perfil de fungos (Figura 1), evidente pelo maior número de UTOs e pela maior riqueza e diversidade (Figuras 4 e 5).

A análise de agrupamento hierárquico por UPGMA revelou que os padrões dos perfis entre as etapas de cultivo foram diferentes (Figura 1B e 2B). Os resultados da análise de agrupamento indicam a formação de grupos distintos que compartilham entre 25% (Figura 1) e 35% (Figura 2) de similaridade e subgrupos mais similares que tendem a agruparem juntos. As folhas das plantas oriundas do jardim clonal e das plantas recém-saídas do sombreamento apresentaram composição da comunidade fúngica similar, e as do sombreamento e expedição formaram pelo menos um clado com 43,9% e 64,2% de similaridade (Figura 1). À exceção do subgrupo das folhas em sombreamento, em todas as fases de desenvolvimento das plantas, a comunidade de leveduras foi similar, alcançando valores de mais de 87% de similaridade no jardim clonal (Figura 2).

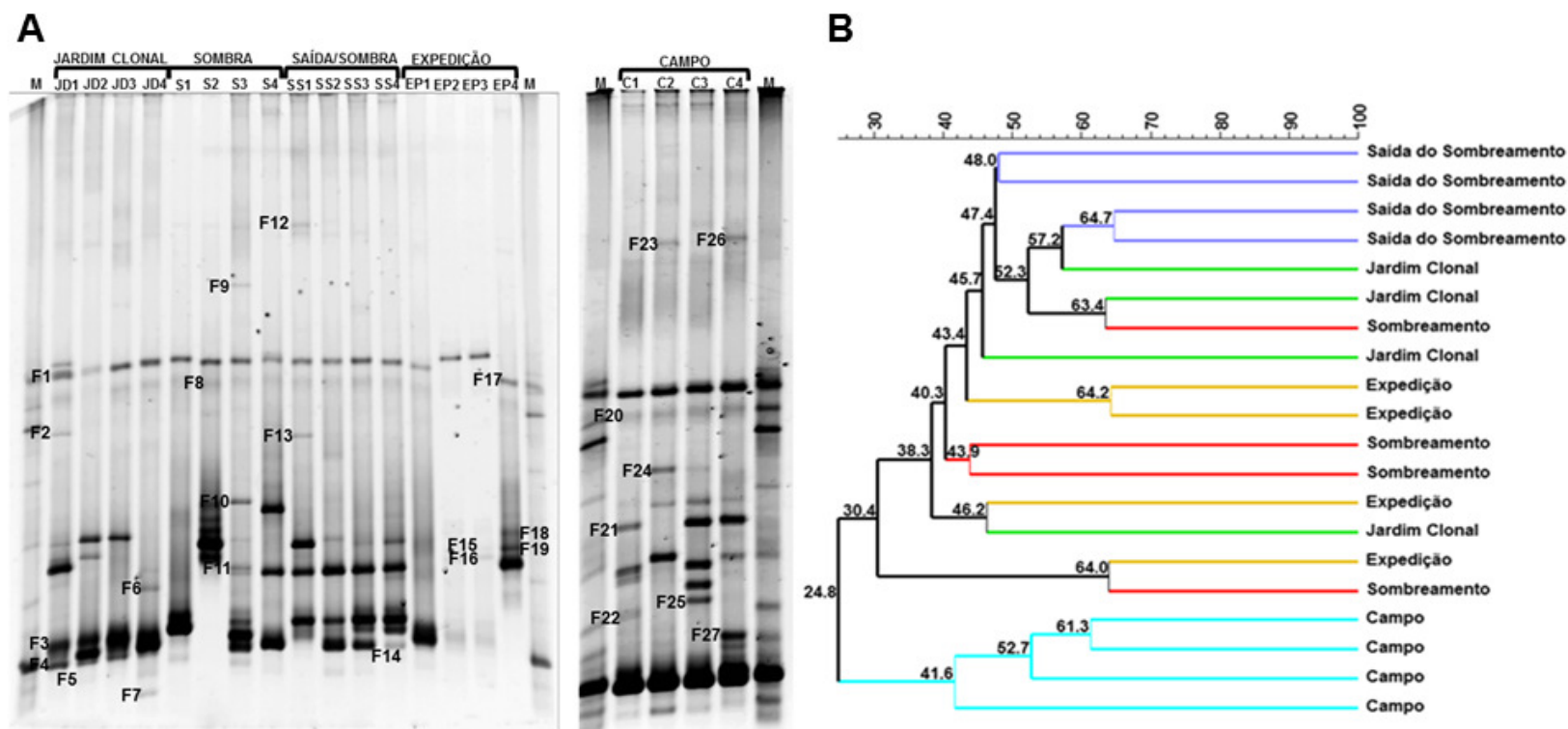


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos durante as fases de desenvolvimento do eucalypto. A – Gel a partir da DGGE. As letras F seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalypto em quatro repetições.

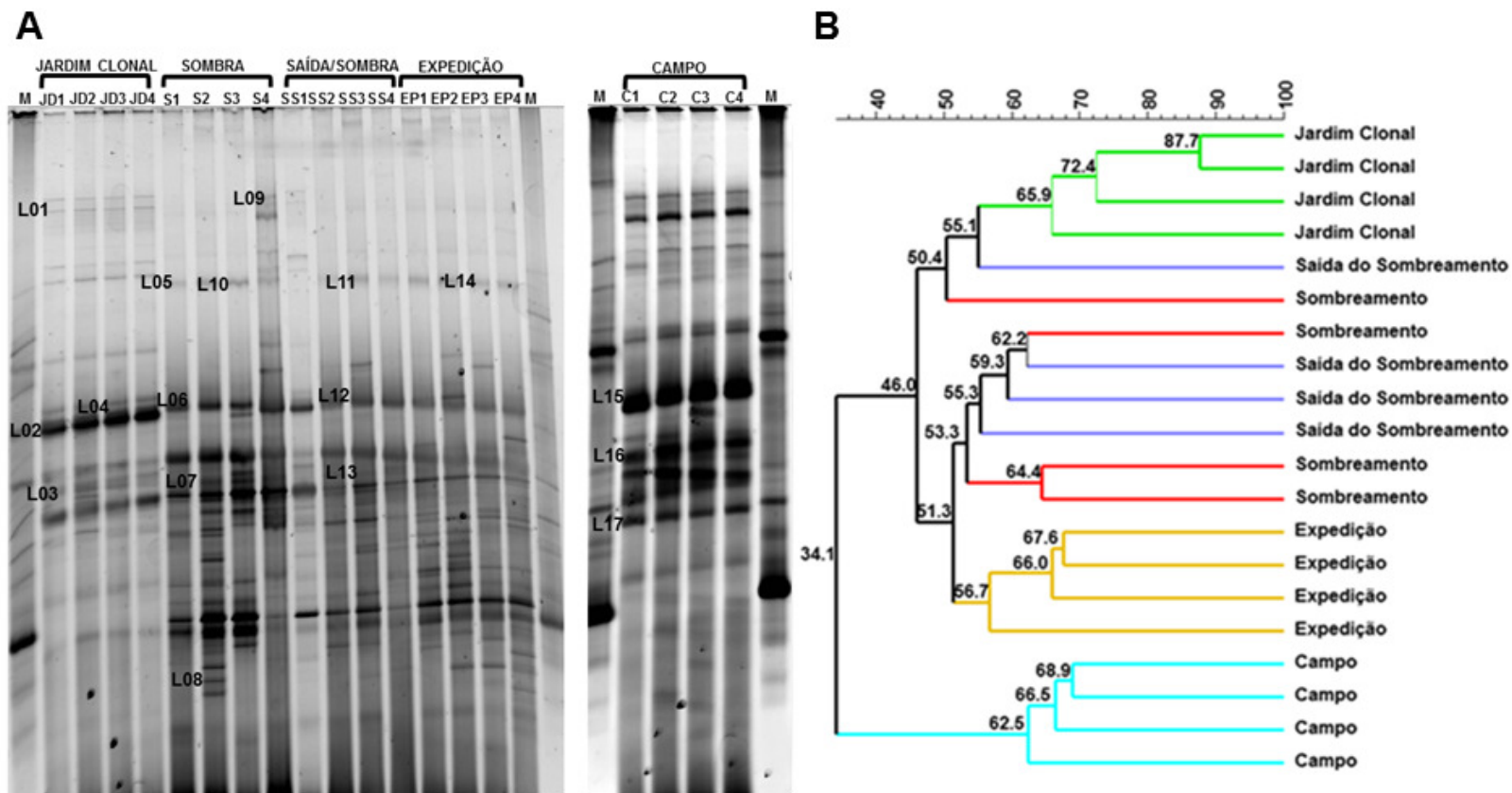


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de leveduras endofíticas durante as fases de desenvolvimento do eucalipto. A – Gel a partir da DGGE. As letras L seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalipto em quatro repetições.

Embora a maioria das UTOs (8 e 10) seja comum entre as fases de desenvolvimento das plantas, existem UTOs específicas para cada uma delas, refletindo diferenças na estrutura das comunidades de fungos filamentosos e leveduras. A maior incidência de UTOs específicas de fungos ocorreu nas folhas provenientes do campo, enquanto para leveduras isso ocorreu nas folhas da expedição e campo (Figura 3). Mesmo sendo pequenas, essas mudanças mostraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto modulam a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, fato mais evidente para as leveduras.

A diversidade e a riqueza de fungos endofíticos não foram influenciadas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 4), diferentemente do observado para as leveduras que apresentaram maiores médias desses índices nas amostras das plantas em expedição (Figura 5). As folhas do jardim clonal foram as que mostraram os menores índices de diversidade e de riqueza de leveduras (Figura 5).

A concentração de glicose e frutose variou em relação às folhas provenientes das fases de desenvolvimento das mudas e no campo, enquanto os teores de sacarose foram mais próximos. As maiores concentrações de glicose e frutose foram encontradas nas folhas das plantas em expedição e no campo, enquanto as de sacarose somente em campo ($p\text{-valor} < 0,05$) (Figura 6). Entretanto, as correlações entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de riqueza e diversidade de Shannon foram moderadamente negativas ($-0,8 < r \leq -0,5$) ($p\text{-valor} > 0,05$).

A identificação das UTOs foi realizada pela excisão das bandas do gel da DGGE, sequenciamento do rRNA 18S e 26S e comparação das sequências obtidas pelo algoritmo BLASTn (NCBI). O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Dentro desses filos, foram identificadas 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos (Figura 7) e duas espécies e sete gêneros de leveduras (Figura 8), em plantas de diferentes idades, em viveiro e em campo.

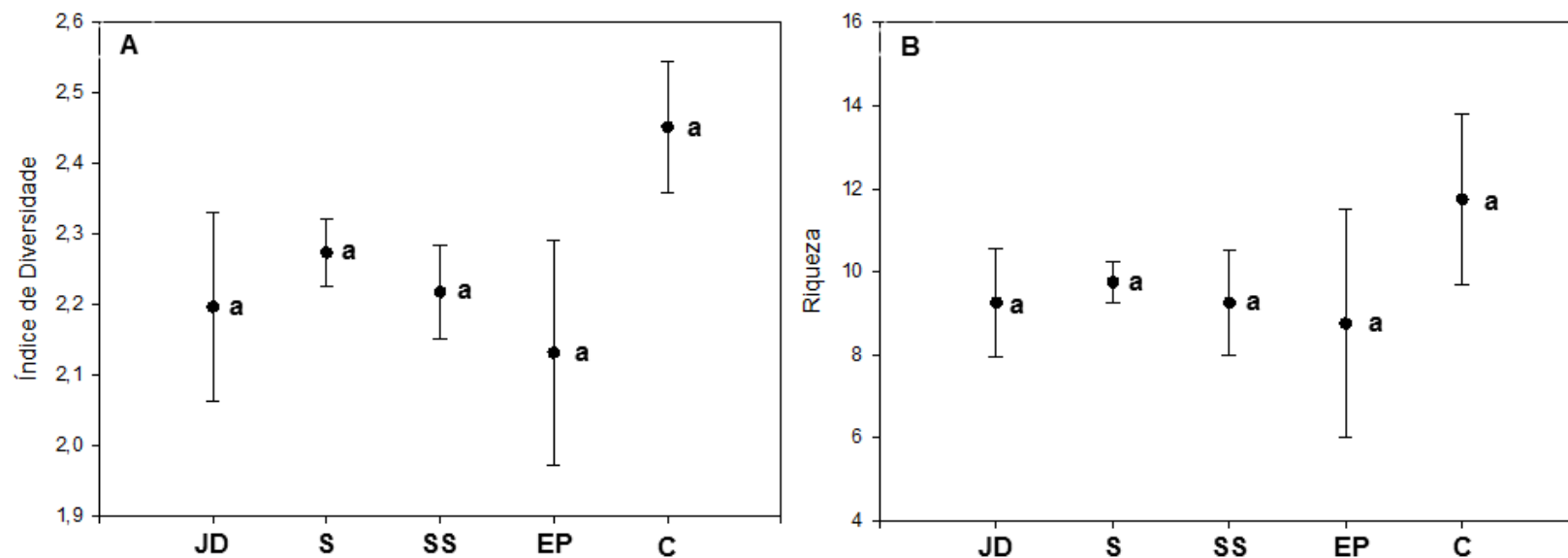


Figura 4: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de fungos endofíticos em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

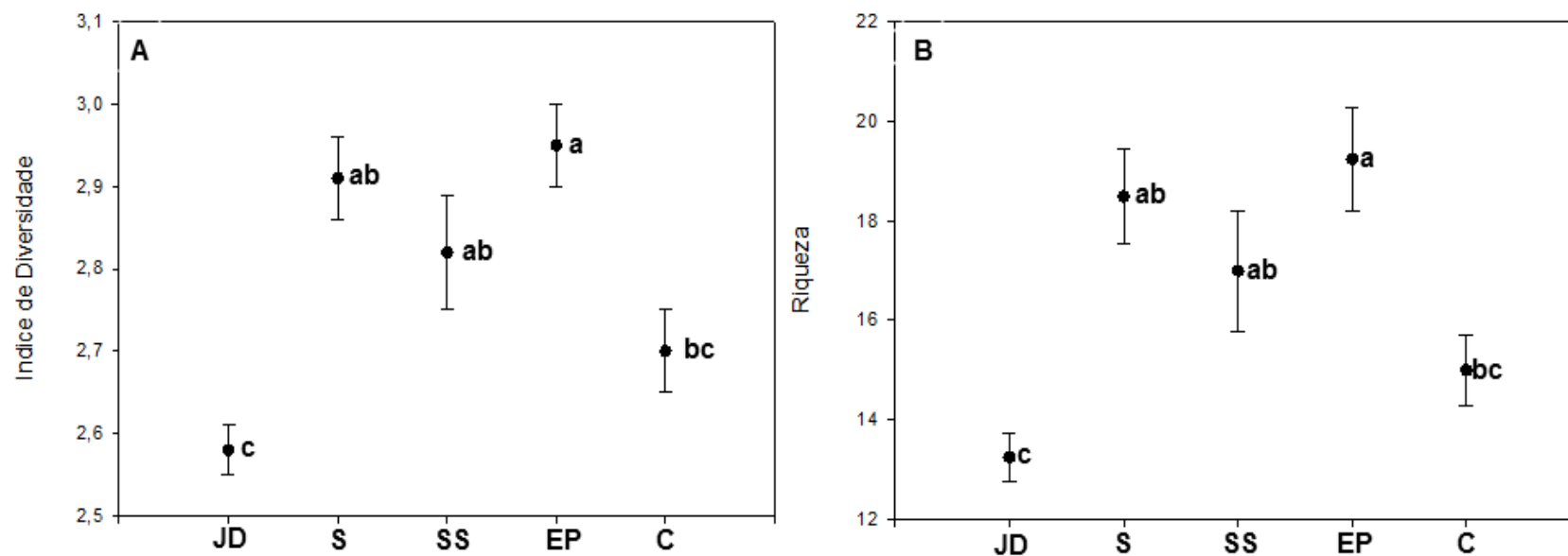


Figura 5: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de leveduras endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

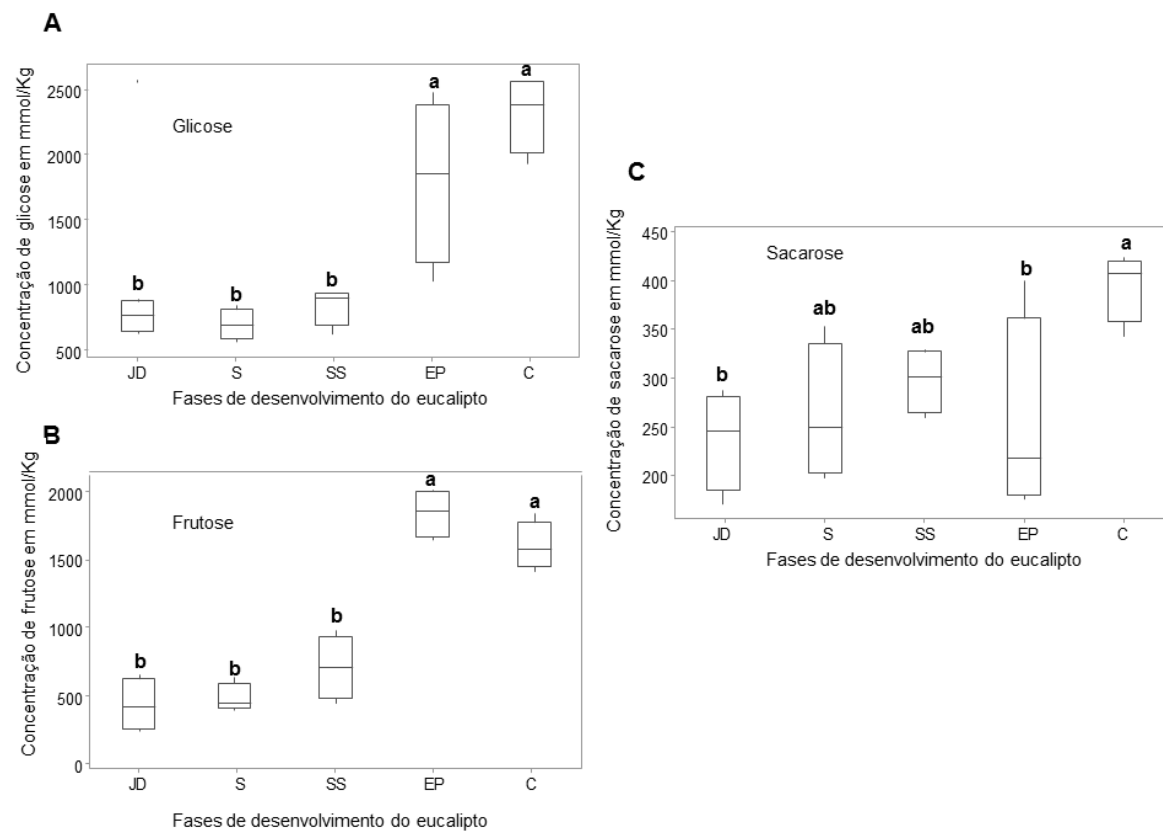


Figura 6: Boxplots mostrando as concentrações de açúcares (glicose, frutose e sacarose) em mmol/kg de folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. (A): glicose (B): frutose e (C): sacarose. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação entre fungos endofíticos e eucalipto é dependente das fases de desenvolvimento da planta, pois a maioria das espécies é fase-específica (Tabela 2). Entretanto, *Cladosporium* sp. e *Teratosphaeria acidotherma*, se mostraram presentes em mais de uma etapa (Tabela 2). Essas diferenças na colonização endofítica em folhas de eucalipto podem indicar a presença de condições mais favoráveis ao estabelecimento de determinadas espécies em dado momento. O menor número de fungos endofíticos identificados pelo sequenciamento do rRNA 18S foram provenientes das plantas sombreadas, todas elas específicas dessa fase de desenvolvimento (Tabela 2).

A comunidade de leveduras em interação com o eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento das plantas foi acessada pela primeira vez em eucalipto e, à semelhança do que ocorre em *Coffea arabica* (MASOUD *et al.*, 2004), é composta por muitos representantes de poucas espécies ou gêneros, distribuídas nos filos Ascomycota e Basidiomycota. A maioria das UTOs sequenciadas foi identificada em nível de gênero por apresentarem identidades abaixo de 97% com as sequências do banco de dados NCBI (Tabela 3). Entretanto, os representantes do filo Basidiomycota *Rhodospodium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* apresentaram identidades de 99 e 98%, respectivamente, valores esses que possibilitaram a identificação em nível de espécie. Essas leveduras são específicas das fases de expedição e campo (Tabela 3). Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em folhas de eucalipto. As leveduras endofíticas identificadas em interação com eucalipto mostraram ser dependentes da fase de desenvolvimento em associação com a planta. Tanto fungos quanto leveduras não são persistentes durante o desenvolvimento do eucalipto.

A análise filogenética das sequências de rRNA 18S revelou que a comunidade de fungos endofíticos presente nas folhas de eucalipto pertence aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), valores que suportam a análise (Figura 7).

Tabela 2: Distribuição das espécies/gêneros de fungos endofíticos identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade	Acesso/NCBI	Banda	Filo
			(%)			
Jardim Clonal (JD)	<i>Diplomitoporus crustulinus</i>	9 e ⁻¹³⁸	99	AY336770.1	B10	Basidiomycota
	<i>Podosphaera tridactyla</i>	5 e ⁻¹³⁵	99	AB022392.1	B07	Ascomycota
	<i>Aspergillus restrictus</i>	2 e ⁻¹³⁸	99	AB008407.1	B11	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Ascotricha chartarum</i>	6 e ⁻¹⁵⁵	99	AB048283.1	B12	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	3 e ⁻¹³³	99	AY544728.1	B13	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹³⁰	98	AB537894.1	B14	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	7 e ⁻⁹⁹	91	AY544728.1	B15	Ascomycota
Saída do Sombreamento (SS)	<i>Erratomyces patelii</i>	2 e ⁻¹⁰⁸	96	DQ663693.1	B17	Basidiomycota
	<i>Saxomyces</i> sp.	1 e ⁻¹¹⁶	98	KC315864.1	B20	Ascomycota
Expedição (EP)	<i>Lepidostroma</i> sp.	6 e ⁻⁴⁰	99	AB767250.1	B21	Basidiomycota
	<i>Schizophyllum radiatum</i>	5 e ⁻¹¹¹	95	AY705952.1	B22	Basidiomycota
	<i>Mycosphaerella lateralis</i>	7 e ⁻¹³⁹	99	GU214531.1	B25	Ascomycota
	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B26	Ascomycota
Campo (C)	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B27	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹⁰¹	92	AB537895.1	B29	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	3 e ⁻¹³²	99	AB537895.1	B30	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	98	GU214618.1	B33	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	99	GU214618.1	B34	Ascomycota
	<i>Mycosphaerella populicola</i>	8 e ⁻⁹³	92	EU167578.1	B39	Ascomycota

Tabela 3: Distribuição das espécies/gêneros de leveduras endofíticas identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade (%)	Acesso/NCBI	Banda	Filo
Jardim Clonal (JD)	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L01	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	80	EU585764.1	L02	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L03	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	90	EU585764.1	L04	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L05	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L06	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L07	Ascomycota
	<i>Saturnispora</i> sp.	4e ⁻⁰⁹	95	KC832478.1	L08	Ascomycota
	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L09	Ascomycota
	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L10	Ascomycota
Saída da Sombreamento (SS)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L11	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L12	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L13	Ascomycota
	<i>Malassezia obtusa</i>	6e ⁻⁹⁶	91	EU192365.1	B18	Basidiomycota
	<i>Bensingtonia ingoldii</i>	2e ⁻¹⁰⁶	93	D38234.1	B19	Basidiomycota
Expedição (EP)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L14	Ascomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B23	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B24	Basidiomycota
Campo (C)	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L15	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L16	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L17	Ascomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B28	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B31	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	8e ⁻¹³⁸	99	AB073272.1	B32	Basidiomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B37	Basidiomycota

Entre os Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Pedospaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. A UTO B10 agrupou com os dois fungos do gênero *Diplomitoporus*, a B17 agrupou com as espécies *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com *Cortinarius*, todos confirmados como Basidiomycota com altos *bootstraps* (Figura 7).

A amplificação e análise de sequências do gene rRNA 18S e 26S revelou que as UTOs estão relacionadas a leveduras pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota, com agrupamentos de alta sustentação filogenética (Figura 8). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram altos *bootstraps* com valores de 99 e 100. Os melhores agrupamentos formados entre os Basidiomycota foram os das bandas 23 e 28, com as espécies *Rhodosporidium toruloides* e *Rhodotorula glutinis* e as do gênero *Aureobasidium* (Figura 8). As leveduras ascomicéticas, por sua vez, mostraram agrupamentos fortes entre si, com os altos *bootstraps* dos nós mais externos, confirmando a proximidade filogenética entre elas e as do banco de dados NCBI (Figura 8).

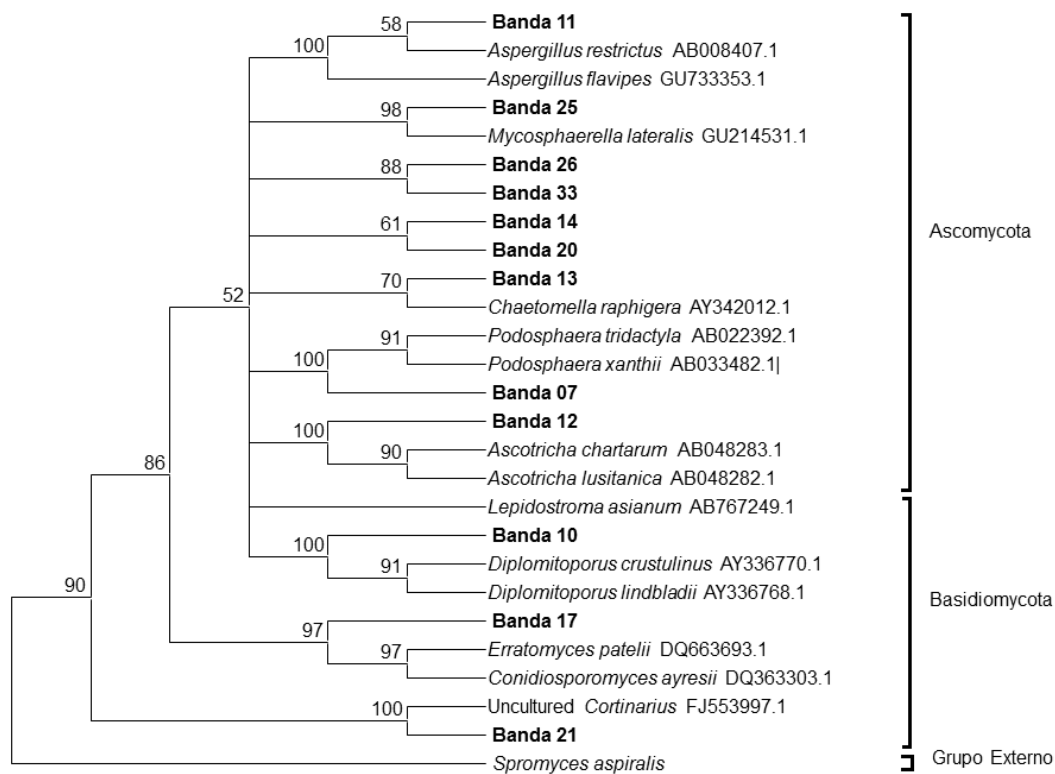


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces aspiralis* foi utilizado como grupo externo.

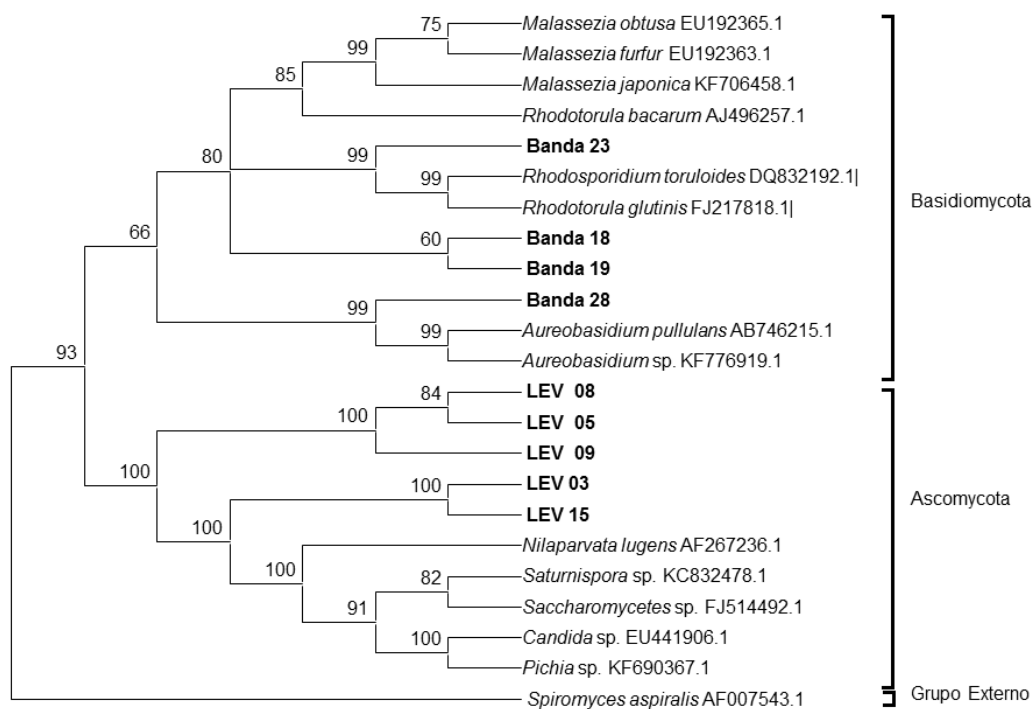


Figura 8: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências dos genes rRNA 18S e 26S de leveduras encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces spiralis* foi utilizado como grupo externo.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos e de leveduras endofíticos acessada por DGGE mostrou a presença de UTOs mais e menos intensas no gel, representando populações com abundância distinta (Figuras 1 e 2). Essa técnica é a escolha para avaliação da diversidade microbiana em vários ambientes (BRESOLIN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; KITTELMANN *et al.*, 2012), o que inclui as folhas de eucalipto (Figura 1 e 2). Essa análise mostrou-se mais robusta quando realizada em conjunto com a abordagem Nested-PCR (Figuras 1 e 2) e permite a análise de comunidades microbianas complexas (OLIVEIRA *et al.*, 2013), proporcionando boa resolução de populações menos abundantes.

Nested-PCR-DGGE mostrou ser eficiente em diferenciar a estrutura das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2). As mudanças foram mais acentuadas na composição da comunidade de leveduras pela formação de clados mais distintos, com UTOs mais similares em um mesmo agrupamento (Figuras 1 e 2). Essas UTOs, em sua maioria, são compartilhadas entre todas as fases de desenvolvimento (8 e 10). Entretanto, mesmo sendo poucas, as UTOs específicas refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos e de leveduras (Figura 3) e demonstram que essas comunidades são modeladas pelo desenvolvimento da planta, fato mais acentuado em leveduras (Figura 3).

Enquanto a comunidade de fungos endofíticos não apresenta diferenças significativas na diversidade e na riqueza (Figura 4), a de leveduras mostrou as melhores médias desses índices nas plantas em expedição (Figura 5). Leveduras apresentam sistema de transporte de glicose altamente regulado, podendo absorver eficazmente a glicose em várias concentrações, pela presença de transportadores de alta e baixa afinidade (BARNETT, 2008). Tal fato pode explicar os maiores índices de diversidade e riqueza encontrados (Figura 5). Os valores de riqueza e de diversidade encontrados nesse estudo estão entre aqueles mais comumente encontrados na literatura, entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Mesmo não existindo diferenças significativas nos índices de diversidade e riqueza de espécies de fungos (Figura 4), observou-se a existência de padrões distintos de colonização desses micro-organismos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 3 e Tabela 2).

A Comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é composta por vários gêneros ao longo das etapas estudadas (Tabela 2), e a de leveduras, por menor quantidade de gêneros e espécies (Tabela 3). Portanto, as folhas dessa planta são

habitat que suportam maior comunidade de fungos em relação à de leveduras. Entretanto, ambas sofrem alterações significativas ao longo do desenvolvimento da planta. Representantes da família Myrtaceae são considerados fonte importante de biodiversidade de fungos, sendo que a maior parte desses fungos está associado às folhas de *Corymbia*, *Eucalyptus* e *Syzygium* spp. (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). As espécies fúngicas em associação com eucalipto relatadas no presente trabalho (Tabela 2) são distintas daquelas descritas na Austrália, Nova Zelândia, Madagáscar e Tailândia (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). Isso indica que essa interação planta-micro-organismo é dependente da espécie de planta em associação, da área de cultivo e da idade da planta associada.

A interação fungo endofítico-planta foi também relatada em outras famílias de plantas como Malvaceae, Cecropiaceae, Lauraceae, Fabaceae, Lecythidaceae e Celastraceae (CANNON & SIMMONS, 2002). Especificamente, no caso de eucalipto, a maioria dos trabalhos publicados até o momento priorizaram os métodos dependentes de cultivo (LUPO *et al.*, 2001; CHEEWANGKOON *et al.*, 2009; KHARWAR *et al.*, 2010), os quais subestimam a diversidade e abundância desses micro-organismos. Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

O grande número de UTOs obtidas pelas sequências analisadas por sequenciamento do rRNA 18S e 26S pode ser considerado como indicativo de alto nível de riqueza e diversidade microbiana, considerando-se que o estudo foi realizado com uma única espécie de planta. As fases em expedição e a campo foram as que apresentaram o maior número de fungos e de leveduras distintos (Tabelas 2 e 3). Açúcares solúveis simples, como a glicose e a frutose, podem funcionar como fonte principal de carbono para fungos simbiotes de plantas (BAGO *et al.*, 2000; CHAMBERGO *et al.*, 2002). Além disso, os micro-organismos associados às plantas podem apresentar via metabólica que facilita a absorção e a quebra da sacarose, sendo essa característica vantagem evolutiva e competitiva. A presença de invertases foi descrita em diversos filos fúngicos. As espécies endofíticas apresentam, em geral, diferentes estratégias nutricionais visando à degradação da sacarose (DOIDY *et al.*, 2012).

A maior predominância de algumas espécies de fungos e de leveduras endofíticas na expedição e no campo (Tabelas 2 e 3) pode ser atribuída ao fato de que, nessas etapas, em plantas tropicais, as folhas apresentam concentrações menores de substâncias químicas de defesa, fato que pode permitir maior crescimento desses micro-organismos (ARNOLD *et al.*, 2003).

Outro fator que afeta o crescimento de fungos e contribui para diferenças na densidade e, conseqüentemente, na diversidade microbiana avaliada (Figuras 4 e 5) é a umidade, uma vez que o conteúdo de água próximo à saturação pode afetar a entrada e o crescimento fúngico na planta (RAYNER & BODDY, 1986). As folhas provenientes do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento foram irrigadas diariamente, de acordo com os padrões de umidade apresentados na região, diferente do que ocorreram com as plantas em expedição e a campo, dependentes da precipitação pluviométrica. Esse fato também pode explicar as diferenças na prevalência e frequência de fungos e leveduras nas fases de desenvolvimento do eucalipto.

Ascomycota foi o filo predominante entre as espécies de fungos e leveduras em eucalipto (Tabelas 2 e 3). Entre os fungos endofíticos, *Teratosphaeria acidotherma* e *Cladosporium sp.* e as leveduras do gênero *Candida* e *Nilaparvata* (Figura 9) foram encontrados em mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto (Tabela 2). O predomínio de leveduras do filo Ascomycota pode ser reflexo da adaptação desses micro-organismos às folhas como micro-habitat que favorece o crescimento de espécies fermentativas (POZO et al 2011). Fungos do gênero *Teratosphaeria* foram encontrados em folhas com sintomas de MLD (doença das manchas da folha) em eucalipto na Austrália (ANDJIC et al., 2010). Entretanto, neste estudo, *Teratosphaeria acidotherma* e *Teratosphaeria toledana* (Tabela 2) foram extraídas de folhas saudáveis de eucalipto. Essa observação evidencia que certos micro-organismos podem ser endofíticos em uma planta e patógenos em outras (SAIKKONEN et al. 2004). A diferença entre o estágio endofítico e patogênico pode ser devido a fatores abióticos ou à idade da planta (SAIKKONEN et al., 2004; PORRAS-ALFARO et al., 2011).

Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* estavam presentes em folhas de plantas provenientes de mais de uma etapa de produção de mudas (Tabelas 2 e 3). Esse comportamento mais generalista indica capacidade de adaptação a condições nutricionais e ambientais distintas. O fungo *Cladosporium sp.* e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem na folhas nas etapas de expedição e campo; já o gênero *Candida* está presente em folhas de plantas do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento. Esse comportamento indica que elas possuem informações genéticas para colonizar e persistir em folhas de eucalipto em mais de uma etapa de desenvolvimento dessa planta, sugerindo que sejam micro-organismos endofíticos competentes (HARDOIM et al., 2008), com

papéis relevantes na fisiologia da planta.

Os fungos e as leveduras podem beneficiar as plantas, aumentando a tolerância das mesmas a fatores bióticos e abióticos, melhorando o crescimento e a sobrevivência em condições adversas, competindo com patógenos (HUBBARD *et al.*, 2014) e produzindo ampla variedade de reguladores de crescimento, a exemplo das giberelinas (GAs), do ácido abscísico (ABA) e das auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012). *Candida tropicalis* já foi relatada como tendo capacidade de promoção de crescimento em arroz por meio de alta atividade da ACC deaminase, da produção de ácido indol acético (AIA) e de poliaminas (AMPRAYN *et al.*, 2012). Plantas em estresse produzem altas concentrações de etileno, inibindo o crescimento (GLICK *et al.*, 2007). A ACC deaminase é a enzima responsável pela quebra do precursor do etileno, o aminociclopropano-1-carboxilato – ACC, em amônia e alfa-cetoglutarato. Micro-organismos produtores de ACC-deaminase diminuem os níveis de etileno pelo consumo dos subprodutos da quebra do precursor, ACC, promovendo, ainda, o crescimento vegetal pela síntese de AIA (GLICK, 2014).

Muitas das espécies de fungos filamentosos e leveduras são específicas de algumas fases de desenvolvimento do eucalipto. Os fungos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos do jardim clonal, *Chaetomella acutiseta* e *Ascotricha chartarum* do sombreamento, *Erratomyces patelii* e *Saxomyces* sp. das planta recém-saídas do sombreamento, *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da expedição e *M. populicola* do campo (Tabela 2). As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* estavam presentes apenas nas plantas em sombreamento e nas recém-saídas do sombreamento, respectivamente.

A análise filogenética das sequências de 18 e 26S rDNA confirmou que a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, presente nas folhas de eucalipto em diferentes etapas de desenvolvimento, está incluída nos filos Basidiomycota e Ascomycota, pela formação de clados distintos, com altos *bootstraps* (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), os quais sustentam a análise filogenética (Figura 7).

Entre os fungos pertencentes à Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Podosphaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. Já entre

os Basidiomycota, os melhores agrupamentos foram o da UTO B10 com dois fungos pertencentes ao gênero *Diplomitoporus*, a B17 com *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com o gênero *Cortinarius*, todos com altos *bootstraps* (Figura 7).

Fungos do gênero *Mycosphaerella* são frequentemente relatados como habitantes da parte aérea das plantas, com algumas de suas espécies hospedeiro-específicas (MAXWELL *et al.*, 2005). *Mycosphaerella lateralis* já foi demonstrada em interação patogênica com eucalipto na Austrália, formando lesões necróticas nas folhas (MAXWELL *et al.*, 2000). No presente estudo, entretanto, esse fungo foi identificado em folhas assintomáticas. Tal fato pode indicar que a interação seja dependente da espécie de planta, da área de cultivo, da idade da planta ou de mecanismos de reconhecimento planta-hospedeiro que podem determinar o comportamento fúngico como patogênico ou endofítico (SAIKKONEN *et al.*, 2004; PORRAS-ALFARO *et al.*, 2011).

A levedura cosmoploita *Aureobasidium pullulans* já foi identificada em várias plantas, sendo considerada como potencial agente de controle biológico de patógenos (ANDREWS *et al.*, 1994). Neste estudo, essa levedura é relatada como endofítica de eucalipto (Figura 8) em plantas de 18 meses de idade, mas não nas demais fases de desenvolvimento (Tabela 3).

Ampla variedade de fungos e leveduras endofíticos foi encontrada em eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento da planta durante a produção de mudas em viveiro. A diversidade microbiana levantada neste trabalho sugere significativa importância dos micro-organismos endofíticos nos sistemas de produção de mudas em escala comercial, abrindo novas avenidas para a elucidação do papel de micro-organismos associativos e simbióticos na nutrição vegetal e na adaptação da planta ao meio.

CONCLUSÕES

A excisão, eluição e sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostrou ser boa técnica para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto.

Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto. Essa comunidade é representada por 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos e duas espécies e sete gêneros de leveduras, em plantas de diferentes fases de desenvolvimento.

A relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a levedura e eucalipto, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto. Entretanto, os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto. Já o fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodospiridium fluviale* são persistentes nas etapas de expedição e campo, e o gênero *Candida*, no jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.
- AMPRAYN, K. O., ROSE, M. T., KECSKÉS, M., PEREG, L., NGUYEN, H. T & KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis*) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.
- ANDJIC, V., WHYTE, G., HARDY, G & BURGESS, T. New *Teratosphaeria* species occurring on eucalypts in Australia. **Fungal Diversity**, v. 43, p. 27-38, 2010.
- ANDREWS, J. H., HARRIS, R. F., SPEAR, R. N., LAU, G. W & NORDHEIM, E. V. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 40, p. 6-17, 1994.
- ARNOLD, A. E. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. **Current Trends in Mycological Research** (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68, 2005.
- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, p. 541-549, 2007.
- ARNOLD, A. E., MAYNARD, Z., GILBERT, G. S., COLEY, P. D & KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.
- BAGO, B., PFEFFER, P. E & SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.124, p. 949-958, 2000.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. **Yeast**, v. 25, p. 689-731, 2008.

- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 391-403, 2010.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**. v. 13, p. 79-148, 2000.
- BRUNDRETT, M. C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editors. **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. 281–293, 2006.
- CANNON, P. F & SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**. v. 94, p. 210-220, 2002.
- CHAMBERGO, F. S., BONACCORSI, E. D., FERREIRA, A. J., RAMOS, A. S., FERREIRA, J. R., ABRAHAO-NETO, J., FARAH, J. P & DORRY, EL- H. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 13983-13988, 2002.
- CHEEWANGKOON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C., & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**, v. 23, p. 55-85, 2009.
- COCOLIN, L., BISSON, L & MILLS, D. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 81–87, 2000.
- DOIDY, J., GRACE, E., KÜHN, C., SIMON-PLAS, F., CASIERI, L & WIPF, D. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. **Trends in Plant Science**. v. 17, p. 413-422, 2012.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, p. 30-39, 2014.
- GLICK, B. R., CHENG, Z., CZARNY, J & DUAN, J. **Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria**. In New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research (pp. 329-339). Springer Netherlands, 2007.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T & RYAN, P.D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.

- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HUBBARD, M., GERMIDA, J. J & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology*, v. 116, n.1, p. 109-122, 2014.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHARWAR, R. N., GOND, S. K., KUMAR, A & MISHRA, A. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A proposed taxonomy of anaerobic fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LISEC, J., SCHAUER, N., KOPKA, J., WILLMITZER, L & FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387–396, 2006.
- LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E. H & HYDE, K. D: Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. **Canadian Journal Microbiol**, v. 48, p. 1109-1112, 2002.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.
- MASOUD, W., BJØRG CESAR, L., JESPERSEN, L & JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East África determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**. v. 21, p. 549-556, 2004.
- MAXWELL, A., HARDY, G. E. STJ., WINGFIELD, M. J. & DELL, B. First record of *Mycosphaerella lateralis* on *Eucalyptus* in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 29, p. 279, 2000.
- MAXWELL, A., JACKSON, S. L., DELL, B., & HARDY, G. E. S. J. PCR-identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. **Mycological Research**, v. 109, p. 992-1004, 2005.

- MAY L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 829-841, 2001.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594, 2013.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, 78–81, 2001.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- POZO, M. I., HERRERA, C. M & BAZAGA, P. Species richness of yeast communities in floral nectar of southern Spanish plants. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 82-91, 2011.
- PRAKITCHAIWATTANA, C. J., FLEET, G. H & HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, v.4, p. 865–877, 2004.
- RAYNER, A. D. M & BODDY, L. Population structure and the infection biology of wood-decay fungi in living trees. **Advance Plant Pathology**, v. 5, p. 119–160, 1986.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- SAIKKONEN, K., WALI, P., HELANDER, M & TAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 275-280, 2004.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.

- SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S., BILLS, G. F & ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal species diversity in juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus* from plantations affected by *Mycosphaerella* leaf disease. **Annals of Applied Biology**, v. 158, p. 177-187, 2011.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- WHIPPS, J. M., HAND, P., PINK, D & BENDING, G. D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 1744-1755, 2008.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 4

DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As associações de plantas com bactérias endofíticas contribuem significativamente para a fitossanidade e produtividade das culturas. Bactérias endofíticas adaptaram-se à vida no interior dos tecidos vegetais, podendo contribuir positivamente para processos-chave para nutrição das culturas, a exemplo da fixação biológica de nitrogênio. O *Eucalyptus* é um dos gêneros de plantas mais cultivados e valorizados economicamente no mundo. A caracterização da comunidade microbiana associada às espécies deste gênero pode proporcionar novas ferramentas biotecnológicas para o cultivo sustentável e mais econômico dessas plantas. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, incluindo os grupos com potencial para fixação de N associados às folhas dessa planta. A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica foi acessada por PCR-DGGE, isolamento e sequenciamento do gene rRNA 16S. Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma-) e Actinobacteria foram identificados na comunidade investigada. Nessa comunidade, esse é o primeiro relato das espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* como endofíticas. A diversidade variou entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, sendo Proteobacteria o filo mais representativo em folhas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento, e Firmicutes no campo. A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento em estudo, com muitas espécies encontradas apresentando potencial para fixação de nitrogênio.

Palavras-chave: diversidade, bactérias endofíticas, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

Eucalyptus é um dos gêneros de planta mais cultivados em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, pelo rápido crescimento, adaptabilidade e valor comercial da madeira produzida (BROOKER, 2000). O rápido crescimento do eucalipto demanda alta disponibilidade de nutrientes, especialmente nitrogênio (SMETHURST *et al.*, 2004). Esse elemento pode ser obtido pela fixação biológica, realizada por bactérias de vida livre e por endofíticas (SUMMAN *et al.*, 2005; REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo da comunidade microbiana do eucalipto pode proporcionar melhor panorama das interações planta-micro-organismo, permitindo ampliar o entendimento da contribuição da microbiota associada para a nutrição florestal.

A parte aérea de várias plantas abriga ampla diversidade de micro-organismos, especialmente bactérias e fungos, com grande importância ecológica (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Essa diversidade tem sido alvo de vários estudos que revelam a presença de bactérias em diferentes órgãos do hospedeiro, influenciando sua sanidade e desenvolvimento (BRADER *et al.*, 2015). Micro-organismos endofíticos adaptam-se a ambientes específicos do corpo da planta e, ao colonizá-los (BULGARELLI *et al.*, 2013), podem estimular o crescimento vegetal por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de auxinas e seus análogos e pela síntese de giberelinas (WAQAS *et al.*, 2012). A interação eucalipto-bactérias endofíticas é pobremente documentada, sendo a maioria das pesquisas focada nos micro-organismos associados às raízes (BONITO *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2014).

A diversidade microbiana tem sido acessada em diversas plantas agronomicamente importantes pela utilização da análise molecular das comunidades microbianas por meio de métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) e independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Apesar da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de bactérias em *Eucalyptus* spp. (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), da importância das endofíticas como parte da comunidade microbiana dessas plantas (BRADER *et al.*, 2015) e do Brasil ser o maior produtor mundial dessa essência florestal, pouco se conhece sobre a microbiota endofítica associada ao eucalipto. Variações na estrutura dessa comunidade em função da idade da planta e das fases de desenvolvimento em viveiros comerciais são totalmente desconhecidas. Da mesma forma, a diversidade de bactérias com potencial de fixação de nitrogênio

sob essas mesmas condições necessita ainda ser caracterizada.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas, incluindo aquelas com potencial de fixação de nitrogênio, em associação com folhas de plantas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento em viveiros comerciais e em campo, combinando métodos dependentes e independentes de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Esse estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP - etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato

Fertilizantes	Doses* (kg/m ³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é 19° 24' 54”, a longitude 42° 25' 56” e a altitude 318 metros. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulínítico ou caulínítico-oxídico ou gibbsítico-oxídico, hipoférrico ou mesoférrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente, a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56,39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20 °C. Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato (0,05 mmol.L⁻¹), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de

sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspensionado e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspensionado *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Análise da Diversidade de bactérias totais e diazotróficas

A estratégia Nested-PCR foi utilizada para acessar a diversidade de bactérias totais em folhas de eucalipto por DGGE. O DNA total, na primeira PCR, foi utilizado como molde para amplificação do gene rRNA 16S, e, juntamente com primers P027/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005), produziram *amplicons* específicos que serviram de molde para a segunda PCR, com os primers 984GC/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005).

As PCRs foram realizadas em volume final de 25 μ L, sendo 5 μ L do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 μ M de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 μ M dos primers, 20 ng de molde e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 47 °C por 1 min, extensão por 2 min a 72 °C e extensão final durante 10 min a 72 °C.

O acesso à diversidade de bactérias potencialmente fixadoras de N em folhas de eucalipto foi obtido por PCR em duas reações: uma utilizando os primers polF/polR (POLY *et al.*, 2001) e outra substituindo polF por polFGC. As reações foram realizadas em volume de 50 μ L contendo tampão 1X, 1.5mM MgCl₂, 0.12mM of dNTPs, 0.3 μ M de cada *primer*, 1U Taq polymerase e 10 ng molde, submetidos a desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 0,5 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min e extensão final de 72 °C por 10 min. (MAPELLI *et al.*, 2013).

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após as PCRs foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermo- lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (37.5:1, acrilamida – N,N=–metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris–HCl, pH 8.0, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09% (v/v) TEMED (N,N,N=,N=–tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 40%–60% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em

tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e as imagens dos géis obtidas por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de bactérias totais e fixadoras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessas comunidades foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software sigmaplot (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Isolamento de bactérias endofíticas

As folhas desinfestadas de cada uma das fases de desenvolvimento do eucalipto foram utilizadas para estabelecer a densidade de bactérias cultiváveis por folha ([UFC] folha⁻¹). As folhas foram individualmente trituradas em homogeneizador em tubos contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7). A suspensão foi, então, filtrada em gaze esterilizada, e o filtrado diluído seriadamente em tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7.0). Alíquotas de 100 µL foram espalhadas em meio sólido R2A e incubadas a 28°C por 72 horas.

Extração de DNA de culturas puras

O DNA total das culturas puras crescidas em meio R2A líquido foi extraído utilizando o Kit de purificação de DNA (Promega™, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. A integridade e a quantidade de DNA extraído foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corados com Gel Red® 1000X, e as imagens obtidas utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

BOX-PCR

BOX-PCR foi realizado utilizando o primer BOX-A1R (VERSALOVIC *et al.*, 1994) para analisar a diversidade genômica em nível de isolado. A PCR foi preparada em volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão, 3,75 µL de MgCl₂ 25mmol, 0,5 µL de dNTPs 10 mmol, 1,25 µL de DMSO, 1,25 µL de BSA (soro albumina bovina), 0,5 µL oligonucleotídeos iniciadores BOX-A1R (10mM) e 0,25 µL de Taq DNA polymerase (BONIEK *et al.*, 2010), 1 µL de DNA e 15,25 µL de água mili-Q autoclavada. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94° C por 7 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min, extensão por 8 min a 65°C e extensão final durante 16 min a 65°C (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Os *amplicons* obtidos pela PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) a 100V durante 6 horas e corados com Gel Red® 1000X. As imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil). Para determinar a similaridade entre os isolados o gel de agarose contendo os produtos BOX-PCR foi analisado por UPGMA (agrupamento médio entre grupos) software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). O dendrograma resultante foi avaliado com base no coeficiente de Jaccard, o qual analisa a similaridade e a distância com base nas bandas obtidas. Isolados com valores de similaridade acima de 90% foram considerados iguais.

Amplificação e sequenciamento do rRNA 16S

Os *primers* universais P27F/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005) foram utilizados para amplificar o gene rRNA 16S dos isolados bacterianos diferenciados por BOX-PCR. A reação foi realizada contendo aproximadamente 20 ng de DNA, tampão (Promega), 2,25 mmol of MgCl₂, 210 mmol de cada *primer*, 250 µM of deoxinucleotídeos (dNTPs), e 0,02 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega). A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf-Germany) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 min, e extensão a 72°C por 1,5 min, com extensão final de 7 min a 72°C. Os *amplicons* foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) e o gel corado com Gel Red® 1000X. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank*

(NCBI). Para cada sequência bacteriana foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97%, identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências do gene rRNA 16S utilizando ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética baseado no alinhamento dessas sequências foi feito utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram obtidos por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica em folhas de plantas de eucalipto provenientes das fases do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e a campo foram examinadas por DGGE, cultivo em placa e sequenciamento do rRNA 16S. A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e potenciais fixadoras de nitrogênio. Essa abordagem permitiu a identificação de comunidades mais e menos abundantes pela presença de bandas mais e menos intensas nos géis (Figuras 1 e 2). A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes fases de desenvolvimento dessa planta (Figura 2).

O perfil de bandas e a análise de agrupamento mostraram que a comunidade bacteriana endofítica em folhas de eucalipto foi homogênea, com alta similaridade, e as populações mais distintas estão presentes no jardim clonal e no campo. Essas duas fases mostraram a formação de dois grupos distintos, com menor similaridade que os demais (Figura 1). Portanto, a comunidade bacteriana endofítica de eucalipto variou em relação às fases de desenvolvimento dessa

planta.

Em comparação com a comunidade de bactérias endofíticas totais, a de diazotróficos revelou-se mais heterogênea entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, pelo menor número de agrupamentos distintos. A comunidade de endofíticas diazotróficas no campo é distinta das outras etapas de desenvolvimento, com valores de similaridade inferiores a 58,3% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelas diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). A DGGE mostrou sensibilidade em detectar diferenças na comunidade endofítica diazotrófica em folhas de eucalipto, sendo o gene *nifH* marcador molecular eficiente para verificar diferenças de forma rápida na diversidade e distribuição de diazotróficas endofíticas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas.

A distribuição de bandas revelou poucas alterações na estrutura da comunidade de bactérias endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto, sendo que a maior parte delas foi ocasionada pelas bactérias diazotróficas (Figura 3). A maioria das UTOs é compartilhada entre as fases de desenvolvimento das plantas para ambas as comunidades. Entretanto, a presença de UTOs específicas é evidente, o que reflete as diferenças na estrutura da comunidade nas folhas provenientes do campo (Figura 3). Essas mudanças demonstraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a comunidade de bactérias endofíticas nas condições avaliadas, fato mais evidenciado entre as bactérias diazotróficas.

Os índices de diversidade de Shannon e de riqueza foram calculados para as comunidades de bactérias endofíticas em interação com as folhas de eucalipto. A diversidade e a riqueza de bactérias endofíticas totais foram maiores nas folhas provenientes do campo (Figura 4). De forma distinta, para as bactérias diazotróficas, as maiores médias desses índices foram obtidas para as amostras de folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo (Figura 5). Esses resultados indicam que as fases de desenvolvimento de eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias diazotróficas endofíticas do que a de bactérias totais. As folhas provenientes do jardim clonal e da expedição foram as que mostraram as menores médias de diversidade e de riqueza de bactérias endofíticas diazotróficas (Figura 5).

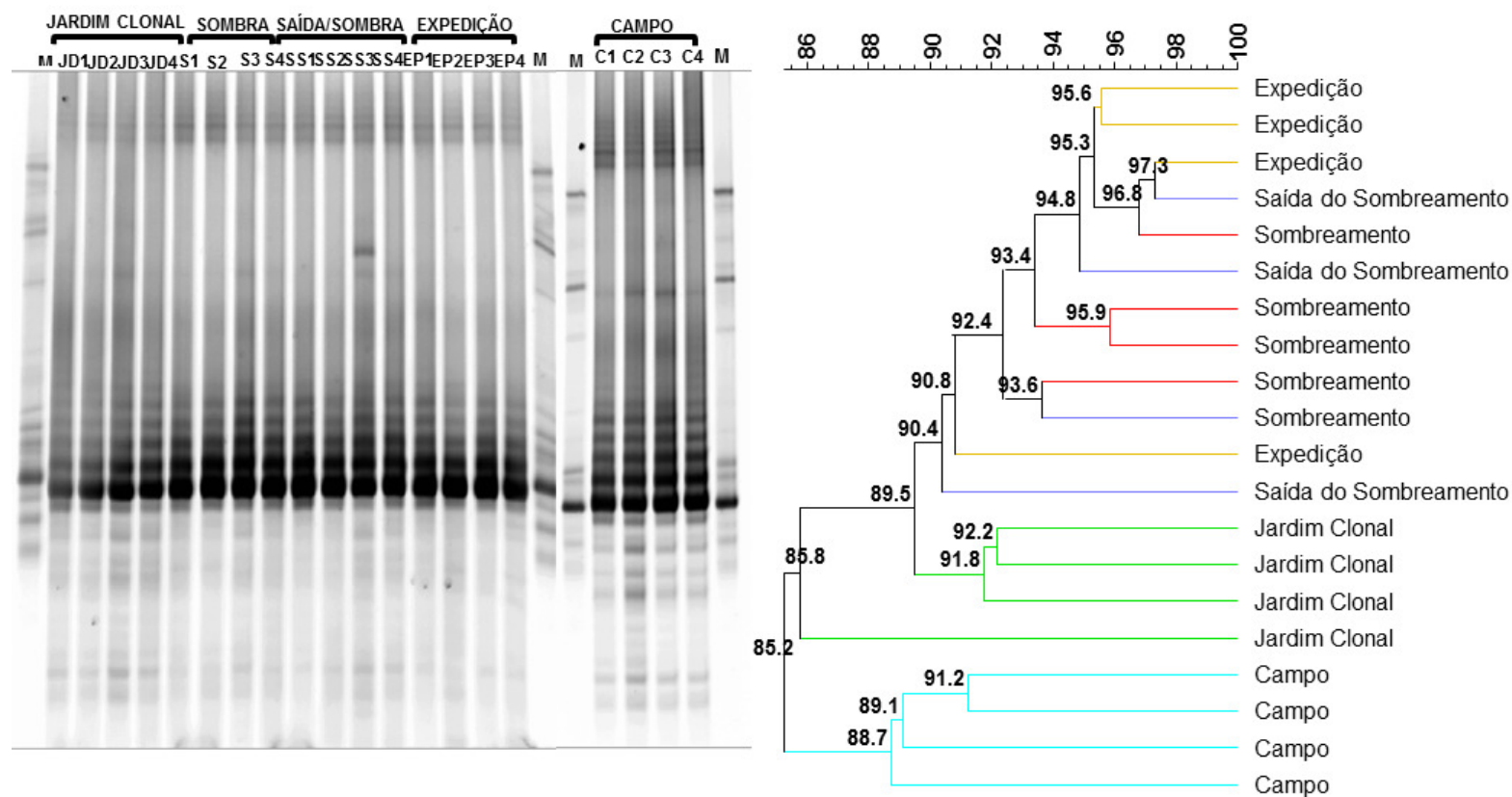


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes rRNA 16S. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene rRNA 16S das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

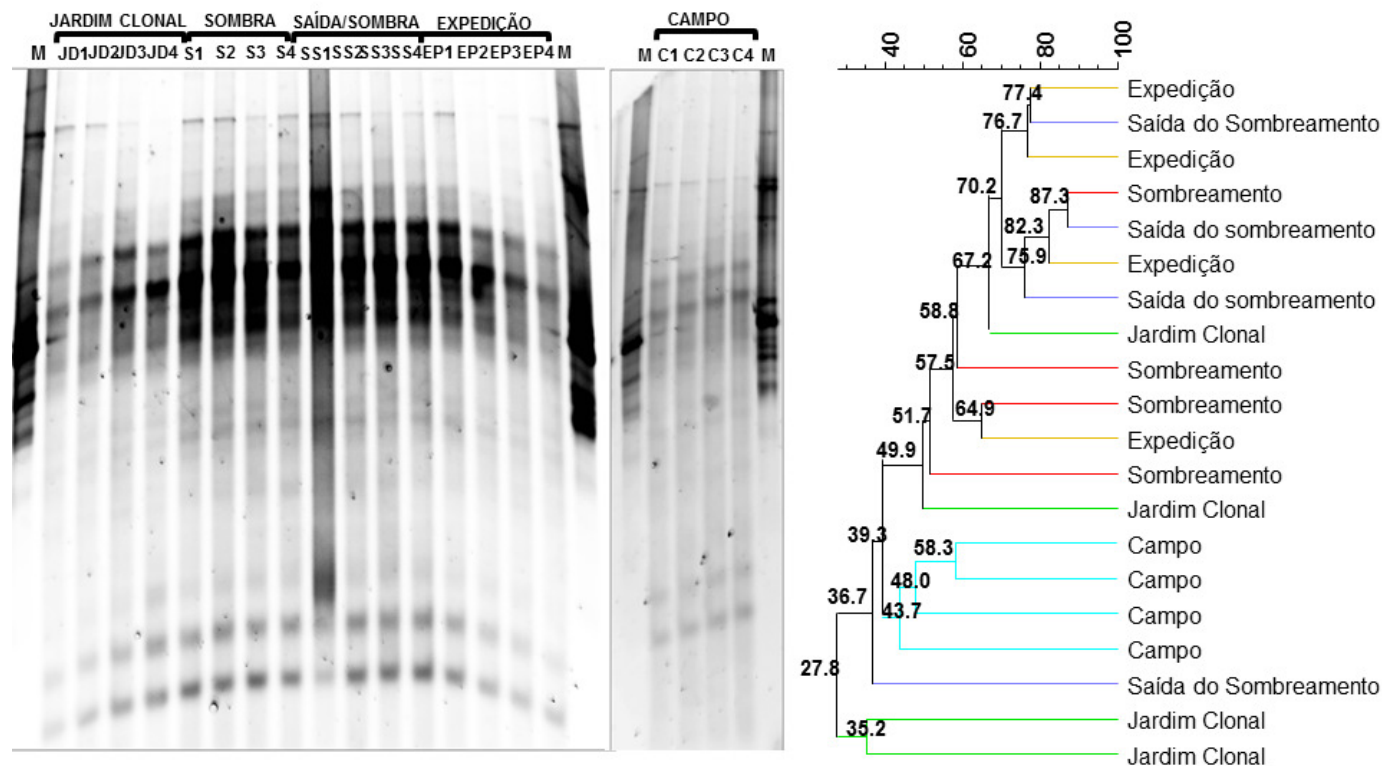


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes *nifH*. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém- saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene *nifH* das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

Os isolados com perfil genômico distinto, segundo a técnica de BOX-PCR, e com índices de similaridade inferiores a 90% (dados não publicados) foram identificados por sequenciamento do rRNA 16S e comparados com sequências obtidas pelo algoritmo BLAST (NCBI). O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria (Figura 6). Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, seja no viveiro ou em campo. As sequências de rRNA 16S obtidas de 32 isolados apresentaram alta identidade com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Entre essas sequências, somente duas, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores de identidade inferiores a 97%. Esses isolados foram identificados apenas em nível de gênero, e os demais, em nível de espécie (Figura 6).

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento das plantas, já que apenas 27% das espécies identificadas foram isoladas em mais de uma etapa, como *Bacillus flexus*, presente desde as folhas do jardim clonal até as do campo (Figura 6). A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S (44%) foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento (35%). A colonização endofítica pelo gênero *Bacillus* em folhas de eucalipto inicia-se no jardim clonal e se estende em etapas subsequentes em que são encontradas as espécies *B. flexus*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Figura 6).

A análise filogenética das sequências de rDNA 16S com identidades acima de 97% confirmou que a comunidade de bactérias endofíticas em folhas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto pertencem aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, pela formação de clados distintos com altos *bootstraps* (Figuras 7). Os *bootstraps* apresentados pela maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007) (Figura 7).

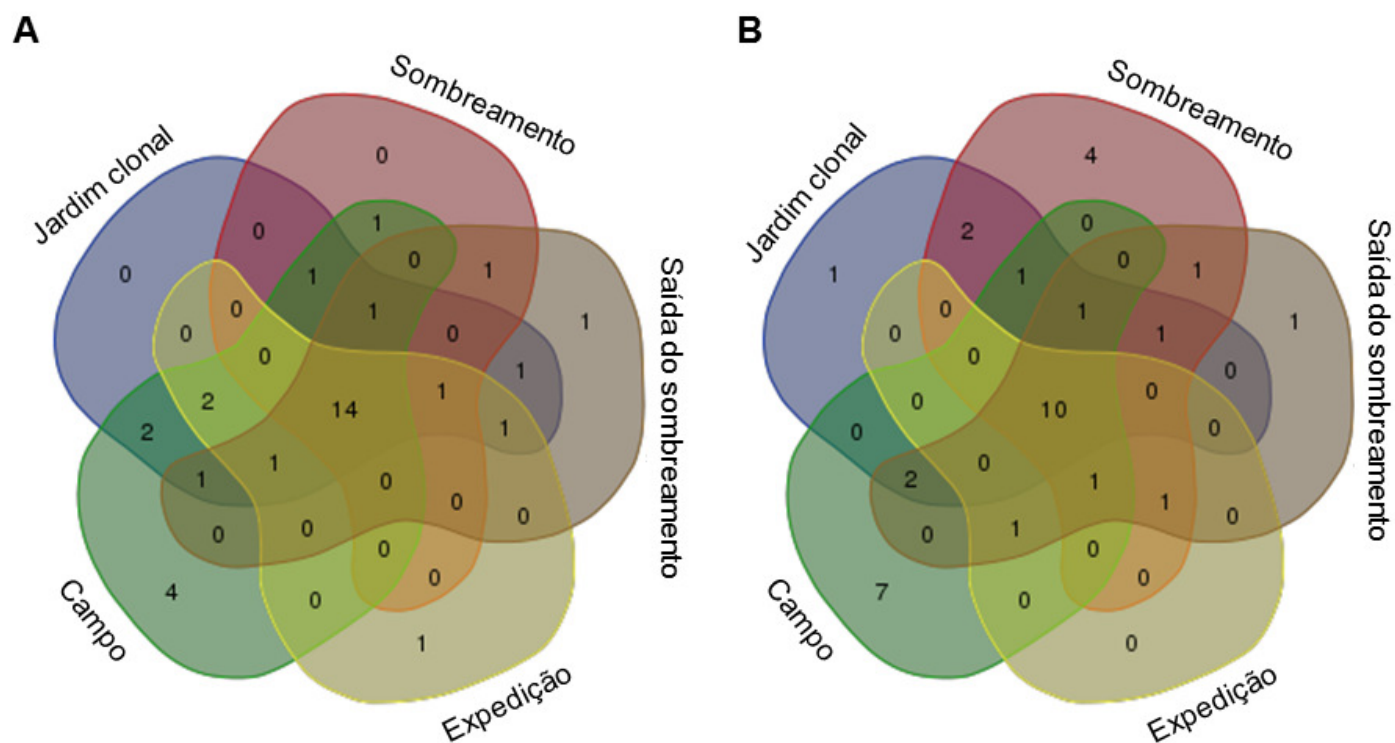


Figura 3: Distribuição de UTOs de bactérias endofíticas totais (A) e potencialmente diazotróficas (B) pelo diagrama de venn em diferentes etapas de desenvolvimento das folhas de eucalipto: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo.

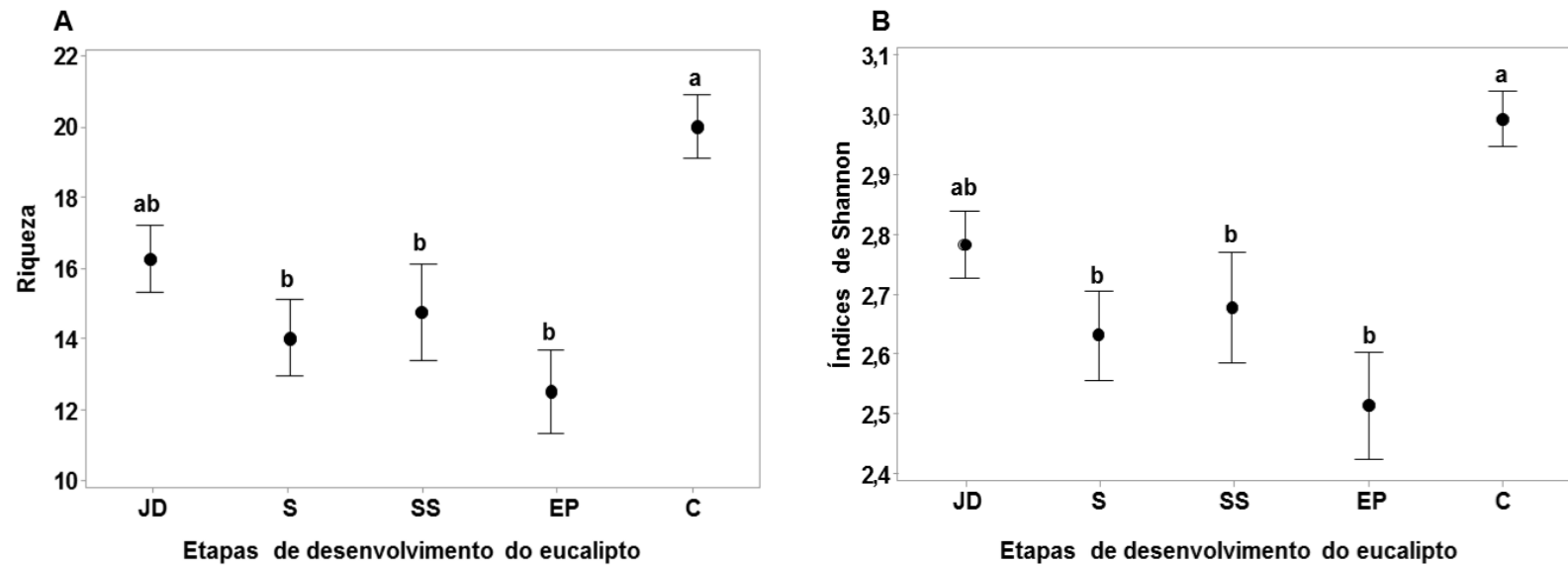


Figura 4: Perfil de Riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas totais provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

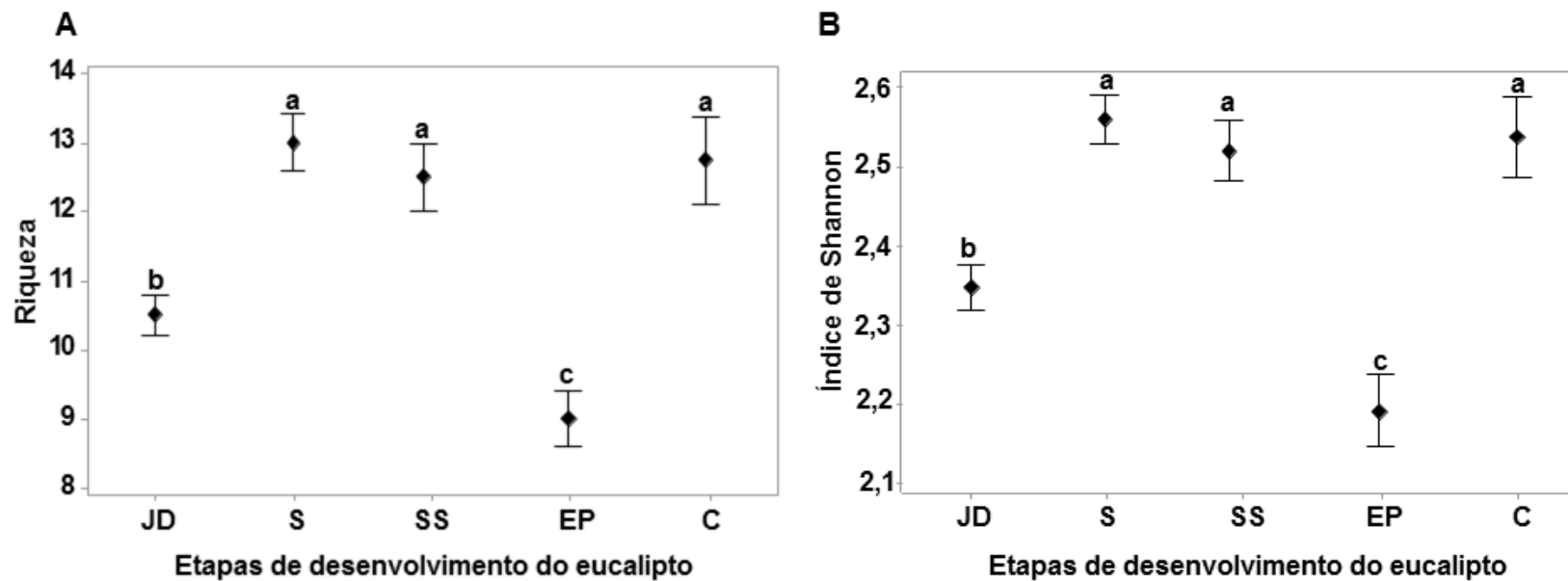


Figura 5: Perfil de riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise filogenética das sequências revelou que a maioria delas pertence ao filo Gammaproteobacteria, em que se destacam os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Firmicutes e Alphaproteobacteria são os filos que apresentaram o maior número de gêneros distintos. Betaproteobacteria foi o filo menos representativo entre os encontrados, sendo o isolado BAC 06 identificado como *Massilia timonae* e próximo filogeneticamente a *Massilia timonae* (Figura 7). Entre os Firmicutes, *Bacillus* foi gênero predominante (Figura 6) com *bootstrap* 99 (Figura 7). *Paenibacillus terrigena* (BAC 33) e *Paenibacillus darwinianus* (BAC 29), colonizadoras exclusivas da expedição e do campo, respectivamente, ainda não foram documentadas em interação endofítica com plantas. *Terrabacter lapilli* (BAC 32) é a única actinobacteria isolada de folhas de eucalipto que ainda não foi registrada como endofítica. Alphaproteobacteria contribui com a presença de muitas bactérias diazotróficas, o que inclui *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium grahamii* e *Rhizobium pusense* (Figuras 6 e 7). O isolado BAC 16, identificado como *Rhizobium pusense* (Figura 6), agrupou com alta sustentação filogenética com *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium pusense* (Figura 7). Nesse filo, *Rhizobium grahami* (BAC 25) e *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) foram pela primeira vez identificadas como endofíticas (Figura 6). Essas duas espécies foram isoladas de mudas de eucalipto recém-saídas do sombreamento, não persistindo as demais fases de desenvolvimento da planta. *Novosphingobium barchamii* apresentou proximidade filogenética com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7). Para a maioria dos isolados essa análise (Figura 7) confirmou a identificação realizada pela comparação com as sequências encontradas no BLAST (Figura 6). Outra espécie acrescida ao universo das endofíticas é a Gammaproteobacteria *Stenotrophomonas panacihumi* (Figuras 6 e 7), isolada de mudas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento (Figura 6). Portanto, as folhas de eucalipto sustentam uma comunidade de bactérias endofíticas diversa e dependente das fases de desenvolvimento dessa planta.

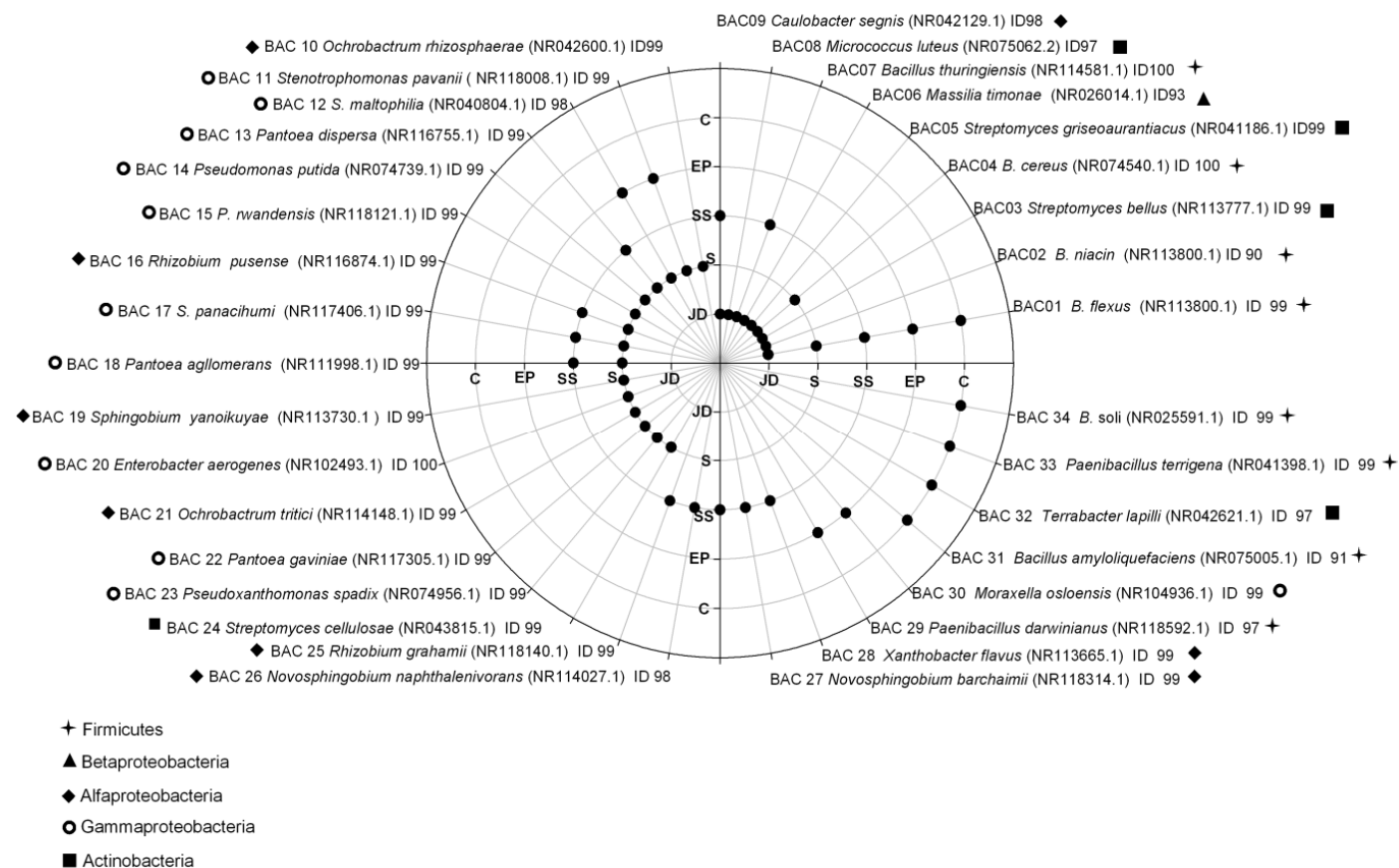


Figura 6: Distribuição das espécies de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; 1, 2, 3 e 4: Repetições. As espécies estão acompanhadas do número de acesso do *GenBank* (NCBI) e dos valores de identidades (ID) em porcentagem.

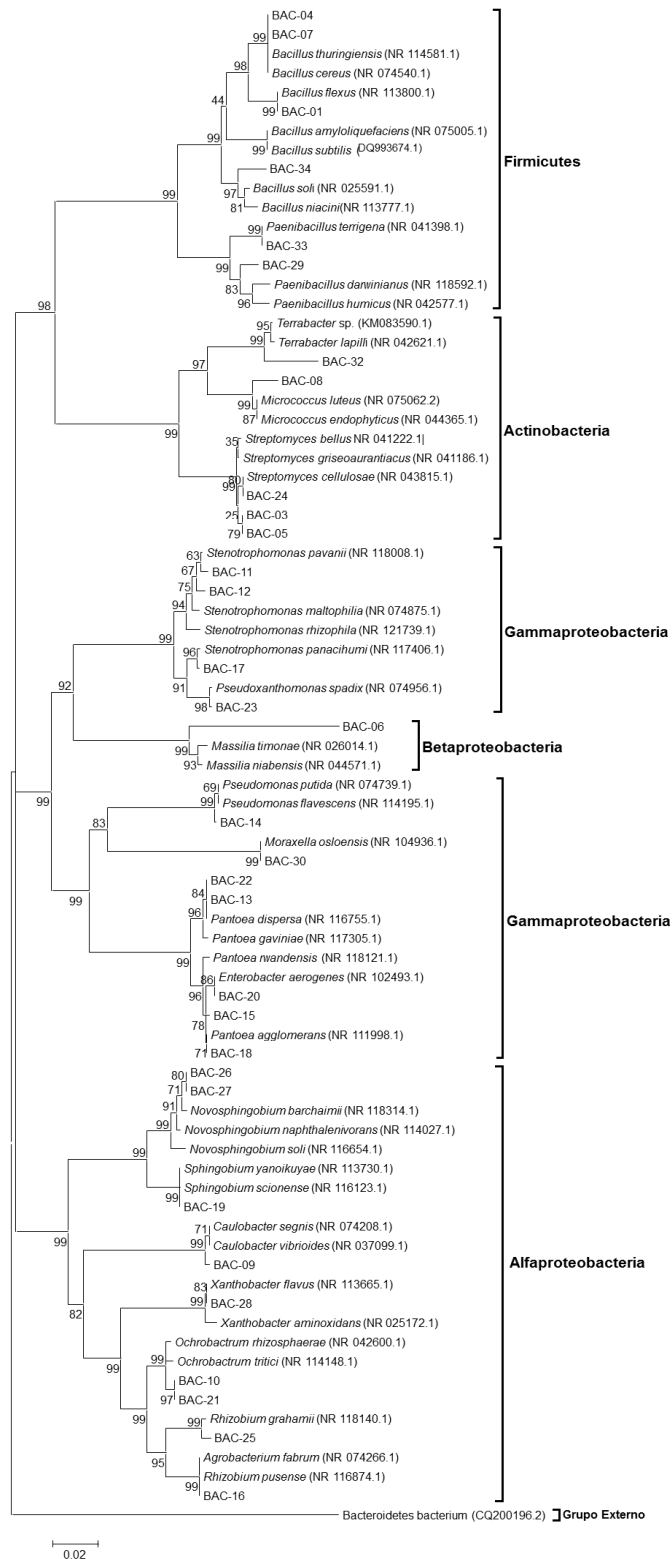


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 16S de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A amplificação do gene rDNA 16S e a separação dos *amplicons* por DGGE mostrou eficiência no acesso à diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto. Através do sequenciamento dos isolados e identificação por busca no NCBI, mais informações sobre essa comunidade foram obtidas. Com essas informações, as sequências e a filogenia foram conhecidas. DGGE é boa escolha para avaliação da diversidade das interações planta-micro-organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2013), sendo o método semiquantativo rápido para descrição de comunidades microbianas complexas (PETERSEN & DAHLLOF, 2005). O estudo dessas interações é importante, uma vez que o interior das plantas é habitat de grande diversidade de micro-organismos endofíticos que desempenham papéis relevantes na sanidade e no desenvolvimento das plantas (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Ao adaptarem-se a esse ambiente e colonizá-lo, os micro-organismos endofíticos expressam potencial metabólico diferenciado dos micro-organismos de vida livre (BRADER *et al.*, 2014).

A análise de agrupamento das bandas de DGGE de fragmentos rRNA 16S exibiu separação eletroforética clara e a formação de grupos distintos. Esses agrupamentos foram menos evidentes na comunidade de bactérias diazotróficas comparada com a de bactérias totais com valores de similaridade inferiores a 30% entre as fases de desenvolvimento do eucalipto. Essas pequenas porcentagens de similaridade (Figura 1) indicam alta variação entre os grupos bacterianos (ALTIMIRA *et al.*, 2012) nas folhas de eucalipto. Entretanto, a comunidade de endofíticas diazotróficas no campo parece recrutar uma microbiota própria, a qual é distinta das outras etapas de desenvolvimento da planta, com similaridade entre 43 e 58% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelos potencialmente diazotróficos presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). O gene *nifH* utilizado na DGGE mostrou ser marcador molecular eficiente em verificar diferenças na diversidade e distribuição da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas em folhas de eucalipto. Essa abordagem consistente proporciona a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes nessa comunidade (Figura 2). Esses resultados mostraram que essas fases modulam a comunidade de bactérias endofíticas, sendo que muitas delas têm potencial para estimular o crescimento vegetal por fixação de nitrogênio. Essa capacidade possibilitaria condições para a melhoria da nutrição das plantas pela presença da enzima nitrogenase (OLDROYD & DIXON, 2014). Este estudo pode,

então, fornecer contribuições para a busca de soluções biotecnológicas para resolver o problema do nitrogênio em plantas.

A diversidade de bactérias endofíticas em árvores é estudada com menor frequência quando comparada a outras plantas (EL-DEEB *et al.*, 2013; KUKLA *et al.*, 2014; MIGUEL *et al.*, 2013). Em *Eucalyptus*, pouco se conhece sobre as interação planta-bactéria, e os estudos existentes enfatizam o solo (DA SILVA *et al.*, 2014), a rizosfera e as raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010), os caules (PROCÓPIO *et al.*, 2009) e as sementes (FERREIRA *et al.*, 2008).

A modulação da composição das comunidades de bactérias endofíticas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto é evidenciada pelos maiores índices de riqueza e diversidade nas folhas provenientes do campo (Figura 4). Embora o perfil de diversidade da comunidade endofítica diazotrófica seja distinto, pois as maiores médias dos índices foram obtidas em folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo, as etapas de desenvolvimento da planta também modulam essa comunidade (Figura 5). As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas do que as de bactérias totais.

Índices de diversidade são essenciais nesse tipo de abordagem entre comunidades (MOHAMMAD & RAWASHDEH, 2015), e as mais diversas apresentam maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2011). Os índices encontrados neste estudo estão entre aqueles comumente citados na literatura (Figura 4), que mostram valores variando entre 1,5 e 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). As diferenças na diversidade de bactérias endofíticas podem ser atribuídas às concentrações distintas de açúcares encontradas nesse ambiente, aliada às variações catabólicas encontradas na maioria das bactérias heterotróficas filogeneticamente próximas (RODIONOV *et al.*, 2010). A fixação de nitrogênio requer a utilização de fontes de carbono e energia, e os gêneros que apresentam essa capacidade podem ser distintos em tempo de geração, taxa de crescimento e quantidade consumida de carboidratos (NAHER *et al.*, 2008). Em cianobactérias a clivagem da sacarose é essencial no metabolismo do carbono e fixação do nitrogênio (FIGUEROA *et al.*, 2013). Assim, em etapas com concentrações superiores de sacarose pode haver predomínio de bactérias diazotróficas que, à semelhança de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, utilizariam sacarose como fonte de energia (VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto é composta pelos filos Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta-, e Gamma) e Actinobacteria. As

bactérias endofíticas isoladas e identificadas por sequenciamento do rRNA 16S, em sua maioria, mostraram identidades superiores a 97% com as sequências depositadas NCBI, e somente dois isolados, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores inferiores a esse (Figura 6). Em geral, identidades acima de 97% são adotadas em estudos de filogenia como padrão para conceituação de organismos da mesma espécie (AL-BATAYNEH *et al.*, 2011), embora autores reconheçam que valores entre 98,5 e 99% são mais desejáveis e consistentes (STACKEBRANDT & EBERS, 2006). A confiabilidade dos alinhamentos foi confirmada utilizando-se o *e-value* (dados não mostrados), o qual indica a probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de bases, outro alinhamento com escore igual ou superior (KERFELD & SCOTT, 2011). Os isolados com identidades inferiores a 97% foram classificados em nível de gênero, após alinhamentos das sequências obtidas por sequenciamento do rDNA 16S com sequências correspondentes do NCBI (Figura 6).

O principal filo encontrado em plantas sombreadas e recém-saídas do sombreamento foi Proteobacteria, classes Alfa-, Beta- e Gamma (Figura 6). Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria apresentam habilidade em catabolizar carboidratos simples e complexos (LI *et al.*, 2014), o que facilita a adaptação ao habitat endofítico. A análise da diversidade da comunidade de folhas por meio das sequências de rRNA 16S, em abordagens dependentes e independentes de cultivo tem mostrado a dominância de Proteobacteria (BULGARELLI *et al.*, 2013). Entre os micro-organismos encontrados, muitos são potencialmente diazotróficos (Figura 6) (KÖBERL *et al.*, 2013), com a presença do gene *nifH*, o qual está relacionado à fixação de nitrogênio (WEBER *et al.*, 2013). Bactérias pertencentes à Firmicutes geralmente predominam na rizosfera (BODENHAUSEN *et al.*, 2013); porém, muitas de suas espécies apresentam boa adaptação ao estilo de vida endofítico (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa colonização frequentemente tem origem na infecção de bactérias do solo nas junções das raízes laterais e na rápida disseminação pelos espaços intercelulares do sistema radicular (CHEN & ZHU, 2015). Entretanto, a maioria das bactérias endofíticas isoladas das diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto demonstrou interação etapa-específica, com poucas delas colonizando mais de uma etapa (Figura 6).

A presença de espécies específicas em cada etapa na comunidade endofítica indica que parte dela pode não ser originária do solo, e sim alcançar o interior da folha pelos estômatos, ferimentos, ou outras portas de entrada (ROMERO *et al.*, 2014). Nesse novo habitat, Proteobacteria pode ter crescido e

proliferado mais rapidamente em fontes de carbono mais prontamente disponíveis (LEFF *et al.*, 2014) no sombreamento e na saída do sombreamento (capítulo 2). Assim, a comunidade de endofíticas pode ser influenciada pela composição e concentração de açúcares e aminoácidos. Plantas mais jovens e em sombreamento apresentam maiores conteúdos de aminoácidos (CHEN & POLAND, 2009; STEINBAUER *et al.*, 2013). Muitos gêneros de Proteobacteria utilizam preferencialmente ácidos orgânicos ao invés de açúcares (PORTAIS & DELORT, 2002), o que também pode ter contribuído para a predominância de Proteobacteria nessas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figura 6).

O predomínio de Firmicutes nas folhas oriundas do campo (Figura 6) pode ser atribuído às maiores concentrações de açúcares (capítulo 2) acompanhadas dos menores teores de aminoácidos (STEINBAUER, 2013). Entretanto, *Bacillus flexus* mostrou-se abundante em todas as fases de desenvolvimento (Figura 6), podendo o início da colonização desse gênero ocorrer no jardim clonal, evidenciado pela ocorrência de algumas de suas espécies em mais de uma fase de desenvolvimento das mudas (Figura 6). A colonização e permanência de *Bacillus flexus* indica a existência de maquinaria genética específica para colonização e persistência em folhas de eucalipto, sendo um endofítico competente (HARDOIM *et al.*, 2008), generalista e com maior capacidade competitiva. Folhas são um habitat mais dinâmico em comparação com a rizosfera e a comunidade microbiana em interação com ela está mais sujeita a variações de temperatura, umidade e radiação durante o dia e a noite, fatores que mudam a comunidade microbiana e a fisiologia da planta (TURNER *et al.*, 2013).

A versatilidade metabólica de bactérias do gênero *Bacillus* confere maior resistência e resiliência desses micro-organismos em vários ambientes com temperaturas, concentrações de sais e pH variáveis (AQEL *et al.*, 2012). Durante as etapas de desenvolvimento do eucalipto ocorrem mudanças na fisiologia da planta (MANKESSI *et al.*, 2010), as quais podem ser responsáveis por modificar a comunidade de bactérias endofíticas. Essas mudanças permitem às bactérias endofíticas multiplicarem-se rapidamente e predominarem em condições favoráveis, mantendo latência em condições menos propícias ao crescimento e proliferação. Bactérias endofíticas em interação com eucalipto podem ser relevantes para a fisiologia da planta e proporcionar tolerância a fatores bióticos e abióticos. Essas características aumentam a sobrevivência e o crescimento da planta em condições adversas e em competição com patógenos (GAIERO *et al.*, 2013). Acrescente-se, ainda, a produção de grande variedade de reguladores de crescimento como

giberelinas, ácido abscísico e auxinas (GAIERO *et al.*, 2013).

A análise filogenética das sequências de rRNA 16S confirmou que a comunidade de endofíticas em folhas de eucalipto está incluída em Firmicutes, Proteobacteria (Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria pela formação de clados distintos (Figura 7). Os *bootstraps* acima de 95 (Figura 7) na maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007). Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Esses gêneros são fixadores de nitrogênio e produtores e excretadores de AIA e aminoácidos (LIBA *et al.*, 2006). Esses metabólitos liberados pelos endofíticos podem ser utilizados pela planta e aumentar sua taxa de crescimento (KEMBEL *et al.*, 2014). A fixação de nitrogênio é amplamente difundida entre bactérias e essa capacidade pode proporcionar uma oportunidade para melhorar a nutrição de plantas (OLDROYD & DIXON, 2014). Entre as Proteobacterias fixadoras de nitrogênio estão dois isolados de *Rhizobium* (Figura 6), com alta identidade e *bootstrap*, geneticamente relacionados com *Agrobacterium*, *Ochrobactrum rhizosphaerae* e *Ochrobactrum tritici* (Figura 7).

Ochrobactrum rhizosphaerae foi descrita recentemente no solo com capacidade de utilizar sacarose e frutose como fontes de carbono (KAMPFER *et al.*, 2008), sendo neste estudo descrita aqui como endofítica em eucalipto. *Xantobacter flavus* é outra fixadora de N descrita há 36 anos com sistema similar a *Azotobacter* e utiliza muitos ácidos orgânicos. A maioria dos carboidratos é utilizada por esses micro-organismos após incubação prolongada (MALIK & CLAUS, 1979). Essas bactérias formam um clado distinto com alto *bootstrap*, o que garante a proximidade filogenética entre elas. Os genes de fixação de nitrogênio presentes podem ser uma das características que as aproximam filogeneticamente.

A maioria dos Firmicutes isolados das várias fases de desenvolvimento do eucalipto pertencente ao gênero *Bacillus* e o filo Alfaproteobacteria foi o que contribuiu com o maior número de gêneros distintos (Figura 6). *Bacillus* geralmente é a bactéria endofítica mais encontrada, sendo fonte de várias enzimas com grande potencial biotecnológico, como amilases, proteases, celulasas e lipases (KANNAN *et al.*, 2015). Essas enzimas parecem ser fundamentais para o início da colonização endofítica (SEO *et al.*, 2010). Esses micro-organismos são capazes de produzir auxinas e giberelinas, em adição à fixação de nitrogênio, e secretar substâncias importantes no controle biológico de patógenos (BACON *et al.*, 2015).

O filo Betaproteobacteria foi o menos representativo entre os isolados e BAC 06 foi identificado como *Massilia timonae* (Figuras 6 e 7). Essa espécie é

colonizadora da rizosfera, raízes (OFEK *et al.*, 2012) e folhas (JACKSON *et al.*, 2013) e promotora de crescimento pela produção de AIA, sideróforos em várias espécies de planta. A sensibilidade de *Massilia timonae* à competição (OFEK *et al.*, 2012) pode ser a causa da incapacidade dela em manter-se em outras fases de desenvolvimento do eucalipto, fato que pode ter ocorrido também com outras espécies (Figura 6). Essa comunidade bacteriana endofítica em eucalipto é diversa e dependente dessas fases. Muitas delas são potencialmente diazotróficas e podem contribuir para a fixação de nitrogênio e promoção de crescimento (Figura 6).

A comunidade bacteriana endofítica em eucalipto *Eucalyptus* difere de acordo o órgão de isolamento, área geográfica do cultivo e a espécie de planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). Os poucos estudos existentes envolvendo essa planta mostraram a presença de *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp, *Curtobacterium* sp, *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* (CASTELLANOS *et al.*, 2010).

As espécies isoladas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto ainda não foram registradas em interação endofítica com essa planta. Este estudo, portanto, contribuiu com a inclusão de novas endofíticas em *Eucalyptus*, inclusive aquelas com potencial para fixação de nitrogênio (Figuras 6 e 7). O gênero *Novosphingobium* já foi descrito como endofítico (CASTRO *et al.*, 2014); entretanto, esse é o primeiro registro da espécie *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) como endofítica. Essa espécie está filogeneticamente relacionada com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7) e apresenta maquinaria genética que possibilita a adaptação em diversos habitat como solo, sedimentos e ambientes aquáticos (ADDISON *et al.*, 2007). O interior das folhas de eucalipto recém-saídas do sombreamento é outro importante habitat ocupado por *Novosphingobium barchamii* (Figura 6 e 7). Essa espécie utiliza glicose, sacarose e ramnose como fontes de carbono sendo isolada de solos contaminados com o inseticida hexaclorociclohexano (NIHARIKA *et al.*, 2013). *Rhizobium grahamii*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*

e *Terrabacter lappili* são outras novas espécies endofíticas isoladas de folhas de eucalipto (Figuras 6 e 7). Os altos valores de identidade e *bootstrap* confirmam a identificação dessas espécies como endofíticas (Figura 7). *Rhizobium* é comumente citado como endofítico em várias plantas, porém, a literatura consultada não aponta *Rhizobium grahami* como um deles. Essa bactéria pertence a um novo grupo filogenético de rizóbio, juntamente com *Rhizobium mesoamericanum* e outros (ALTHABEGOITI *et al.*, 2014). A presença de *Stenotrophomonas panacihumi* em interação com plantas é inédita (Figura 6), sendo até o momento encontrada apenas em solos cultivados com plantas medicinais (YI *et al.*, 2010). *Stenotrophomonas panacihumi* mostrou proximidade filogenética com *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas pavani* e *Stenotrophomonas maltophyla* (Figura 7), sendo essas duas últimas isoladas como endofíticas fixadoras em cana-de-açúcar (RAMOS *et al.*, 2014). *P. darwinianus* e *Panibacillus terrigena* são espécies incluídas em Firmicutes, o filo mais abundante entre os grupos bacterianos no ambiente como solos da Antártica (DSOUZA *et al.*, 2014), e rizosfera de bambú (HAN *et al.*, 2009). A habilidade de bactérias desse gênero em colonizar vários ambientes é atribuída à diversidade fisiológica pela formação de endósporos resistentes a estresse, à secreção de enzimas extracelulares e a compostos antimicrobianos. A presença dessas enzimas garante a hidrólise de uma variedade de carboidratos (PRIEST, 2009). A colonização inédita de *Panibacillus darwinianus* e *Panibacillus terrigena* em eucalipto ocorreu em plantas oriundas da expedição e campo, respectivamente (Figura 6). O filo actinobacteria é pouco explorado como fonte de novas bactérias endofíticas. Entretanto, mais recentemente, o número de relatos vem aumentando em várias plantas (BODENHAUSEN *et al.*, 2013; MIGUEL *et al.*, 2013; ROMERO *et al.*, 2014; LEFF *et al.*, 2014). Neste estudo, *Terrabacter lappili*, isolada de folhas de eucalipto em campo, é mais uma actinobacteria incluída entre as endofíticas (Figuras 6 e 7).

A comunidade bacteriana endofítica é parte importante do microbioma de eucalipto. Entre as bactérias que compõem essa comunidade estão as endofíticas diazotróficas, que podem contribuir com o nitrogênio necessário ao crescimento dessa planta. Entretanto, novas abordagens envolvendo a expressão de genes *nifH*, responsáveis pela fixação de N fazem-se necessárias. A descrição da diversidade desses micro-organismos em diferentes fases de desenvolvimento possibilita melhor compreensão sobre a dinâmica da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de bactérias endofíticas é etapa importante para determinar outros possíveis benefícios da interação endofítico-eucalipto e

determinar o papel ecológico que elas têm nessa interação.

CONCLUSÕES

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio. A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou-se distinta em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria. Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas*, e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento. A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.

REFERÊNCIAS

- ADDISON, S. L., FOOTE, S. M., REID, N. M & LLOYD-JONES, G. *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2467-2471, 2007.
- AL-BATAYNEH, K. M., JACOB, J. H & HUSSEIN E. I. Isolation and molecular identification of new thermophilic bacterial strain of *Geobacillus pallidus* and

- Anoxybacillus flavithermus*. **International Journal Integrative Biology**. v. 11, p. 39-43, 2011.
- ALTHABEGOITI, M. J., ORMEÑO-ORRILLO, E., LOZANO, L., TEJERIZO, G. T., ROGEL, M. A., MORA, J & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Characterization of *Rhizobium grahamii* extrachromosomal replicons and their transfer among rhizobia. **BMC Microbiology**, 14, p. 1-14, 2014.
- ALTIMIRA, F., YÁÑEZ, C., BRAVO, G., GONZÁLEZ, M., ROJAS, L. A & SEEGER, M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-12, 2012.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.
- AQEL, H., AL-QUADAN, F & BOULENOUAR, N. Effects of temperature, pH-values and sodium chloride concentrations on the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by thermotolerant *Bacillus* strains. **Journal Bioscience Biotechnology**, v. 1, p. 57-65, 2012.
- BACON, C. W., PALENCIA, E. R & HINTON, D. M. (2015). Abiotic and Biotic Plant Stress-Tolerant and Beneficial Secondary Metabolites Produced by Endophytic *Bacillus* Species. In: **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets** (pp. 163-177). Springer India.
- BLACKWOOD, C. B., OAKS, A & BUYER, J. S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6193-6198, 2005.
- BODENHAUSEN, N., HORTON, M. W & BERGELSON, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.
- BONIEK, D., FIGUEIREDO, D., PYLRO, V. S & DUARTE, G. F. Characterization of bacterial strains capable of desulphurisation in soil and sediment samples from Antarctica. **Extremophiles**, v. 14, p. 475-481, 2010.
- BONITO, G., REYNOLDS, H., ROBESON, M. S., NELSON, J., HODKINSON, B. P., TUSKAN, G., SCHADT, C. W & VILGALYS, R. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3356-3370, 2014.
- BRADER, G., COMPANT, S., MITTER, B., TROGNITZ, F & SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 13, p. 79-148, 2000.
- BULGARELLI, D., SCHLAEPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de Bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CASTRO, R. A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., BATISTA, B. D., LUVIZOTTO, D. M., MARCON, J., FERREIRA, A., MELO, I. S & AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springer Plus**, v. 3, p. 1-10, 2014.
- CHEN, Y & POLAND, T. M. Interactive influence of leaf age, light intensity, and girdling on green ash foliar chemistry and emerald ash borer development. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 806-815, 2009.
- CHEN, C & ZHU, H. Are common symbiosis genes required for endophytic rice-rhizobial interactions? **Plant Signaling & Behavior**, v 8, p. 1-4, 2013.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-Fixing Bacteria in *Eucalyptus globulus* Plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- DSOUSA, M., TAYLOR, M. W., TURNER, S. J & AISLABIE, J. Genome-Based Comparative Analyses of Antarctic and Temperate Species of *Paenibacillus*. **PloS One**, v. 9, p. e108009, 2014.
- EL-DEEB, B., FAYEZ, K & GHERBAWY, Y. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 1, p. 56-64, 2013.
- FERREIRA, A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., ODA, S., AZEVEDO, J. L & ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, p. 8-14, 2008.
- FIGUEROA, C. M., DIEZ, M. D. A., KUHN, M. L., MCEWEN, S., SALERNO, G. L., IGLESIAS, A. A & BALLICORA, M. A. The unique nucleotide specificity of the sucrose synthase from *Thermosynechococcus elongatus*. **FEBS Letters**, v. 587, p. 165-169, 2013.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. D. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting

- switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, p.19-27, 2011.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.
- HAN, J., XIA, D., LI, L., SUN, L., YANG, K & ZHANG, L. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Microbial Ecology**, v. 58, p. 363-373, 2009.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16, p. 463-471, 2008.
- HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K & WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.
- JACKSON, C. R., RANDOLPH, K. C., OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- KÄMPFER, P., SESSITSCH, A., SCHLOTTER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J & SCHOLZ, H. C. *Ochrobactrum rhizosphaerae* sp. nov. and *Ochrobactrum thiophenivorans* sp. nov., isolated from the environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1426-1431, 2008.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMBEL, S. W., O'CONNOR, T. K., ARNOLD, H. K., HUBBELL, S. P., WRIGHT, S. J & GREEN, J. L. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 13715-13720, 2014.
- KERFELD, C. A & SCOTT, K. M. Using BLAST to Teach “e-value-evolutionary” Concepts. **PLoS Biology**, v. 9, p. 1-4, 2011.
- KÖBERL, M., SCHMIDT, R., RAMADAN, E. M., BAUER, R & BERG, G. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-9, 2013.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p.
- KUKLA, M., PŁOCINICZAK, T & PIOTROWSKA-SEGET, Z. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. **Chemosphere**, v. 117, p. 40-46, 2014.

- LEFF, J. W., DEL TREDICI, P., FRIEDMAN, W. E & FIERER, N. Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees. **Environmental Microbiology**, p. 1-10, 2014.
- LI, X.; RUI, J., XIONG, J., LI, J., HE, Z., ZHOU, J., YANNARELL, A. C., RODERICK, I. & MACKIE, R. I. Functional Potential of Soil Microbial Communities in the Maize Rhizosphere. **PloS One**, v. 9, p. 1-9, 2014.
- LIBA, C. M., FERRARA, F. I. S., MANFIO, G. P., FANTINATTI-GARBOGGINI, F.,

ALBUQUERQUE, R. C., PAVAN, C., RAMOS, P. L., MOREIRA-FILHO, C. A

& BARBOSA, H. R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated

from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate

and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1076-1086, 2006.
- MALIK, K. A & CLAUS, D. Xanthobacter flavus, a new species of nitrogen-fixing hydrogen bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 29, p. 283-287, 1979.
- MANKESSI, F., SAYA, A. R., BOUDON, F., GUÉDON, Y., MONTES, F., LARTAUD, M., VERDEIL, J. L & MONTEUUIS, O. Phase change-related variations of dome shape in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems. **Trees**, v. 24, p. 743-752, 2010.
- MAPELLI, F., MARASCO, R., ROLLI, E., BARBATO, M., CHERIF, H., GUESMI, A., OUZARI, I., DAFFONCHIO, D & BORIN, S. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- MOHAMMAD, I & ALRAWASHDEH, I. Genetic Diversity Determination for Peganum Harmala Species using Shannon's, Simposn, Eveness, Density and Richness Parameters In Jordan. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 5, n. 2, p. 1-5, 2015.

- NAHER, U. A., RADZIAH, O., HALIMI, M. S., SHAMSUDDIN, Z. H & RAZI, I. M. Specific growth rate and carbon sugar consumption of diazotrophs isolated from rice rhizosphere. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 1008 – 1014, 2008.
- NIHARIKA, N., MOSKALIKOVA, H., KAUR, J., SEDLACKOVA, M., HAMPL, A., DAMBORSKY, J., PROKOP, Z & LAL, R. *Novosphingobium barchaimii* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 667–672, 2013.
- OFEK, M., HADAR, Y & MINZ, D. Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). **PloS One**, v. 7, p. e40117, 2012.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- PETERSEN, D. G & DAHLLÖF, I. Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 339-348, 2005.
- POLY, F., RANJARD, L., NAZARET, S., GOURBIÈRE, F & MONROZIER, L. J. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2255-2262, 2001.
- PORTAIS, J. C & DELORT, A. M. Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can ¹³C-NMR tell us? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 375-402, 2002.
- PRIEST, F. G (2009) Genus I. *Paenibacillus*. In: DE VOS. P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W *et al.*, editors. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Firmicutes**. 2nd ed. New York, USA: Springer. pp. 1422.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- RAMOS, P. L., VAN TRAPPEN, S., THOMPSON, F. L., ROCHA, R. C., BARBOSA, H. R., DE VOS, P & MOREIRA-FILHO, C. A. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 926-931, 2014.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 14, P. 435-443, 2011.

- RODIONOV, D. A., YANG, C., LI, X., RODIONOVA, I. A., WANG, Y., OBRAZTSOVA, A. Y., ZAGNITKO, O. P., OVERBEEK, R., ROMINE, M. F., REED, S., FREDRICKSON, J. K., NEALSON, K. H & OSTERMAN, A. L. Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. **BMC Genomics**, v. 11, p. 494, 2010.
- ROMERO, F. M., MARINA, M & PIECKENSTAIN, F. L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, p. 187-194, 2014.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, v. 33, p. 152-155, 2006.
- STEINBAUER, J. Shoot feeding as a nutrient acquisition strategy in free-living psyllids. **PloS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.

- VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M., CRUZ-VÁZQUEZ, F., TREJO-CONTRERAS, M. J., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., BRAVO-PATÍÑO, A., CAJERO-JUÁREZ, M., CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P. & VALDEZ-ALARCÓN, J. J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 137-149, 2011.
- VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J & LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209-216, 2010.
- YI, H., SRINIVASAN, S & KIM, M. K. *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **The Journal of Microbiology**, v. 48, p. 30-35, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou-se eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de bactérias, fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade. Os fungos e leveduras dos filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica e de leveduras endofíticas.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilêmáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

A excisão, a eluição e o sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostraram ser boas técnicas para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto. Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto.

Em eucalipto, a relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a de levedura, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto.

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio.

A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto variou em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL

DIVERSIDADE E MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M635d Miguel, Paulo Sérgio Balbino, 1981-
2015 Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto /
Paulo Sérgio Balbino Miguel. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 125f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

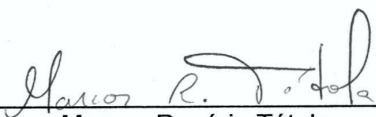
1. Eucalipto - Microbiologia. 2. Fungos.
3. Bactérias endofíticas. 4. Leveduras. 5. Filogenia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

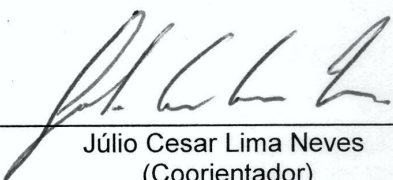
CDD 22 ed. 634.973766

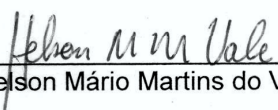
DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

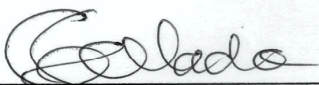
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de maio de 2015.


Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)


Júlio Cesar Lima Neves
(Coorientador)


Helson Mário Martins do Vale


Gleiber Quintão Furtado


Maurício Dutra Costa
(Orientador)

A Deus.

*À minha esposa,
à minha mãe e ao meu irmão.*

Dedico.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; mas os insensatos
desprezam a sabedoria e a instrução”. (Prov.1:7)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor e consumidor da minha fé.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pela orientação e pela confiança.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pela orientação no início deste trabalho.

Aos professores Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves, pela coorientação.

À minha amada esposa Mara, que me incentivou todos os dias com seu amor, dedicação, paciência, confiança e compreensão.

À minha mãe, D. Aparecida, que sempre lutou e me sustentou em oração.

Ao meu irmão Fábio, um grande amigo e incentivador.

Aos amigos Julio Delvaux, Marcelo Nagem e Bruno Coutinho Moreira, pelo apoio, pela amizade e pelo auxílio neste trabalho.

Aos irmãos da Igreja Metodista Wesleyana de Viçosa, pelas orações feitas pela minha vida.

A todos que de alguma forma me ajudaram na condução deste trabalho.

BIOGRAFIA

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL, filho de Francisco de Oliveira Miguel e de Aparecida de Fátima Balbino Miguel, nasceu em Astolfo Dutra – MG, no dia 19 de junho de 1981.

Em dezembro de 2008 graduou-se em Ciências Biológicas pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. Em fevereiro de 2011, obteve o título de *Magister Science* em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, e, em março do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da mesma instituição, submetendo-se à defesa da tese de doutorado em maio de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO GERAL	01
CAPÍTULO 1	04
INTRODUÇÃO.....	05
REVISÃO DE LITERATURA	06
Endofíticos	06
Colonização da planta.	08
Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos	11
Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos.....	13
Eucalipto	16
Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto	18
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2	29
RESUMO	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
Área de estudo.....	32
Amostragem	33
Descontaminação superficial das folhas de eucalipto	34
Extração de DNA metagenômico em folhas e exsudatos xilemáticos.....	34
Análises da diversidade de fungos endofíticos	35
Análise filogenética	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 3	57
RESUMO	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS	60
Áreas de estudo	60

Amostragem	61
Descontaminação superficial de folhas.....	61
Extração de DNA metagenômico em folhas.....	62
Extração de açúcares	62
Análise da diversidade de fungos e leveduras	63
Análise filogenética	65
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
CAPÍTULO 4	90
RESUMO	91
INTRODUÇÃO	92
MATERIAL E MÉTODOS	93
Área de estudo	93
Amostragem	94
Descontaminação superficial de folhas	94
Extração de DNA metagenômico	95
Análise da diversidade de bactérias endofíticas totais e diazotróficas.....	96
Isolamento de bactérias endofíticas.....	97
Extração de DNA de culturas puras	97
BOX-PCR.....	98
Amplificação e Sequenciamento do rRNA 16S	98
Análise filogenética	99
RESULTADOS	99
DISCUSSÃO	110
CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS.....	117
CONCLUSÕES GERAIS.....	124

RESUMO

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2015. **Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves.

Árvores pertencentes ao gênero *Eucalyptus* estão entre as mais cultivadas em todo o mundo. O rápido crescimento do eucalipto e a sua adaptabilidade a vários ambientes podem ser compreendidos pelo estudo da comunidade microbiana presente nessa planta. Essa comunidade é composta por micro-organismos endofíticos e epifíticos. Endofíticos colonizam os tecidos internos de plantas saudáveis sem causar sintomas ou efeitos negativos à planta. Neste estudo, foram avaliadas a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de plantas de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco. Avaliou-se, também, a diversidade de bactérias, fungos e leveduras em plantas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo. A diversidade microbiana foi relacionada à concentração de açúcares. Após extração de DNA de folhas e exsudatos xilemáticos, os *amplicons* obtidos por amplificação das subunidades do rRNA 16S, 18S e 26S foram utilizados na DGGE e as bandas eluídas dos géis foram sequenciadas. A avaliação da composição da comunidade bacteriana em folhas do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo também foi comprovada pelo isolamento e sequenciamento do rRNA 16S das colônias. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela idade das plantas e pela sazonalidade. A análise filogenética mostrou a dominância de fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota. Neste estudo, foi apresentado o relato inédito de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos em plantas. No viveiro, a colonização endofítica da parte aérea de eucalipto foi dependente das fases de desenvolvimento da planta. Neste estudo, foi relatada pela primeira vez a presença das leveduras dos gêneros *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia* e das espécies *Rhodosporidium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* como endofíticas em eucalipto. Bactérias dos filos Firmicutes, Proteobacteria, classes Alfa, Beta e Gamma, e Actinobacteria foram identificadas

na comunidade investigada. Nessa comunidade, as espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* foram identificadas pela primeira vez como endofíticas. Proteobacteria foi o filo mais representativo em folhas de mudas nas fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento; e Firmicutes, em plantas a campo. Observaram-se correlações negativas entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de diversidade e riqueza microbianas. A distribuição das espécies de fungos, leveduras e bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento da planta. Algumas espécies bacterianas encontradas apresentam potencial para fixação de nitrogênio.

ABSTRACT

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, May, 2015. **Endophytic microbial diversity in Eucalypts**. Adviser: Maurício Dutra Costa. Co-advisers: Marcos Rogério Tótola and Júlio César Lima Neves.

Plants belonging to the *Eucalyptus* genus are among the most cultivated in the world. Eucalypts are fast-growing plants and their ability to adjust to a variety of environments can be understood by studying the associated microbiome. Eucalypt microbiome is composed by endophytic and epiphytic microorganisms. Endophytes colonize the internal tissues of healthy plants without causing symptoms or negative effects. In this study, the endophytic fungal diversity and distribution were evaluated in leaf and xylematic exudates from 18- and 72-month-old eucalypt plants in the beginning of the rainy season, in the rainy season and in the dry season. The bacterial, fungal, and yeast diversity in plants from different developmental stages was also evaluated: clonal garden, shading, post-shading, expedition and field. The microbial diversity was correlated with the sugar concentration in leaves. Following DNA extraction from leaf and xylematic exudates, amplicons generated by the amplification of 16S, 18S, and 26S rRNA subunits were submitted to DGGE, and the bands excised were sequenced. Bacterial community composition in leaves from the clonal garden, shading, post-shading, expedition, and field was also evaluated and confirmed by isolating bacteria and sequencing the 16S rRNA from bacterial colonies. Endophytic fungal community in leaves was affected by plant age and seasonality. Phylogenetic analyses revealed the dominance of Basidiomycota and Ascomycota phyla during the development stages studied. In this work, the first report of *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi*, and *Teratosphaeriaecea* sp. as inhabitants of the xylematic exudates in plants is provided. In the nursery, endophytic colonization of eucalypt shoots was dependent on the plant developmental stages. In this study, the yeasts *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia*, *Rhodosporidium fluviale*, and *Aureobasidium pullulans* were described as endophytic for the first time. Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, and Gamma- classes) and Actinobacteria were identified in the endophytic community. *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, and *Terrabacter lappili* were identified as endophytic for the first time. Proteobacteria was the most represented phylum in

leaves from the shading and post-shading stages, while Firmicutes was the main phylum found in leaves of plants in the field. Negative correlations were observed between the glucose, fructose, and sucrose contents in leaves and the microbial diversity and richness indices measured. The distribution of endophytic fungal, yeast, and bacterial species in eucalypt revealed to be distinct and specific to the developmental stage of eucalypt plants. Some of the bacterial species found in eucalypt leaves show the potential for nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade de adaptação das plantas ao ambiente envolve interações com diferentes espécies de micro-organismos. Dentre essas, as interações endofíticas são amplamente conhecidas pelos benefícios proporcionados ao hospedeiro, os quais incluem o estímulo ao crescimento pela fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), a síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e a supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006). Os micro-organismos endofíticos encontram-se associados a plantas saudáveis, sem causar sintomas de doença ou danos. Podem melhorar o estado sanitário (CLARKE *et al.*, 2006) e o desenvolvimento da planta (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012), o que justifica o grande volume de pesquisas sobre esses micro-organismos (BRADER *et al.*, 2014).

O eucalipto está entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta e a sua elevada produção de biomassa demandam alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004). Muitos desses nutrientes podem ser absorvidos mais eficientemente quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Portanto, estudos envolvendo essas comunidades podem proporcionar melhor compreensão das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento das plantas (BRADER *et al.*, 2014). O entendimento da diversidade dos endofíticos em associação com as plantas pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

O acesso à diversidade microbiana pode ser obtido por abordagens moleculares por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos, proporcionando novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; DA SILVA *et al.*, 2014). Este estudo compreende quatro capítulos. O capítulo 1 teve como objetivo revisar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração e colonização e os métodos de identificação de micro-organismos na planta. No capítulo 2 foi estudada a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilêmáticos em plantas

de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. No capítulo 3 foi avaliada a diversidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento e relacionada à concentração de açúcares. No capítulo 4 foi investigada a diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto em plantas provenientes do jardim clonal, do sombreamento, recém-saídas do sombreamento, da expedição e do campo e relacionadas à concentração de açúcares.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS:
COLONIZAÇÃO, BENEFÍCIOS, IDENTIFICAÇÃO E
DIVERSIDADE EM EUCALIPTO**

INTRODUÇÃO

As plantas sustentam diversidade variável de micro-organismos, que podem influenciar o seu desenvolvimento (SUMAN *et al.*, 2005). Parte dessa diversidade é composta por bactérias (MIGUEL *et al.*, 2013), fungos (DESHMUKH *et al.*, 2006), arqueas e leveduras (OLIVEIRA *et al.*, 2013) endofíticos, os quais interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença (BULGARELLI *et al.*, 2013). Esses micro-organismos têm alto potencial de adaptação e muitos deles persistem ao longo de vários estádios de desenvolvimento da planta (HARDOIM *et al.*, 2008). Quando em interação, eles são responsáveis por estimular o crescimento por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e pela supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, sendo de grande valor econômico e alternativa viável para a indústria madeireira (FAO, 2015). As espécies e híbridos de eucalipto estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, e a madeira é usada para a produção de celulose em função da rápida taxa de crescimento, da adaptação a várias condições ecológicas e pela qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta demanda alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004), os quais podem ser melhor acessados quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo das comunidades microbianas associadas ao eucalipto pode proporcionar melhor entendimento das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento vegetal (BRADER *et al.*, 2014).

O acesso à diversidade microbiana pode ocorrer por métodos moleculares que dependem (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou não de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A diversidade microbiana em eucalipto é pouco documentada (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), malgrado a importância econômica da cultura para o país, que é o maior produtor mundial. O objetivo desta revisão foi levantar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração, colonização e os métodos de identificação desses micro-organismos na planta, com base em dados atuais sobre o assunto.

REVISÃO DE LITERATURA

Endofíticos

Micro-organismos são essenciais para a manutenção da vida na Terra, mas pouco se sabe sobre a diversidade microbiana presente no solo, nos oceanos, na atmosfera, nos seres humanos e nas plantas (TURNER *et al.*, 2013). No interior das raízes, nas folhas e em outras partes da planta, comunidades microbianas distintas proporcionam melhor acesso da planta aos nutrientes e auxiliam na supressão de diversas doenças (SMITH, 2014). O termo endofíticos se refere a micro-organismos que, em alguma fase de seu ciclo de vida, vivem em associação com plantas saudáveis, sem causar sintoma de doença ou prejuízo ao hospedeiro. Esses micro-organismos adaptam-se ao habitat específico representado pelo corpo das plantas, apresentando potencial metabólico distinto da microbiota do solo (BRADER *et al.*, 2014).

No contexto da interação endofítica, as bactérias que se destacam são pertencentes aos filos Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma), Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (BACON & HINTON, 2007). Já os fungos endofíticos estão distribuídos, em sua maioria, nos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011). A detecção dos micro-organismos endofíticos é realizada por métodos culturais ou moleculares (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A densidade populacional de micro-organismos endofíticos é variável e depende das espécies endofíticas, do genótipo da planta, do estágio de desenvolvimento, das condições ambientais (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO 2006), da localização do cultivo (FISHER *et al.*, 1993) e da parte da planta em associação (MAGNANI *et al.*, 2010). As associações endofíticas podem, ainda, mostrarem-se dependentes de muitos fatores, incluindo o tipo de hospedeiro, a densidade de plantas no local, a disponibilidade de nutrientes no solo e as interações com outros micro-organismos (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011).

O sucesso da colonização endofítica depende da expressão de genes cujos produtos serão importantes para a entrada e a sobrevivência do micro-organismo no interior do hospedeiro (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). A planta que abriga associações endofíticas compartilha recursos com os parceiros microbianos, codificando diversos transportadores no genoma que permitem a transferência de carbono de si para a microbiota associada (TAGHAVI *et al.*, 2010).

A interação endofítica pode impactar a nutrição, a adaptação e o desenvolvimento vegetal (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012) e, por meio

da competição, suprimir patógenos e melhorar a sanidade das plantas (CLARKE *et al.*, 2006; SATHISH *et al.*, 2012). Os micro-organismos endofíticos podem também beneficiar a planta pelo aumento da resistência a estresses abióticos (NAGABHYRU *et al.*, 2013).

A existência da interação planta-micro-organismo endofítico tem sido constatada em frutos (MIGUEL *et al.*, 2013), caules, folhas (PROCÓPIO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2008; TUPPAD & SHISHUPALA, 2014), raízes (TUPPAD & SHISHUPALA, 2014) e em outras partes da planta. Hipotetiza-se que a entrada de micro-organismos endofíticos seja controlada pela planta e pelas condições ambientais (HARDOIM *et al.*, 2008). Algumas evidências sugerem que a planta tem papel ativo na seleção de certos micro-organismos para a vida endofítica. No entanto, os mecanismos pelos quais isso é feito ainda não são conhecidos (HARDOIM *et al.*, 2008). Micro-organismos endofíticos que ocupam o mesmo nicho em diferentes plantas podem ser muito distintos taxonomicamente (TURNER *et al.*, 2013).

A capacidade de micro-organismos endofíticos de colonizarem os tecidos internos das plantas pode conferir vantagens ecológicas quando esses são comparados aos micro-organismos epifíticos. O habitat representado pelo ambiente interno do corpo das plantas é mais protegido de variações extremas de temperatura, do potencial osmótico, da radiação ultravioleta e da competição com outros micro-organismos (HALLMAN *et al.*, 1997).

Em relação ao ciclo de vida, os micro-organismos endofíticos podem ser obrigatórios ou facultativos. Micro-organismos endofíticos obrigatórios são estritamente dependentes da associação com a planta para o crescimento e a sobrevivência. Em contrapartida, os facultativos apresentam ciclo de vida bifásico, alternando entre a planta e o ambiente (HARDOIM *et al.*, 2008). O estilo de vida facultativo é o mais comum. Os micro-organismos endofíticos obrigatórios, em face da menor competição com outros micro-organismos no interior da planta, podem apresentar arsenal químico menos rico em relação àqueles da rizosfera e da filosfera. Entretanto, os micro-organismos endofíticos podem produzir metabólitos mais específicos que podem sustentar a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014). Os colonizadores facultativos, por sua vez, têm de ser capazes de sobreviver na rizosfera antes de adentrar a planta, podendo produzir metabólitos inibitórios a outros micro-organismos ou que facilitem a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014).

Colonização da planta

A rizosfera corresponde ao volume de solo influenciado pelas raízes da planta. A diversidade microbiana rizosférica é alta por ser esse ambiente rico em fontes de energia prontamente disponíveis (BRADER *et al.*, 2014), provenientes da rizodeposição de mucilagens e exsudatos (PHILIPPOT *et al.*, 2013). A relação entre micro-organismos endofíticos e rizosféricos é bastante próxima. Muitos deles penetram o hospedeiro pelas raízes (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009) e colonizam novos habitat, escapando da competição intensa vigente na rizosfera (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Entretanto, existem características distintas entre os micro-organismos rizosféricos e os endofíticos, uma vez que nem todas as populações microbianas da rizosfera podem adentrar a planta, modificar seu metabolismo e adaptar-se ao ambiente interno dos tecidos vegetais (TURNER *et al.*, 2013). Muitos micro-organismos competentes na rizosfera podem, coincidentemente, tornarem-se endofíticos após entrarem na planta via raiz, mas a falta de genes-chave para o sucesso ecológico daqueles em endofitismo não permite a persistência no hospedeiro. A competência endofítica é adquirida pela expressão de genes que devem contribuir para a persistência e para o sucesso da colonização dos espaços internos da planta (HARDOIM *et al.*, 2008).

A rizosfera é região de elevada competição entre as populações microbianas aí presentes. Proteobactérias de rápido crescimento, denominadas estrategistas-r, são capazes de se instalar no solo rizosférico e de utilizar ampla diversidade de compostos de carbono derivados das raízes. Não somente bactérias prosperam rapidamente na rizosfera rica em nutrientes, mas também fungos, oomicetos, vírus e arqueas (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Os pontos de emergência de raízes laterais e a zona de diferenciação e alongamento das raízes são locais proeminentes para ingresso ativo de micro-organismos. Nesses locais, os tecidos não completamente diferenciados podem facilitar a penetração microbiana (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Os espaços intercelulares da epiderme, das regiões corticais e das células vegetais lisadas são os principais locais de colonização, com densidades de até 10^{10} células/cm³ (CHI *et al.*, 2005). Os tecidos vasculares e as células do xilema também podem ser invadidos, embora, muitas vezes, em densidades mais baixas (COMPANT *et al.*, 2010). No caso específico de fungos, geralmente, a infecção endofítica nas folhas ocorre horizontalmente por meio de esporos trazidos pelo ar (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

A colonização endofítica bacteriana pode ocorrer em três etapas. Na primeira, ela move-se em direção às raízes da planta passivamente, através do fluxo de água do solo, ou ativamente, por meio da atividade flagelar induzida por compostos liberados pelo hospedeiro (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008), em mecanismo de quimiotaxia. Em *Azospirillum*, por exemplo, a quimiotaxia é induzida por açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outros compostos (COMPANT *et al.*, 2005). Para tal, genes envolvidos no reconhecimento dos compostos e quimiotaxia devem ser ativados. A expressão de genes envolvidos na quimiotaxia em *Pseudomonas aeruginosa*, a exemplo de *cheY*, *cheA* e *pctA*, que codificam, respectivamente, um regulador de resposta de dois componentes, um regulador de resposta de quimiotaxia e uma proteína quimiostática, é regulada negativamente pelos exsudados de uma cultivar de beterraba, mas não por exsudados de outra cultivar. Assim, a composição dos exsudados depende da cultivar, da exposição da planta ao estresse e do estágio de desenvolvimento, o que pode resultar em diferenças na comunidade bacteriana rizosférica e, consequentemente, da endofítica (COMPANT *et al.*, 2010).

Numa segunda etapa, a adsorção não específica da bactéria às raízes, seguida pelo ancoramento das mesmas, vai ocorrer (SPRENT & DEFARIA, 1988). Uma vez ligadas às raízes, as bactérias sofrem várias divisões celulares e se estabelecem em microcolônias (HARDOIM *et al.*, 2008). Por fim, as bactérias endofíticas podem alcançar o interior da planta por meio de tecidos danificados que surgem naturalmente como resultado do crescimento vegetal, pelos radiculares, por junções epidérmicas ou, ainda, via ferimentos (SPRENT & DEFARIA, 1988. HARDOIM *et al.*, 2008). Dentro da planta, a colonização pode ser sistêmica, pela migração através do sistema vascular e do apoplasto, ou local, como nos tecidos do córtex e do xilema (HALLMANN *et al.*, 1997).

Em bactérias gram-negativas, o antígeno-O da camada LPS pode contribuir para a colonização radicular, processo dependente da espécie bacteriana envolvida. Outra estrutura importante na colonização é o pílus do tipo IV, o qual é essencial para o estabelecimento de microcolônias de *Azoarcus* nas raízes de gramíneas (DÖRR *et al.*, 1998).

A colonização bem sucedida inclui genes envolvidos na quimiotaxia, formação de flagelos e pili, além de várias vias metabólicas e sistemas de transporte (COMPANT *et al.*, 2010). A análise do genoma de *Klebsiella pneumoniae* demonstrou que essa espécie apresenta características típicas de bactérias diazotróficas, anaeróbias facultativas e endofíticas, com a presença de genes

envolvidos na degradação de carboidratos, de compostos aromáticos e celulolíticos, na ciclagem de nutrientes e de carbono e na capacidade de formar associações endofíticas (FOUNTS *et al.*, 2008).

A penetração de fungos endofíticos dá-se por hifas de penetração ou apressórios pela parte basal dos pelos radiculares. A ramificação das hifas formam muitos clamidóporos preenchendo todo o pelo radicular (ERNST *et al.*, 2003; DESHMUKH *et al.*, 2006). Essa penetração pode dar-se de maneira semelhante em outras partes da planta, como folhas e caules, e, também, por ferimentos, incluindo os causados por herbivoria e outros mecanismos. Fungos endofíticos não penetram as células das plantas e, geralmente, se abrigam nos espaços intercelulares, enquanto utilizam baixos níveis de nutrientes nos fluidos intercelulares, não proporcionando danos ao hospedeiro (GAO *et al.*, 2005). As sementes podem funcionar como veículo de transporte de propágulos fúngicos para a próxima geração de hospedeiros (ERNST *et al.*, 2003).

A colonização endofítica é possível pela grande diversidade de enzimas produzidas pelo micro-organismo, tais como celulasas, pectinases e xilanasas (SEO *et al.*, 2010; KANNAN *et al.*, 2015). A degradação enzimática da parede celular tem sido observada no momento da colonização da epiderme radicular, mas não nos espaços intercelulares do córtex; porém, muito pouco é conhecido sobre a regulação desses processos. Entretanto, sabe-se que a liberação constitutiva de hidrolases não é desejada, uma vez que poderia resultar em patogenicidade (HALLMAN *et al.*, 1997). Os níveis de enzimas degradadoras da parede celular produzidas por bactérias diferenciam as endofíticas, com baixos níveis, das patogênicas, com níveis altos e danosos (HARDOIM *et al.*, 2008).

A colonização das folhas é afetada por estruturas, como vasos condutores, pelos e estômatos. A comunidade residente no interior da planta, quando comparada ao exterior, está em habitat sujeito a maiores flutuações de temperatura, umidade e radiação (TURNER *et al.*, 2013). Esses fatores alteram a fisiologia da planta e, aliados a outros, como estágio de crescimento, tipo de solo, regime hídrico, manejo e densidade de bactérias, podem promover a mudança na estrutura da comunidade endofítica (HARDOIM *et al.*, 2012). Outro fator que diferencia as comunidades endofíticas é a idade das plantas, com as mais jovens apresentando maior densidade que as mais maduras (TURNER *et al.*, 2013).

A complexidade da interação endofítica e a sua contribuição para as plantas justificam novos estudos. O rápido avanço nas tecnologias de sequenciamento de nova geração e no processamento e interpretação dos dados gerados possibilita o

conhecimento da amplitude da diversidade microbiana nesse ambiente (KEMLER *et al.*, 2013). A abordagem metabolômica possibilita o acesso a informações mais amplas sobre a composição dos metabólitos produzidos pelas plantas (JORGE *et al.*, 2014). A interação de plantas com bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio necessita ser mais bem compreendida e caracterizada (CARVALHO *et al.*, 2014b). O acesso à diversidade desses micro-organismos é a etapa inicial e relevante para esse entendimento (TAGHAVI *et al.*, 2010), e estudos da expressão de genes podem possibilitar a identificação das diversas vias metabólicas envolvidas nessas associações (CARVALHO *et al.*, 2014b).

Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos

A interação entre micro-organismos endofíticos e plantas contribui para a adaptação a diversos nichos e para a produção de vários metabólitos que podem ser importantes na aquisição de nutrientes pela planta (BRADER *et al.*, 2014).

A disponibilidade de nitrogênio é um dos fatores que mais limitam o crescimento vegetal, requerendo a adição do elemento ao solo em altos níveis para a manutenção da produtividade agrícola (OLDROYD & DIXON, 2014). A fixação biológica é importante fonte de nitrogênio na agricultura e representa alternativa promissora à fertilização química. Bactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (SUMMAN *et al.*, 2005; OLDROYD & DIXON, 2014), e os endofíticos podem contribuir significativamente para o sucesso de abordagens biotecnológicas visando o suprimento de nitrogênio às culturas.

A capacidade de fixar nitrogênio é encontrada nos principais grupos filogenéticos bacterianos (OLDROYD & DIXON, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas são geneticamente diversas, sendo identificadas principalmente entre as Proteobacterias (Alfa-, Beta- e Gamma), a exemplo dos gêneros *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Esses micro-organismos possuem o complexo enzimático da nitrogenase (ARAÚJO *et al.*, 2014), sendo a maquinaria de fixação e de regulação do processo muito similar à de *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Interações planta-bactérias diazotróficas ocorrem em diferentes níveis, podendo apresentar especificidade em relação ao hospedeiro (ARAÚJO *et al.*, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas podem expressar os genes *nifH*, além de outros, importantes ao processo de fixação biológica, podendo contribuir com quantidades significativas de N para a planta (TURNER *et al.*, 2013).

Bactérias, leveduras e fungos endofíticos podem produzir fitormônios, principalmente ácido indol acético (AIA) (WAQAS *et al.*, 2012; HOFFMAN *et al.*, 2013; NUTARATAT *et al.*, 2014). Além do AIA, as giberelinas, as citocininas e o ácido abscísico podem também ser sintetizados por esses micro-organismos e disponibilizados para as plantas (KHAN *et al.*, 2012; GAIERO *et al.*, 2013). As auxinas e as citocininas estão envolvidas nos processos regulatórios que determinam a arquitetura da raiz. Já as giberelinas são importantes nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, promovendo o aumento do crescimento caulinar e radicular e da densidade dos pelos radiculares (CARVALHO *et al.*, 2014a). Os fitormônios são os principais agentes que regulam a resposta da planta frente às mudanças ambientais (MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2009). Além disso, podem atuar como antimicrobianos, a exemplo do ácido fenil-acético, produzido por *Azospirillum brasiliense*, com atividade antagonica a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011).

A microbiota endofítica pode melhorar a sanidade vegetal por meio da produção de moléculas antagonistas a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011). A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, pode ser controlada pela secreção de substâncias antimicrobianas que impedem a germinação dos uredósporos (SHIOMI *et al.*, 2006). Os melhores resultados com esse tipo de controle são obtidos com o uso de *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Klebsiella pneumoniae* (SHIOMI *et al.*, 2006).

A proteção da planta por bactérias endofíticas pode ocorrer pela perturbação do *quorum-sensing*, mecanismo necessário para a virulência em alguns patógenos. Esse mecanismo geralmente é mediado pelas *N*-acil homoserina lactonas (AHLs). A produção de lactonases degradadoras de AHLs por bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Klebsiella* pode interferir na comunicação patógeno-patógeno e impedir a expressão de genes de virulência (FRIESEN *et al.*, 2011).

A produção de alcalóides por fungos endofíticos pode reduzir a herbivoria, resultando na diminuição do consumo de folhas e sementes por animais (FRIESEN *et al.*, 2011). Da mesma forma, o uso de endofíticos pode ser estratégia interessante no controle biológico (TURNER *et al.*, 2013). Leveduras endofíticas produzem enzimas hidrolíticas, a exemplo das celulases, quitinases, glucanases e proteases, que degradam quitina, β -1,3-glucana, manoproteínas e celulose, componentes da parede celular de vários fungos fitopatogênicos (NATURAT *et al.*, 2014).

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* são reconhecidamente produtoras de antibióticos, compostos voláteis, substâncias antifúngicas, antivirais e inseticidas (TURNER *et al.*, 2013). Já alguns fungos, principalmente os representantes do filo Ascomycota, são eficientes produtores de compostos antibacterianos (DESHMUKH *et al.*, 2014) e de compostos oxidantes durante a colonização vegetal. A produção de antioxidantes está ligada ao aumento da tolerância ao estresse em plantas hospedeiras (WHITE-JÚNIOR & TORRES, 2010).

Os micro-organismos endofíticos são, portanto, fontes de novos produtos naturais, com potencial biotecnológico. Dada a capacidade dos mesmos de degradar compostos orgânicos, são importantes na biorremediação e na fitorremediação (RYAN *et al.*, 2008). Com a utilização de técnicas de engenharia genética, podem ainda ser melhorados no que concerne ao potencial de degradação de compostos xenobióticos (BARAC *et al.*, 2004).

Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos

O critério para distinguir micro-organismos endofíticos requer a desinfestação da superfície da planta pela utilização de álcool 70%, hipoclorito de sódio 3% e água esterilizada, em tempos variáveis a depender do tecido vegetal utilizado. Essa etapa visa à eliminação de epifíticos presentes na filosfera (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Após a desinfestação das partes vegetais desejadas, a diversidade microbiana endofítica pode ser acessada pela utilização de análises moleculares das comunidades por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.*, 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A comprovação da natureza endofítica dos micro-organismos extraídos das plantas pode ser obtida pelo plaqueamento da última água de lavagem do procedimento de desinfestação da planta, ou pela incubação de partes do material vegetal submetido à desinfestação superficial (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). O tempo de incubação e o meio de cultura utilizado são dependentes do micro-organismo que se deseja estudar.

A análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) é um dos métodos dependentes de cultivo utilizados como discriminadores taxonômicos para a identificação de espécies em comunidades microbianas (HILL *et al.*, 2000). Esse método consiste na esterificação dos lipídeos extraídos da amostra, seguida da

separação e identificação por cromatografia gasosa desses compostos. A identificação é baseada nos tempos de retenção da amostra na coluna cromatográfica, comparados aos tempos de retenção de padrões submetidos ao mesmo processo (KIRK *et al.*, 2004). Esse método é utilizado para se estudar a composição das comunidades microbianas, bem como as mudanças nas populações em razão da presença de contaminantes químicos no ambiente (SICILIANO & GERMIDA, 1998) ou, ainda, para a identificação de isolados de bactérias endofíticas de plantas (VEGA *et al.*, 2008; MIGUEL *et al.*, 2013).

A identificação de isolados bacterianos desconhecidos de uma amostra também pode ser realizada pelo sequenciamento do gene rDNA 16S e subsequente comparação da sequência obtida com as depositadas nos bancos de dados, como o *Genbank* (National Center for Biotechnology Information) (TEMMERMAN *et al.*, 2004). O gene rRNA 16S é alvo de estudos de diversidade porque está presente em todos os organismos procariotos, sendo pouco sujeito à transferência horizontal (KIRK *et al.*, 2004). A sequência do gene rRNA 16S contém regiões variáveis espécie-específica, o que permite a identificação dos isolados bacterianos em nível de espécie (CAI *et al.*, 2003). Esse gene é, portanto, o de escolha para a construção de *primers*, reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e alinhamento de sequências (HARDOIM *et al.*, 2012; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Com esse tipo de análise, é possível conhecer os gêneros bacterianos em mais de 90% dos casos e as espécies entre 65 a 83% (JANDA & ABBOTT, 2007). Quando o poder discriminatório não é suficiente, a análise filogenética exclui outros gêneros e espécies. Assim, os dados de sequenciamento são mais apurados em razão das relações filogenéticas disponíveis (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). Uma limitação considerável da técnica ocorre quando duas espécies bacterianas distintas compartilham sequência rRNA 16S muito similares (WOO *et al.*, 2008).

O sequenciamento do gene rRNA 16S origina dados não ambíguos e reprodutíveis, mesmo para isolados raros (DRANCOURT *et al.*, 2000), tendo se tornado método de referência para a taxonomia e a identificação bacterianas (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). O uso de sequências do rRNA 16S tem levado à reclassificação e à renomeação de gêneros e espécies bacterianas, além de permitir a classificação de micro-organismos não-cultivados e facilitar a descoberta e a classificação de novas espécies (WOO *et al.*, 2008).

A identificação de espécies fúngicas e de leveduras é obtida pela sequência de DNA do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA 18S ou pelo fragmento rRNA

18S (NILSSON *et al.*, 2008). ITS é uma região multicópia que nos eucariotos é compreendida por uma região não codificante, uma codificadora e outra não codificante. A variabilidade dessa região proporciona resolução suficiente para identificação de fungos e leveduras (ARNOLD, 2007). Já a região D1/D2 do gene rRNA 26S e o sequenciamento desse domínio têm proporcionado a identificação de espécies de leveduras de forma rápida e precisa (HESHAM *et al.*, 2014).

A análise do perfil fisiológico das comunidades é outro método dependente de cultivo para análise da diversidade microbiana. Através dele é possível determinar a capacidade do micro-organismo em utilizar diferentes fontes de carbono *in vitro*. Essa metodologia é baseada no uso de microplacas contendo 190 fontes alternativas de carbono. A técnica é importante quando se avalia a diversidade metabólica potencial de comunidades microbianas em diferentes ambientes (KIRK *et al.*, 2004; BOCHNER, 2009). A abordagem polifásica é baseada na combinação entre características morfológicas e bioquímicas das espécies de micro-organismos com informações de sequências e reconstrução filogenética, sendo a escolha para estudos de caracterização da comunidade microbiana (VANDAMME *et al.*, 1996), por tornar as análises mais robustas (STACKEBRANDT & EBERS, 2006).

Diferentemente das endossimbioses ou dos sistemas patogênicos bem estudados, as bases moleculares das interações endofíticas ainda não são bem compreendidas (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Análises genômicas comparativas poderão fornecer melhor compreensão da dinâmica da comunidade, sinalização e funções nas associações endófito-planta (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Estudos dependentes de cultivo são importantes; entretanto, não permitem o acesso à totalidade da diversidade microbiana. A utilização de tecnologias de sequenciamento *high-throughput* nos últimos anos tem permitido a identificação de milhares a milhões de sequências nas amostras, revelando, inclusive, espécies raras. A abordagem metagenômica revela a diversidade da comunidade microbiana em interação com a planta (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação do metagenoma pode ser realizada por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), o qual é satisfatório para avaliação da diversidade, mas limitado para detecção de espécies (DAVID *et al.*, 2014). Os fragmentos de DNA de mesmo tamanho, amplificados por PCR, são submetidos à eletroforese em gel com gradiente desnaturante, geralmente de formamida e ureia, e utilizados para análise da estrutura da comunidade microbiana (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013). Essa técnica

permite a identificação de populações de menor e maior abundância em comunidades rizosféricas e endofíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014) e contribui para elucidar mudanças na estrutura da comunidade microbiana em resposta a determinados fatores ao longo do tempo (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

A tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilita o sequenciamento do DNA de amostras ambientais em plataformas que geram informação em milhões de pares de bases em corrida única. Nessa abordagem é possível a identificação de táxons microbianos com alta resolução (PHILIPPOT *et al.*, 2013). O princípio da NGS é a geração de sequências curtas abundantes que podem ser montadas em elementos contíguos maiores para sequenciar todo o genoma. A técnica requer material genético de alta qualidade, limpo e concentrado (YOCKTENG *et al.* 2013). Essa metodologia é utilizada para se estimar a diversidade em comunidades complexas, permitindo análise mais robusta dos ambientes estudados. Entretanto, a grande quantidade de dados gerados proporciona grandes desafios, especialmente no que diz respeito à bioinformática (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

Eucalipto

Florestas são o ecossistema terrestre dominante na Terra, cobrindo cerca de 4,03 bilhões de hectares, o que significa aproximadamente 30% da área terrestre total do planeta (PAN *et al.*, 2013). Elas contribuem para a biodiversidade e fornecem inumeráveis bens e serviços ambientais, sendo responsáveis pela sustentação de imensa variedade de indústrias, empregos e renda em todo o mundo (FAO, 2015).

As espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, sendo a madeira do tronco utilizada como matéria-prima para a produção de celulose e madeira, devido à sua rápida taxa de crescimento, à adaptação a várias condições ecológicas e pela boa qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). Nativa da Austrália, a planta está distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais, contando até o momento com cerca de 700 espécies descritas (HUDSON *et al.*, 2015). Em muitos países, é a escolha para geração de bioenergia (BAUHUS *et al.*, 2010).

As espécies de *Eucalyptus* mostram alta diversidade de genes para metabólitos especializados, como terpenos, que atuam como defensivos químicos (MYBURG *et al.*, 2014). Espécies desse gênero apresentam ainda grande

diversidade e altas concentrações de óleos de importância ecológica e médica (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009), e, em razão da grande relevância dessa planta, o genoma de *Eucalyptus grandis* foi recentemente sequenciado (MYBURG *et al.*, 2014). Pela importância econômica que apresentam, as espécies de eucalipto são muito utilizadas em estudos de melhoramento genético (HUDSON *et al.*, 2015).

No Brasil, 72% dos 7,6 milhões de hectares de florestas plantadas são eucalipto e pinus. A maioria dessa área (54,2%) está concentrada na região sudeste, sendo Minas Gerais o estado que mais contribui para essa atividade. A maior concentração dos plantios nas regiões Sul e Sudeste do país é justificada pela localização das principais indústrias de papel e celulose, de painéis de madeira, siderurgia a carvão vegetal e madeira processada mecanicamente (IBA, 2014).

O significado social e econômico do setor florestal em 2013 pode ser avaliado pelo número de empregos gerados, mais de 4,4 milhões, pelos 6,4 bilhões de reais obtidos com os produtos exportados e pela contribuição para o Produto Interno Bruto de cerca de 56 bilhões de reais, além de 8,8 bilhões de dólares em impostos arrecadados (IBA, 2014).

A produtividade das áreas plantadas é garantida com a utilização de fertilizantes, os quais mantêm ou restauram a fertilidade dos solos, aumentando o rendimento e a qualidade das plantas cultivadas. O manejo tem sido progressivamente melhorado para reduzir custos e impactos negativos ao ambiente. O plantio de eucalipto é realizado em áreas onde os solos são ácidos, havendo necessidade de adição de quantidades significativas de nutrientes. Entretanto, essa planta apresenta baixa resposta à adubação nitrogenada (GAMA-RODRIGUES *et al.*, 2005).

A propagação clonal de eucalipto por miniestaquia alia a qualidade da muda à redução dos custos da produção. Com essa metodologia obtém-se melhor desempenho de enraizamento, sistema radicular com maior qualidade, maior velocidade de emissão das raízes e redução das atividades operacionais (HOPPE *et al.*, 2004). Após o enraizamento em casa de vegetação, por cerca de 30 dias, as mudas são transferidas para aclimação em casa de sombra, com 50% de incidência de luz, por um período de aproximadamente 10 dias. Nessa etapa, geralmente as plantas recebem uma dose de fertilizante NPK 5-17-3 de 0,25 g/muda. Após esse período, as plantas sem brotos são colocadas a pleno sol para rustificação, sem a utilização de qualquer defensivo agrícola, a menos que haja incidência de doenças, fato que raramente ocorre. Nessa fase, a umidade deve ser

controlada de acordo com o teor de água do substrato. Posteriormente, as mudas são classificadas de acordo com porte apresentado (pequeno, médio e grande) e preparadas para envio ao plantio, sempre considerando o tamanho médio do lote de mudas (HOPPE *et al.*, 2004).

Comunidades microbianas distintas vivem no interior de raízes, folhas e outras partes da planta. Essas interações proporcionam às plantas acesso a nutrientes e auxílio na supressão de doenças, sendo importantes na agricultura (SMITH, 2014). O estudo das comunidades microbianas pode, portanto, contribuir para compreender sua relação com a adaptabilidade do eucalipto a vários ambientes, com sua sanidade e o desenvolvimento dessa planta.

Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto

Endofíticos estão em interação com várias espécies de plantas e compõem a comunidade microbiana de várias espécies de eucalipto (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Esses micro-organismos têm potencial para reduzir a incidência de doenças (CLARKE *et al.*, 2006) e aumentar a produtividade (PAZ *et al.*, 2012), o que pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

A comunidade e a densidade bacteriana endofítica em eucalipto variam de acordo com o órgão e a localização na planta, a área geográfica do cultivo, as condições ambientais, a espécie e o genótipo da planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). As comunidades endofíticas bacterianas em eucalipto reportadas até o momento são compostas por *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia* e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* em raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010). Essa comunidade distinta pode ser transferida das sementes para as mudas e, quando inoculados em sementes ou em mudas, as características benéficas dos micro-organismos podem ser expressas no hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2008).

Árvores tropicais sustentam grande abundância de fungos endofíticos em suas folhas. Essa comunidade fúngica presente (ARNOLD, 2005) afeta a estrutura e a diversidade dos organismos associados às plantas, além da sua adaptabilidade

e evolução (OMACINI *et al.*, 2001). À semelhança do que ocorre em outras plantas, fungos endofíticos também se associam ao eucalipto, e a diversidade deles nessa planta mostra dominância de Ascomycota (KEMLER *et al.*, 2013). Essa interação parece ser dependente da espécie de planta (LUPO *et al.*, 2001; KHARWAR *et al.*, 2010) e do local do cultivo (FISHER *et al.*, 1993). Muitos deles são antagonistas a diversos patógenos (KHARWAR *et al.*, 2010), pela produção de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (SATHISH *et al.*, 2012). A produção desses compostos por esses micro-organismos pode proporcionar maior capacidade competitiva no interior da planta.

A colonização de fungos endofíticos ocorre mais frequentemente pela penetração das hifas de fungos epifíticos na superfície da planta, seguida pela adaptação ao novo habitat (KHARWAR *et al.*, 2010). Entretanto, nem todos epifíticos podem adentrar a planta, modificar o metabolismo e adaptar-se a esse habitat (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação da comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é geralmente baseada em metodologias dependentes de cultivo (FISHER *et al.*, 1993; LUPO *et al.*, 2001), que subestimam a diversidade desses micro-organismos. Abordagens metagenômicas se fazem necessárias a fim de se elucidar a presença de representantes mais raros presentes nessa comunidade.

Para se compreender como a comunidade microbiana endofítica do eucalipto pode afetar a adaptabilidade a vários ambientes, a sanidade e o desenvolvimento, a avaliação da diversidade de endofíticos é etapa importante. Entretanto, pouco é conhecido sobre esse aspecto em eucalipto, sendo que a maioria dos relatos enfatiza o isolamento desses micro-organismos. Portanto, torna-se necessária a investigação desses micro-organismos em outras partes da planta, bem como em outras áreas de cultivo, e a utilização de metodologia independente de cultivo para melhor elucidar a dinâmica dessa interação.

O sequenciamento de nova geração através das diversas plataformas disponíveis permite a maior cobertura de uma amostra individual. Essa maior cobertura aumenta a possibilidade de detecção de maior número de representantes de filos microbianos, o que é de extrema importância em estudos ecológicos (SIQUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2012). Os avanços das técnicas moleculares como RT-PCR e RNA-Seq (VARGAS *et al.*, 2014) permitem o estudo da expressão de genes envolvidos na fixação de nitrogênio e síntese de hormônios de crescimento vegetal (BRUTO *et al.*, 2014; VARGAS *et al.*, 2014). Com essas técnicas é possível a investigação simultânea do perfil de transcrição de vários genes da planta e do

hospedeiro (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2013). Assim, é possível realizar uma análise detalhada do perfil de genes dos micro-organismos e das modificações que ocorrem na planta em resposta a mudanças ambientais ou a condições impostas (BERTHRONG *et al.*, 2009). Esses avanços, aliados ao estudo da diversidade dos micro-organismos por sequenciamento de genes extraídos de diferentes partes do sistema solo-planta, suportam a ideia de que micro-organismos endofíticos podem ser alternativa para se melhorar a aquisição de nutrientes em plantas importantes, como eucalipto, aumentando a produtividade da planta e sustentabilidade do processo de produção.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. O., VITORINO, A. C. T., MERCANTE, F. M & OLIVARES, F. L. Biological nitrogen fixation by diazotrophic bacteria in association with grasses of economic importance. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 2898-2903, 2014.
- ARNOLD, A. E. 2005. **Diversity and Ecology of fungal endophytes in tropical forests**. Current Trends in Mycological Research (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.
- BACON, C. W & HINTON, D. M. **Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility**. In: GNANAMANICKAM, S. S. 1 ed. Plant-Associated Bacteria. Netherlands: Springer. 2007, p. 155-195.
- BARAC, T., TAGHAVI, S., BORREMANS, B., PROVOOST, A., OEYEN, L., COLPAERT, J. V., VANGRONVELD, J & VAN DER LELIEL, D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water- soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**. v. 22, p. 583–588, 2004.
- BAUHUS, J., VAN DER MEER, P., KANNINEN, M (Ed.). **Ecosystem goods and services from plantation forests**. Routledge, 2010.
- BERTHRONG, S. T., SCHADT, C. W., PINEIRO, G & JACKSON, R. B. Afforestation alters the composition of functional genes in soil and biogeochemical processes in South American grasslands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6240-6248, 2009.
- BOCHNER, B. R. Global phenotypic characterization of bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p.191–205, 2009.
- BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F & SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.
- BRUTO, M., PRIGENT-COMBARET, C., MULLER, D & MOËNNE-LOCCOZ, Y. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-

- promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-10, 2014.
- BULGARELLI, D., SCHLAEPPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L. & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.
- CAI, H., ARCHAMBAULT, M. & PRESCOTT, J. F. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 465-469, 2003.
- CAMILIOS-NETO, D., BONATO, P., WASSEM, R., TADRA-SFEIR, M. Z., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., VALDAMERI, G., DONATTI, L., FAORO, S., WEISS, V. A., CHUBATSU, L. S., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M, Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, v. 15, p. 378, 2014.
- CARVALHO, T. L. G., BALSEMÃO-PIRES, E., SARAIVA, R. M., FERREIRA, P. C. G & HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 2014, p. 1-12, 2014a.
- CARVALHO, T. L. G., PIRES, E., SARAIVA, R., VARGAS, L., BOMFIM, A. C. J., BALLESTEROS, H & HEMERLY, A. S. Nitrogen fixation in grasses-gluconacetobacter activates genes in sugarcane. **BMC Proceedings**, v. 8, p. -20, 2014b.
- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CHEEWANGKON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**. V. 23, p. 55-85, 2009.
- CHI, F., SHEN, S. H., CHENG, H. P., JING, Y. X., YANNI, Y. G., DAZZO, F. B, Ascending migration of endophytic Rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7271-7278, 2005.
- CLARKE, B. B., WHITE JR, J. F., HURLEY, R. H., TORRES, M. S., SUN, S & HUFF, D. R. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. **Plant Disease**, v. 90, p. 994-998, 2006.
- COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT C & AIT BARKA, E. 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, 2005.
- COMPANT, S., CLÉMENT, C & SESSITSCH, A, Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization,

mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

DAVID, V., TERRAT, S., HERZINE, K., CLAISSE, O., ROUSSEAU, S., TOURDOT-MARÉCHAL, R & ALEXANDRE, H. High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 811-821, 2014.

DESHMUKH, S., HÜCKELHOVEN, R., SCHÄFER, P., IMANI, J., SHARMA, M., WEISS, M & KOGEL, K. H. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 18450-18457, 2006.

DESHMUKH, S. K., VEREKAR, S. A & BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-43, 2014.

DÖRR, J., T., HUREK & B. REINHOLD-HUREK. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 7-17, 1998.

DRANCOURT, M., BOLLET, C., CARLIOZ, A., MARTELIN, R., GAYRAL, J. P & RAOULT, D. 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3623–3630, 2000.

ERNST, M., MENDGEN, K. W & WIRSEL, S. G. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 580-587, 2003

FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.

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

FISHER, P. J.; PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, p. 338-345, 1993.

FOUNTS, D. E., TYLER, H. L., DEBOY, R. T., DAUGHERTY, S., REN, Q., BADGER, J. H., DURKIN, A. S., HUOT, H., SHRIVASTAVA, S., KOTHARI, S., DODSON, R. J., MOHAUD, Y., KHOURI, H., ROESCH, L. F. W., KROGFELT, K. A., STRUVE, C., TRIPLETT, E. W & METHE, B. A. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella*

- pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 7, p. 1-18, 2008.
- FRIESEN, M. L., PORTER, S. S., STARK, S. C., VON WETTBERG, E. J., SACHS, J. L. & MARTINEZ-ROMERO, E. Microbially mediated plant functional traits. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 23-46, 2011.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S. & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAMA-RODRIGUES, E. D., BARROS, N. D., GAMA-RODRIGUES, A. D. & SANTOS, G. D. A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 893-901, 2005.
- GAO, X. X., ZHOU, H., XU, D. Y., YU, C. H., CHEN, Y. Q., & QU, L. H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology letters**, v. 249, p. 255-266, 2005.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HARDOIM, P. R., HARDOIM, C. C., VAN OVERBEEK, L. S. & VAN ELSAS, J. D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS One**, v. 7, p. e30438, 2012.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HESHAM, A. E. L., WAMBUI, V., JO, H. O & MAINA, J. M. Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8 S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, p. 37-43, 2014.
- HILL, G. T., MITKOWSKI, A., ALDRICH-WOLFE, L., EMELEA, L. R., JURKONIE, D. D., FICKE, A., MALDONADO-RAMIREZA, S., LYNCHA, S. T & NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 25-36, 2000.
- HOFFMAN, M. T., GUNATILAKA, M. K., WIJERATNE, K., GUNATILAKA, L., & ARNOLD, A. E. Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. **PloS one**, v. 8, p. e73132, 2013.
- HOPPE, J. M., & BRUN, E. (2004). Produção de sementes e mudas florestais. Caderno didático, v.1, 388p.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N: Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**. v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUDSON, C. J., FREEMAN, J. S., MYBURG, A. A., POTTS, B. M & VAILLANCOURT, R. E. Genomic patterns of species diversity and divergence in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, v. 2015, p. 1-15, 2015.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- JACKSON, C. R.; RANDOLPH, K. C.; OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- JANDA, J. M & ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2761–2764, 2007.
- JORGE, T. F., RODRIGUES, J. A., CALDANA, C., SCHMIDT, R., VAN DONGEN, J. T., THOMAS-OATES, J & ANTÓNIO, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: metabolite responses to abiotic stress. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 2015, p. 1-30, 2015.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHAN, A. L., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., JUNG, H. Y., LEE, J. H & LEE, I. J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-14, 2012.
- KHARWAR R. N., GOND S. K., KUMAR A & MISHRA A. A. Comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KIRK, J., BEAUDETE, L., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIROMONOS, J., LEE, H & TREVORS, J. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.

- MAGNANI, G. S., DIDONET, C. M., CRUZ, L. M., PICHETH, C. F., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Journal Genetics and Molecular Research**, v. 9, n.1, p.250-258, 2010.
- MALHOTRA, M & SRIVASTAVA, S. Stree-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 73–80, 2009.
- MIGNARD, J. P & FLANDROIS, S. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 574–581, 2006.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffee canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- MYBURG, A. A., GRATTAPAGLIA, D., TUSKAN, G. A., HELLSTEN, U., HAYES, R. D., GRIMWOOD, J *et al.* The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-362, 2014.
- NAGABHYRU, P., DINKINS, R. D., WOOD, C. L., BACON, C. W., & SCHARDL, C. L. Tall fescue endophyte effects on tolerance to water-deficit stress. **BMC Plant Biology**, v. 13, p.127, 2013.
- NILSSON, R. H., KRISTIANSSON, E., RYBERG, M., HALLENBERG, N., & LARSSON, K. H. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics online**, v. 4, p. 193, 2008.
- NUTARATAT, P., SRISUK, N., ARUNRATTIYAKORN, P & LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-694, 2014.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, p. 78-81, 2001.
- PAIVA, J. A.; PRAT, E.; VAUTRIN, S.; SANTOS, M. D.; SAN-CLEMENTE, H.; BROMMONSCHENKEL, S.; FONSECA, P. G. S.; GRATTAPAGLIA, D.; SONG, X.; AMMIRAJU, J. S. S.; KUDRNA, D. WING, R. A.; FREITAS, A. T.; BERGÈS, H.; PETTENATI, J. G & GRIMA-PETTENATI, J. Advancing *Eucalyptus* genomics: identification and sequencing of lignin biosynthesis

- genes from deep-coverage BAC libraries. **BM Genomics**, v. 12, p. 1-13, 2011.
- PAN, Y., BIRDSEY, R. A., PHILLIPS, O. L & JACKSON, R. B. The structure, distribution, and biomass of the world's forests. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 44, p. 593-622, 2013.
- PAZ, I. C. P., SANTIN, R. C. M., GUIMARÃES, A. M., ROSA, O. P. P., DIAS, A. C. F., QUECINE, M. C & MATSUMURA, A. T. S. *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 11, p. 3711-3720, 2012.
- PHILIPPOT, L., RAAIJMAKERS, J. M., LEMANCEAU, P & VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789-799, 2013.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T, Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, p. 14:435–443, 2011.
- RINCON-FLOREZ, V. A., CARVALHAIS, L. C & SCHENK, P. M. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. **Diversity**, v. 5, p. 581-612, 2013.
- RODRIGUEZ, R. J., WHITE JR, J. F., ARNOLD, A. E & REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 82, p. 314e330, 2009.
- ROSENBLUETH, M & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.
- RYAN, R. P., GERMAINE, K., FRANKS, A., RYAN, D. J & DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SATHISH, L., PAVITHRA, N., & ANANDA, K. Antimicrobial activity and biodegrading enzymes of endophytic fungi from *Eucalyptus*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 2574, 2012.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against

- pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SHIOMI, H. F., SILVA, H. S. A., MELO, I. N. S., NUNES, F. V., BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, n.1, p.32-39, 2006.
- SICILIANO, S. D & GERMIDA, J.J. Biolog analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that *Pseudomonad* inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1717–1723, 1998.
- SIQUEIRA-JÚNIOR, J. F., FOUAD, A. F & RÔCAS, I. N. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, P. 1-15, 2012.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- SMITH, P. A. Foliage Friendships. **Scientific American**, v. 311, n. 2, p. 24-25, 2014.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. “Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards,” **Microbiology Today**, v.33, p. 152-155, 2006.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TAGHAVI, S., DER LELIE, D. V., HOFFMAN, A.; ZHANG, Y. B., WALLA, M. D.; VANGRONSVELD, J., NEWMAN, N & MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2010.
- TEMMERMAN, R., HUYS, G & SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.348–359, 2004.
- TUPPAD, D, S & SHISHUPALA, S. Evaluation of endophytic fungi from *Butea monosperma* for antimicrobial and enzyme activity. **Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 4, p. 38-45, 2014.
- TURNER, T. R.; JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.

- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., VOS, P., KERSTERS, K & SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407–438, 1996.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VARGAS, L., SANTA BRÍGIDA, A. B., MOTA FILHO, J. P., DE CARVALHO, T. G., ROJAS, C. A., VANEECHOUTTE, D.; VAN BEL, M.; FARRINELLI, L.; FERREIRA, P. C. G.; VANDEPOELE, K & HEMERLY, A. S. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PloS One**, v. 9, p. e114744, 2014.
- VEGA, F. E., PAVA-RIPOLL, M., POSADA, F & BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal Basic Microbiology**, v 45, p371–380, 2005.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209–216, 2010.
- WHITE, J. F & TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. **Physiologia Plantarum**, v. 138, 440-446, 2010.
- WOO, P. C. Y., LAU, S. K. P., TENG, J. L. L., TSE, H & YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p. 908-934, 2008.
- YOCKTENG, R., ALMEIDA, A. M., YEE, S., ANDRE, T., HILL, C & SPECHT, C. D. A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next-generation sequencing and gene expression analyses. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, p. 1300070, 2013.

CAPÍTULO 2

COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NAS FOLHAS E EXSUDATOS XILEMÁTICOS DE EUCALIPTO

RESUMO

As espécies de eucalipto estão entre as mais cultivadas e mais valorizadas economicamente em todo o mundo. No Brasil, apresentam grande importância ambiental e econômica pela geração de milhares de empregos e por ser alternativa à utilização de madeira de florestas nativas. Em ecossistemas florestais, a parte aérea das plantas é considerada habitat comum para vários micro-organismos, e a família Myrtaceae é fonte relevante de biodiversidade de fungos. Entretanto, muito pouco é conhecido sobre a diversidade e a distribuição da microbiota em folhas e exsudatos xilemáticos em eucalipto. O objetivo desse estudo foi mostrar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade. As folhas e os exsudatos xilemáticos foram coletados no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A diversidade foi obtida empregando-se extração de DNA, amplificação da subunidade rRNA 18S, DGGE e sequenciamento das bandas eluídas. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela localidade das plantas e pela sazonalidade entre as épocas de coleta. Mudanças observadas na distribuição dos grupos filogenéticos encontrados nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos indicam que a composição da comunidade endofítica em eucalipto é dependente da posição das folhas na copa das árvores e do local de cultivo. A análise filogenética mostrou a dominância dos filos Basidiomycota e Ascomycota nos ambientes estudados. Esse é o primeiro relato da presença de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos de uma planta.

Palavras-chave: diversidade, fungos endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

As espécies de eucalipto estão entre as mais utilizadas em florestas plantadas, em razão de suas características de crescimento, adaptabilidade a condições de clima e solo distintos e valor de sua madeira (FAO, 2015). A madeira do eucalipto pode ser utilizada de várias maneiras, incluindo a produção de papel e celulose, de painéis, de madeira processada mecanicamente e na siderurgia a carvão vegetal (IBA, 2013). Além disso, também pode fornecer fonte rentável de lignocelulose para a produção de energia e biocombustíveis avançados (ROCKWOOD *et al.*, 2008). No Brasil, as plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) apresentam crescimento uniforme e alta produção de celulose, características que impulsionaram o crescimento das florestas plantadas a partir da década de 1990 (IGLESIAS-TRABADO & WILSTERMANN, 2008).

As partes aéreas das plantas são habitat comum para vários micro-organismos (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015), sendo a interação com elas importante na manutenção do equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos, dos fluxos de gases e de outros processos determinantes no ecossistema (LINDOW & BRANDL, 2003). Assim, os significados agrônomo e ambiental dos micro-organismos que habitam a parte aérea da planta podem ser expressos na adaptabilidade de populações de plantas e também na qualidade e produtividade das culturas (TURNER *et al.*, 2013). Em escala global, a diversidade de fungos tem se mostrado maior em florestas tropicais, onde a diversidade de plantas terrestres também é maior; porém, a verdadeira escala de diversidade dos endofíticos associados ainda não é bem conhecida (LUO *et al.*, 2014).

Fungos endofíticos estão presentes nas plantas terrestres e são especialmente abundantes e diversos em folhas de várias árvores tropicais. Esses micro-organismos são considerados componentes importantes da biodiversidade em escala global (ARNOLD, 2005). A diversidade de fungos endofíticos na estrutura da comunidade fúngica pode afetar a adaptabilidade e evolução da planta no ambiente em que se encontra (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015).

A caracterização da comunidade microbiana associada às plantas do eucalipto em florestas comerciais brasileiras, além de contribuir para o conhecimento da interação planta-micro-organismo, é de suma importância quando se pretende maximizar a produtividade e o manejo de uma cultura de grande expressão para a economia do país. A maioria dos trabalhos sobre a diversidade de fungos endofíticos têm sido realizados com métodos dependentes de cultivo desses

micro-organismos, o que permite acesso a apenas uma pequena fração dessa diversidade (TORSVIK & OVREAS, 2002). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos e proporcionado novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição e a diversidade da comunidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

As duas áreas de estudo foram as florestas plantadas com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) situadas nos municípios de Catas Altas (Área 1 – Projeto Catas Altas I) e Santa Bárbara (Área 2 – Projeto Serra do Pinho), Minas Gerais, Brasil, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A floresta correspondente a Catas Altas está no sétimo ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1970, e a de Santa Bárbara está no terceiro ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1989. A produtividade média das duas áreas é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos (Tabela 1) e os solos são altamente intemperizados, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o Latossolo Amarelo.

Tabela 1: Georreferenciamento das áreas das florestas plantadas de eucalipto, classe de solo predominante, ano do primeiro plantio e produtividade média da floresta (m³ ha⁻¹)/rotação.

Área/ Projeto	Latitude (w)	Longitude (s)	Altitude (m)	Classe Solo	Implantação/ plantio de eucalipto	Produtividade (m ³ ha ⁻¹)/ rotação
I (Catas Altas)	43° 24' 54"	19° 57' 32"	750	LAd1	1970	340
II (Serra do Pinho)	43° 24' 28"	20° 4' 30"	750	LAW2	1989	340

A vegetação natural dessas áreas era de floresta estacional semidecidual, a qual foi substituída pela cultura do café e por pastagens, respectivamente. Posteriormente, áreas de floresta nativa e extensas áreas de pastagens, em sua maioria compostas por áreas degradadas, foram ocupadas com a cultura do eucalipto (CENIBRA). A idade das plantas à época da amostragem era de 18 meses em Catas Altas (área 1) e de 72 meses em Santa Bárbara (área 2).

Nas duas áreas, o clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão (Tabela 2). As médias de temperaturas máxima, média e mínima nos últimos anos foram de 26,4; 16,9 e 21,6°C, respectivamente, a umidade relativa de 67% e a precipitação e o déficit hídrico de 122,9 e 15,3 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Tabela 2: Histórico de precipitação na região estudada (Catás Altas/Santa Bárbara).

Ano	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
-----mm ³ -----												
2011	243	123,4	329,5	93,7	21,3	8,9	1,8	1	8,9	231,4	431	664,2
2012	328,3	28,7	166,1	21,8	138,6	16,5	0	5,3	36,8	-	-	-

Amostragem

Após o corte de uma árvore de cada área avaliada, foram coletadas amostras de exsudato xilemático e de folhas em terços equidistantes da copa (superior, médio e inferior). As coletas foram realizadas no início do período chuvoso (outubro de 2011), no período chuvoso (dezembro de 2012) e no período seco (abril de 2012). Cerca de 50 folhas sem sintomas de doenças (150 g) dos terços superior, médio e inferior da parte da copa foram coletadas separadamente. O exsudato xilemático foi coletado após o corte do tronco da árvore em porções de aproximadamente 1 m de comprimento, utilizando motosserra desinfestada em álcool 70%. Após 30 segundos de exsudação, o líquido foi coletado em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL. As amostras foram acondicionadas em caixa contendo gelo para o transporte ao Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. No LEM, as amostras foram estocadas em freezer a - 20°C por cerca de um mês até o processamento.

Descontaminação superficial das folhas de eucalipto

A descontaminação superficial de oito folhas saudáveis provenientes de cada terço das copas das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato ($0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, e individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Aliquotas de 100 μL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas e exsudatos xilemáticos

As folhas amostradas de cada terço das copas que se mostraram superficialmente esterilizadas após a incubação em meio R2A foram maceradas em nitrogênio líquido, e o macerado, transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL. Aos eppendorfs contendo as amostras maceradas foram adicionados tampão de extração composto de [(2% (p/v) brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), $1,4 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl, 20 mmol.L^{-1} EDTA, 100 mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH 8,0 e 1g de polivinilpirrolidona e 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol]. As amostras de exsudatos xilemáticos foram inicialmente homogeneizadas em vórtex e uma alíquota de 500 μL transferida para tubos de polipropileno com capacidade para 2 mL. Aos tubos foram adicionados 1000 μL de tampão de extração, 0,5 g de *beads* de 106 μm , 50 μL de SDS 4% (dodecil sulfato de sódio) e 400 μL de fenol-clorofórmio (1:24). A mistura foi submetida a agitação em homogeneizador por 10 min, e colocada em banho-maria a 60°C durante 10 min. Os tubos foram centrifugados a $15000g$, e o sobrenadante, transferido para tubos contendo 400 μL de fenol-clorofórmio, seguindo-se nova centrifugação a $15000g$ por 5 min. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 0,6 volumes de isopropanol, seguindo-se a centrifugação a $15000g$ por 20 min. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% e ressuspensionado em 100 μL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram

comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc).

Análise da diversidade de fungos endofíticos

Para se examinar a diversidade de fungos endofíticos de folhas e exsudatos xilemáticos foram utilizadas a DGGE e a estratégia Nested-PCR. Para isso, em uma primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram utilizados para a primeira reação. Os fragmentos gerados foram utilizados como molde para uma segunda PCR, e a região V7-V8 foi amplificada utilizando-se os *primers* FF390 (VAINIO & HANTULA, 2000) e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000), contendo grampo GC incorporado à região *forward* desse oligonucleotídeo.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µM de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 µM do *primer* NS1, 0,16 µmol do *primer* EF3, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72°C e extensão final a 72°C durante 10 min. A segunda PCR foi realizada utilizando-se 1,0 µL da primeira reação como molde e substituição dos *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC. Nessa reação, as condições foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min, extensão por 1 min a 72°C e extensão final a 72°C durante 10 min.

Os *amplicons* resultantes foram submetidos a DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermophilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo, para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8% (p/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma), em gel com gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ de Tris-HCl, pH 8 e 20 mmol·L⁻¹ de ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ de EDTA,

pH 8,0), 0,09% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina) e 0,7% (p/v) de persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ de ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis foram registradas sob luz UV (300 nm) utilizando um equipamento Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise da comunidade fúngica endofítica, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, eluídas em tubos de polipropileno contendo 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos a 4°C *overnight*. Uma alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1 (sem o grampo GC). Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência foi realizada busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando-se o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença de uma banda correspondente a uma unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de diversidade foram realizadas utilizando-se o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software SigmaPlot 13.0.

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank* utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97% foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S obtidas no NCBI, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados

manualmente e o cálculo para análise filogenética baseada no alinhamento dessas sequências foi feito pelo Método de *Neighbor Joining*. A robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram determinados pela análise de *bootstrap* com 1000 réplicas, e os valores acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

O protocolo de extração de DNA e a amplificação do gene rRNA 18S resultaram em *amplicons* e migração distintos no perfil eletroforético, comprovando a eficiência para acessar a diversidade de fungos endofíticos por DGGE em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2).

O perfil eletroforético na DGGE mostrou bandas mais intensas na mesma posição relativa e número expressivo de UTOs detectadas nas folhas analisadas. A presença de UTOs de menor e maior intensidade é um indicativo de que a Nested-PCR propiciou a resolução necessária às análises de diversidade (Figuras 1 e 2). Os fragmentos de DNAs nas bandas excisadas em diferentes posições do gel da DGGE foram identificados como de membros pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota. Embora outros autores não tenham obtido resultados satisfatórios com a utilização da técnica de excisão de bandas (LIANG *et al.*, 2008), essa estratégia foi bem sucedida no acesso à diversidade de fungos endofíticos de eucalipto no presente trabalho (Figuras 1 e 2).

A análise dos fragmentos do gene rRNA 18S de fungos presentes em folhas e nos exsudatos xilemáticos revelou uma comunidade fúngica distinta, de acordo com as áreas de cultivo. O número e a densidade das bandas de fungos no gel dos exsudatos xilemáticos foram menores em relação aos das folhas, embora nas duas áreas avaliadas, a similaridade delas seja pouco mais de 30% e com o perfil distinto (Figuras 1, 2 e 3). A DGGE permitiu discriminar diferenças entre as comunidades endofíticas em eucalipto cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 2).

Nas folhas de eucalipto coletadas na região de Catas Altas, a análise por UPGMA gerou cinco grupos distintos, sendo o maior valor de similaridade (52,3%) o correspondente à coleta realizada no início do período chuvoso em folhas da parte inferior da copa da árvore (Figura 3A). A maior similaridade encontrada na região de Santa Bárbara foi 55,3%, em período seco, também na parte inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs (23 e 22) nas folhas de eucalipto independe do período de coleta. Outras UTOs exibem flutuações entre os períodos

de coleta, a exemplo da maior incidência de UTOs específicas no período chuvoso em Catas Altas, enquanto na localidade de Santa Bárbara esse fato se deu no período seco (Figura 4).

Os índices de diversidade de Shannon em Catas Altas variaram entre 2,56 a 3,02, e os de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3). Em Santa Bárbara, essa variação foi menor, com índices de diversidade entre 2,09 e 2,4, e de riqueza, entre 7,5 e 11,3 (Tabela 4). Já os índices de Shannon nos exsudatos xilêmáticos variaram entre 1,8 e 2,5, e os de riqueza, entre 6 e 16 (Figura 2).

A comunidade de fungos endofíticos em folhas de eucalipto na região de Catas Altas é distinta com relação à posição das folhas na copa da árvore e entre os períodos chuvoso e seco. Essa distinção indica que a colonização ou a permanência das espécies de fungos é influenciada pela posição das folhas e pela sazonalidade. Nessa área foram identificadas 14 espécies, sendo o maior número delas encontrado no início do período chuvoso (Tabela 5).

A comunidade endofítica das folhas de Santa Bárbara é composta por sete espécies (Tabela 6), que em sua maioria são as mesmas que as encontradas em Catas Altas (Tabela 6). Entretanto, *Anomoloma albolutescens*, *Rhodotarzetta rosea* e *Rizoctonia solani* foram exclusivas de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6).

A posição das folhas e a sazonalidade influenciaram mais a composição da comunidade de fungos endofíticos de Catas Altas que a de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6). Em Catas Altas, a maior prevalência de endofíticos foi encontrada no início do período chuvoso (Tabela 5), e em Santa Bárbara, no período chuvoso (Tabela 6). Nessa área, das espécies fúngicas identificadas por sequenciamento, apenas *Boletus rubropunctus* foi encontrada em mais de um terço da copa da árvore e em mais de uma época de coleta (Tabela 6). Em eucalipto, existem diferenças na colonização e na persistência de fungos endofíticos em relação à sazonalidade (Tabelas 5 e 6).

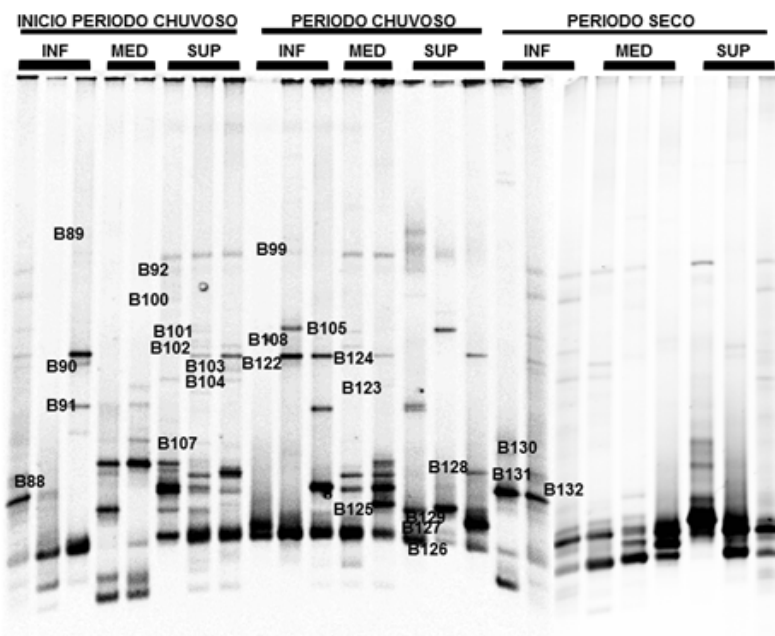
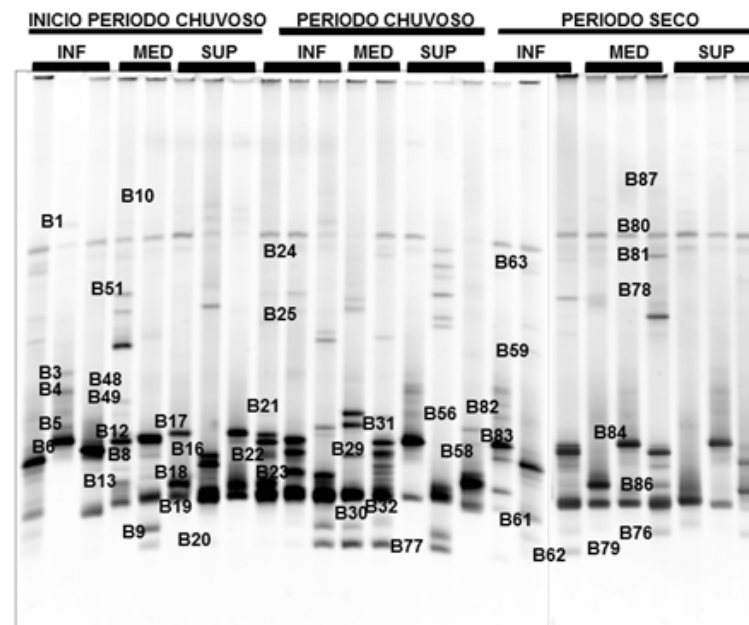
A**B**

Figura 1: Perfis eletroforéticos de DGGE da comunidade de fungos endofíticos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior (em triplicata) da copa das árvores de eucalipto cultivadas em áreas distintas: (A) - Árvores com 18 meses de idade cultivadas no município de Catas Altas, (B) – Árvores com 72 meses de idade cultivadas no município de Santa Bárbara. INF: folhas do terço inferior da copa da árvore; MED: folhas do terço médio da copa da árvore; SUP: folhas do terço superior da copa da árvore. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso; período chuvoso e período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas.

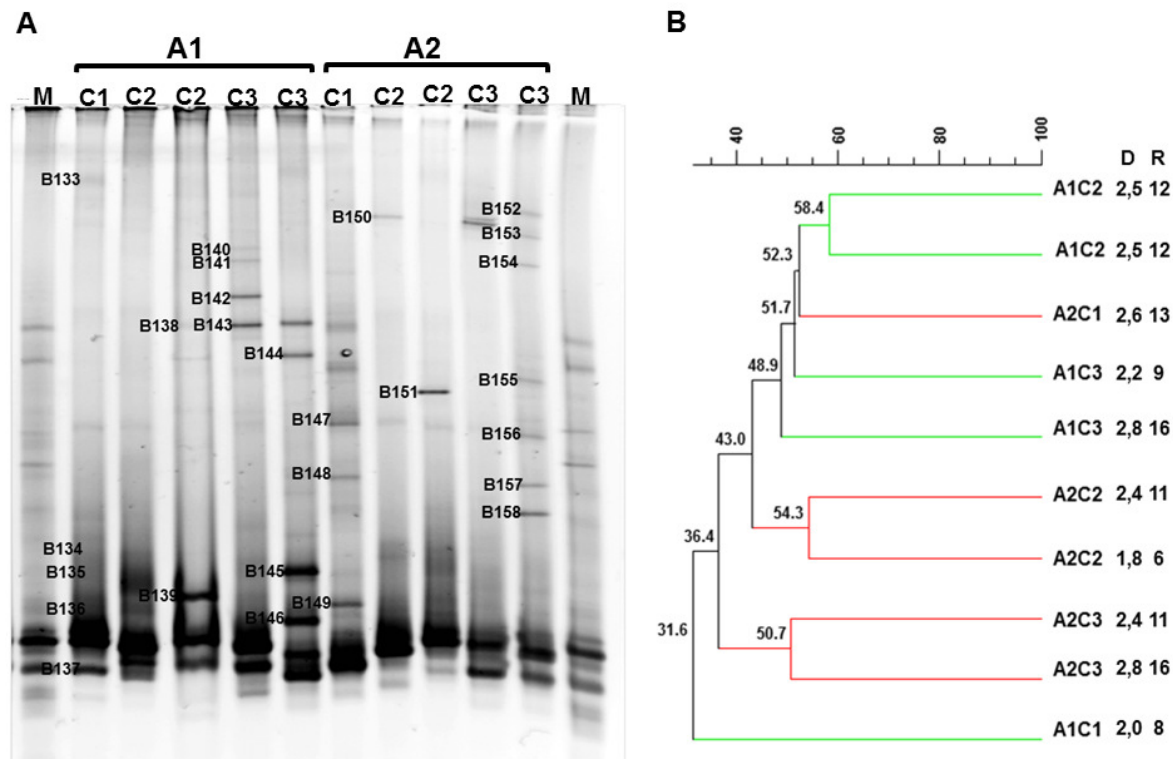


Figura 2: (A) - Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos extraídos dos exsudatos xilemáticos de eucalipto em áreas distintas. A1 - Árvores com 18 meses de idade, cultivadas no município de Catas Altas. A2 – Árvores com 72 meses de idade, cultivadas no município de Santa Bárbara. M: marcador; C1: coleta realizada no início do período chuvoso; C2: coleta realizada no período chuvoso; C3: coleta realizada no período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas. (B) Análise de agrupamento a partir do perfil eletroforético da DGGE e índices de diversidade de Shannon (D) e Riqueza (R) das amostras de exsudatos xilemáticos.

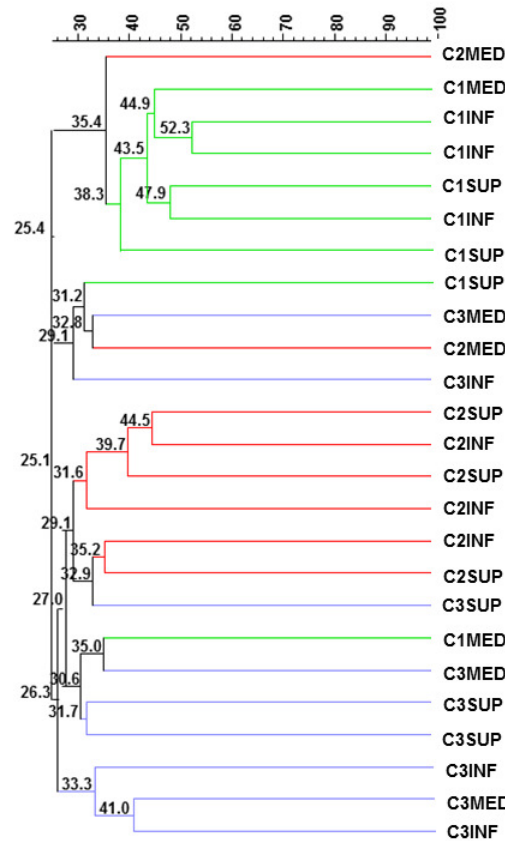
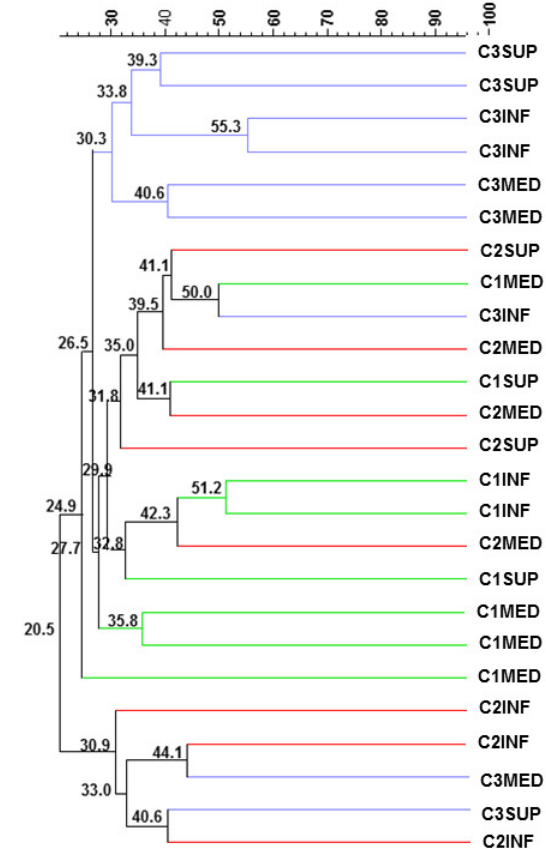
A**B**

Figura 3: Análise de agrupamento e índices de similaridades obtidos a partir do perfil eletroforético da DGGE das amostras de fungos endofíticos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto cultivadas em A - Catas Altas (árvores com 18 meses de idade) e em B - Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade). C1 – Coleta 1 (início do período chuvoso); C2 – Coleta 2 (período chuvoso); C3 – Coleta 3 (período seco). INF – parte inferior da copa; MED – parte média da copa; SUP – parte superior da copa.

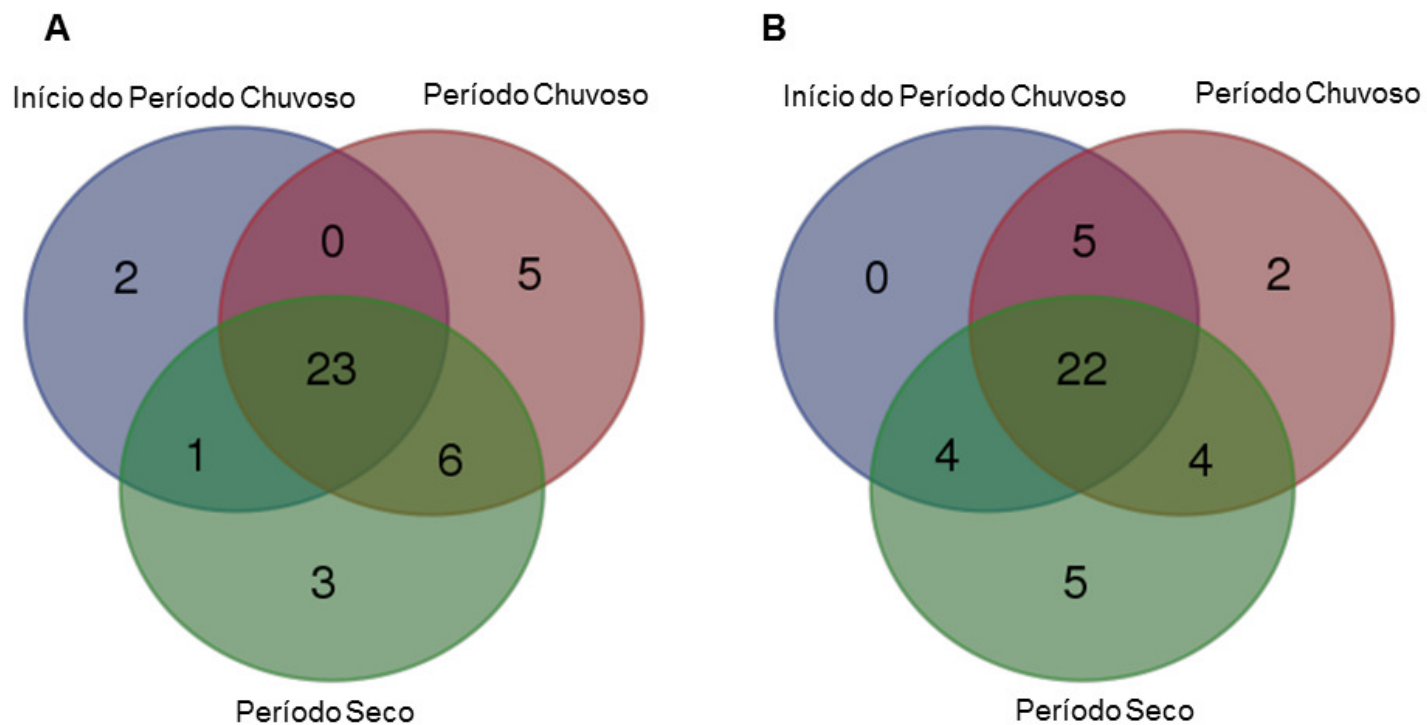


Figura 4: Distribuição de UTOs pelo diagrama de Venn em folhas de eucalipto no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Catas Altas (árvores com 18 meses de idade). B – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade).

O sequenciamento dos *amplicons* a partir das bandas excisadas dos exsudatos xilemáticos mostrou a presença de oito espécies de fungos endofíticos nesse habitat (Tabela 7), sendo que a maioria delas foi identificada em Santa Bárbara. Entre os fungos endofíticos encontrados, apenas um deles, *Fusarium solani*, foi encontrado em folhas provenientes da região de Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* em Santa Bárbara. Entre as espécies encontradas, cinco são exclusivas de Santa Bárbara, uma de Catas Altas e duas são comuns às duas áreas, indicando que a interação endofítica em exsudatos xilemáticos é moldada pela sazonalidade (Tabela 7). Basidiomycota é o filo de fungo que predomina em folhas e exsudatos de eucalipto (Tabelas 5, 6 e 7). Até o momento, esse é o primeiro relato da presença de fungos em exsudatos xilemáticos.

A análise filogenética das sequências revelou que todas pertencem aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 5). A maioria dos agrupamentos formados apresentou valores de *bootstrap* acima de 70, os quais são considerados entre moderados e fortes, o que confere robustez à análise. Em Catas Altas, as bandas 1 (B1), 4 (B4), B8 (B8), 25 (B25), 62 (B62) e 87 (B87) formaram os agrupamentos com maior sustentação filogenética, com *bootstraps* maiores que 80, a maioria deles entre 98 e 100. Esses *bootstraps* são considerados fortes e proporcionaram robustez à análise filogenética.

As UTOs provenientes dos *amplicons* extraídos das bandas excisadas dos géis referentes às folhas coletadas na região de Santa Bárbara formaram os agrupamentos com maiores *bootstraps* para as bandas 99 (B99) e 101 (B101), com *bootstraps* de 97 e 99, respectivamente. As UTOs agruparam com alta sustentação filogenética e formaram dois clados distintos, ambos pertencentes ao filo Ascomycota. A sustentação da árvore filogenética é garantida pelo valor 99 do nó mais externo a ela (Figura 5), embora alguns dos valores de *bootstrap* sejam considerados moderados e baixos.

A análise filogenética para as bandas excisadas a partir de amostras de exsudatos xilemáticos também demonstrou *bootstrap*, em sua maioria, entre moderados a fortes, sustentados filogeneticamente pelo alto valor do nó mais externo. Nos exsudatos, as bandas que apresentaram maiores *bootstraps* foram a 144 (B144) e a 151 (B151) (Figura 5).

Tabela 3: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços superior, médio e inferior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior
Riqueza	17,3	15,5	15,7	13	19,5	15,7	18,3	21	16
Diversidade	2.84	2.73	2.75	2.56	2.89	2.75	2.9	3.02	2.76

Tabela 4: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Média	Superior
Riqueza	11,3	7,5	11	10	9,5	8,7	9,3	9,7	8,3
Diversidade	2,35	2,2	2,4	2,3	2,2	2,15	2,22	2,24	2,09

Tabela 5: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terço inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-Value</i>	Acesso/NCBI
Início do período chuvoso	Inferior	<i>Laetisaria fuciformis</i>	99	1 e ⁻¹⁵³	AY293139.1
		<i>Trametes versicolor</i>	99	1 e ⁻¹⁴³	KM222266.1
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	99	2 e ⁻¹⁵⁵	JQ698926.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	99	5 e ⁻¹⁴²	HQ832428.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	Médio	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832427.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Acidomyces acidothermus</i>	98	4 e ⁻¹³⁷	JQ172747.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Knufia petricola</i>	98	6 e ⁻¹³⁷	KC988739.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
Período Chuvoso	Inferior	<i>Aspergillus glaucus</i>	100	1 e ⁻¹⁵³	AY083218.1
	Médio	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Marasmius alliaceus</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	NG_013179.1
Período Seco	Inferior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Coniophora puteana</i>	95	48e ⁻¹¹⁵	GU187631.1
		<i>Sistotrema brinkmanni</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	KM232435.1
	Médio	<i>Coniophora puteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Microdochium nivale</i>	95	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Coniophora pauteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1

Tabela 6: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Início do período chuvoso	Médio	<i>Anomoloma albolutescens</i>	97	8e ⁻¹⁴⁵	GU187618.1
		<i>Malassezia restricta</i>	98	1e ⁻⁶⁰	AAYY01000016.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
Período Chuvoso		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
		<i>Rhodotarzetta rósea</i>	97	4e ⁻¹⁴⁷	DQ646550.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
	Superior	<i>Microdochium nivale</i>	97	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Rizoctonia solani</i>	97	1e ⁻¹⁴³	D85644.1
Período Seco	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1

Tabela 7: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S, nos exsudatos xilêmáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente.

Coleta	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Catatas altas	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
Santa Bárbara	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Alloclavaria purpurea</i>	99	6e ⁻¹³¹	DQ437679.1
	<i>Wallemia sebi</i>	98	3e ⁻⁸⁰	KM582658.1
	<i>Coniophora puteana</i>	93	3e ⁻¹⁰⁸	GU187631.1
	<i>Boletus rubropunctus</i>	85	4e ⁻⁶²	FJ480426.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
	<i>Teratosphariacea sp.</i>	99	9e ⁻¹³⁴	GU250359.1

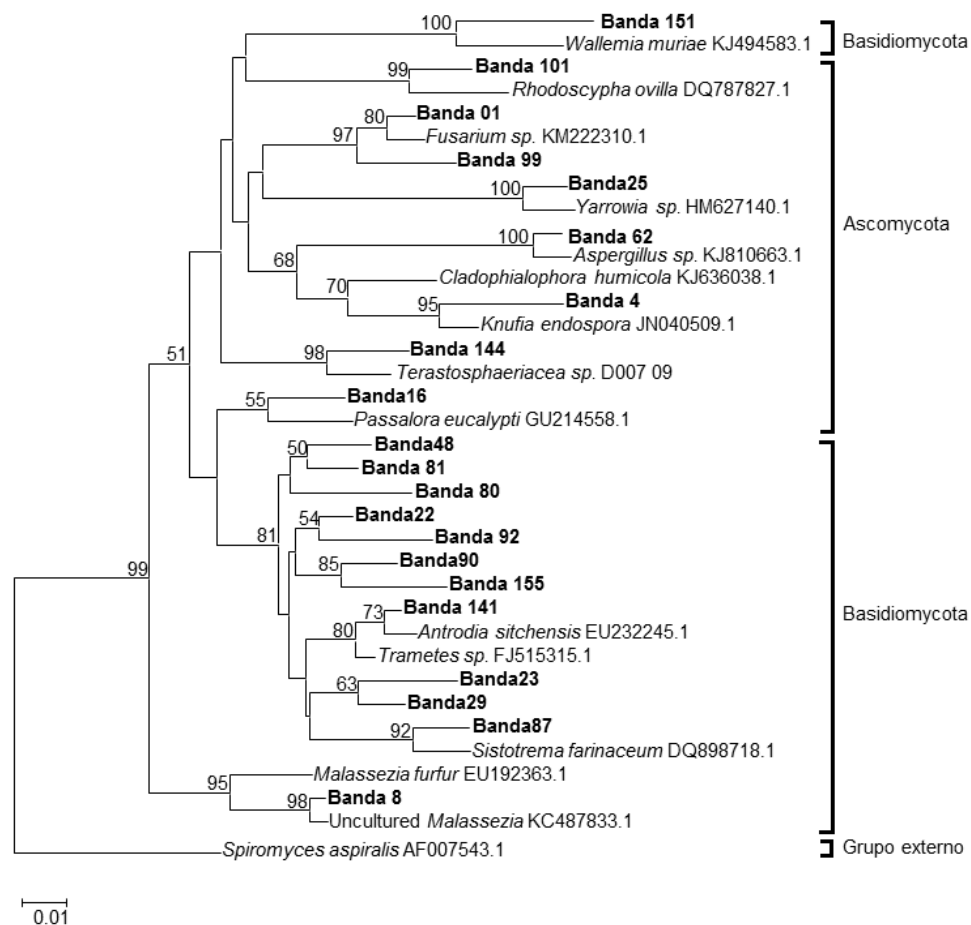


Figura 5: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos identificados em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto com 18 e 72 meses de idade cultivados em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos endofíticos na parte aérea de eucalipto determinada por Nested-PCR e DGGE, ao revelar número expressivo de UTOs, demonstrou ser apropriada para se avaliar a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2). Ressalte-se que esse método foi desenvolvido há mais de 20 anos (MUYZER *et al.*, 1993) e tem sido o de escolha em estudos de diversidade microbiana de vários ambientes, como no solo (BRESOLIN *et al.*, 2010), em plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e em animais (KITTELMANN *et al.*, 2012).

A abordagem Nested-PCR é a recomendada para facilitar a análise por DGGE de diferentes grupos microbianos em comunidades complexas, como, por exemplo, as de frutos de café (OLIVEIRA *et al.*, 2013), uma vez que também revela as populações menos abundantes.

A distribuição dos fungos endofíticos nos cinco grupos distintos gerados pela análise por UPGMA, em que o maior valor de similaridade (52,3%) foi o correspondente à coleta de folhas do terço inferior da copa da árvore no início do período chuvoso na região de Catas Altas. Tal fato indica a existência de mudança na composição da comunidade fúngica endofítica em função da sazonalidade e posição das folhas. Essa mudança é menos acentuada em folhas mais velhas da região de Santa Bárbara onde há menor número de clados distintos (Figura 3B). O maior valor de similaridade encontrado nessa área foi 55,3%, em período seco, no terço inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs nos três períodos de coleta das folhas de eucalipto (23 e 22) é similar; entretanto, existem UTOs específicas, as quais refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos endofíticos. Além disso, também exibem as flutuações dos períodos chuvoso e seco, a exemplo da maior incidência delas no período chuvoso em Catas Altas; ao contrário de Santa Bárbara, onde a maior incidência ocorreu no período seco (Figura 4).

As variações nos índices de diversidade de Shannon em Catas Altas, entre 2,56 a 3,02, e as de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3), e as de Santa Bárbara em que foram menores, com diversidade entre 2,09 a 2,4 e riqueza entre 7,5 a 11,3 (Tabela 4), foram interpretadas como indicativo de que os terços da copa da árvore e a sazonalidade são fatores que modificam a distribuição de UTOs (Figura 4). A diversidade de espécies é medida em termos de riqueza e uniformidade, e o índice mais comum e amplamente utilizado é o de Shannon-Wiener (H'); os valores usualmente encontrados estão entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Em

virtude disso, comunidades mais diversas tendem a apresentar maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2010), o que explica a discrepância encontrada nos índices de diversidade em folhas das localidades de Catas Altas e Santa Bárbara (Tabelas 3 e 4). Portanto, a sazonalidade molda a diversidade de fungos endofíticos em eucalipto, fato que pôde ser observado pela presença de UTOs comuns e específicas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 4 – Tabelas 3 e 4). A sazonalidade também pode de influenciar no ganho, na perda, na latência ou na manutenção de uma dada espécie microbiana na comunidade (Tabelas 3, 4 e 5). Embora o significado funcional dessas mudanças na estrutura da comunidade microbiana em função da sazonalidade não tenha sido demonstrado, alguns relatam que elas são influenciadas por fatores, como o antagonismo entre fungos, e por variáveis abióticas, que podem afetar a planta hospedeira e, assim, moldar a dinâmica da microbiota associada (GHIMIRE *et al.*, 2010).

A colonização endofítica é geralmente influenciada pela ontogenia das folhas (ARNOLD *et al.*, 2003). As variações na diversidade e na abundância observadas neste trabalho podem estar associadas com as propriedades nutricionais e de defesa em cada estágio de desenvolvimento desses órgãos (SANCHEZ-AZOFEIFA *et al.*, 2012). Entretanto, as diferenças na diversidade de fungos endofíticos entre as plantas de Catas Altas (mais juvenis) e as de Santa Bárbara (mais velhas), não podem ser atribuídas somente à idade das plantas. Outras variáveis, a exemplo dos ciclos de cultivo e rotação, dos teores de nutrientes e açúcares nas folhas e de outras características, podem, em conjunto, ter influenciado as diferenças entre os índices de diversidade nas duas áreas (Tabelas 5 e 6). Ciclos de cultivo e de rotação podem interferir na comunidade fúngica do solo (ELLOUZE *et al.*, 2014) e, conseqüentemente, na colonização endofítica, já que muitos dos micro-organismos endofíticos presentes em folhas são originários do solo (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009). Adicionalmente, outros fatores também podem contribuir para as diferenças das comunidades endofíticas, tais como mudanças na fisiologia das folhas e presença de substâncias químicas, a exemplo de compostos fenólicos que podem limitar a riqueza de espécies microbianas. Por serem esses compostos inibidores naturais da colonização fúngica, em especial de representantes do filo Ascomycota, como *Aspergillus* (BANSO & RAI, 2008) e *Fusarium* (KAUR *et al.*, 2011), esses compostos podem ter inibido a presença desses táxons nas plantas mais velhas de Santa Bárbara.

A presença de maior número de UTOs nos terços médio e inferior da copa de plantas da área de Santa Bárbara (Tabela 6) possivelmente resultou de condições abióticas mais favoráveis, como maior umidade e menor incidência de radiação ultravioleta. A quantidade e a qualidade da luz incidente nas folhas, pode ter contribuído para a menor frequência de fungos nos terços superiores da copa bem como para as diferenças observadas entre as árvores de Catas Altas e de Santa Bárbara. Na literatura, há relatos de que as condições de luminosidade podem diminuir a viabilidade de propágulos fúngicos ou causar efeitos deletérios em conídios, especialmente a radiação UV-B (ISAAC, 1995; ARNOLD & HERRE, 2003; POSADAS *et al.*, 2012).

As diferenças na distribuição de fungos endofíticos nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos (Tabelas 5, 6 e 7), pode indicar que a colonização endofítica seja dependente do local ou órgão da planta amostrado. As espécies *Pachylepyrium carbonicola* e *Malassezia restricta* (Tabela 5), presentes em Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* (Tabela 6), observado em Santa Bárbara, podem ocupar diferentes micro-habitats no corpo da planta, indicando comportamento mais generalista (Tabelas 5 e 6). É relatado na literatura que fatores como altitude, umidade, densidade da copa, entre outros fatores, podem influenciar o nível de infecção da planta (QI *et al.*, 2012). O fato de as folhas abrigarem mais espécies fúngicas endofíticas (Tabelas 5 e 6) do que os exsudatos xilemáticos (Tabela 7) pode ser atribuído às diferenças nas barreiras à infecção vigentes nesses dois locais, bem como a capacidade do xilema em selecionar os micro-organismos nesse ambiente (ARNOLD & LUTZONI, 2007).

Os principais colonizadores encontrados nesse estudo (Tabelas 5, 6 e 7) diferem dos encontrados em *Eucalyptus nitens* cultivados na Austrália e Inglaterra (FISHER *et al.*, 1993). Isso pode ser atribuído à espécie da planta e às condições ambientais distintas das do presente trabalho. Além disso, as diferenças encontradas na estrutura da comunidade fúngica endofítica em diferentes espécies de eucalipto podem estar relacionadas à estratégia metodológica utilizada, já que Fisher *et al.* (1993) utilizaram métodos dependente de cultivo. A diversidade de fungos endofíticos nos exsudatos xilemáticos de eucalipto é influenciada pelo local e pela sazonalidade (Tabela 7). Na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre diversidade de fungos em exsudatos xilemáticos de árvores de eucalipto de florestas plantadas. Os exsudatos xilemáticos apresentam compostos nitrogenados e ácidos orgânicos (PFAUTSCH *et al.*, 2009), além de açúcares como sacarose, frutose, glicose, galactose e arabinose em pequenas concentrações

(MATTIELLO *et al.*, 2009). Em razão dessa composição o xilema pode ser considerado como um habitat oligotrófico para o crescimento e desenvolvimento microbiano em várias plantas, incluindo eucalipto (YADETA & THOMMA, 2013).

Os fungos endofíticos mais frequentes observados em eucalipto cultivado em Catas Altas e Santa Bárbara foram *Fusarium solani*, *Malassezia restricta*, *Pachylepyrium carbonicola* e *Boletus rubropunctus* (Tabelas 5 e 6). A alta identidade das sequências obtidas com as do banco de dados do NCBI (Tabelas 5, 6 e 7) foi o critério utilizado para a confirmação dessas espécies como pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (Figura 5). Embora muitas delas sejam patogênicas para algumas plantas, no presente trabalho, mostraram-se como de natureza endofítica. Ressalte-se que a desinfestação da superfície de folhas saudáveis, sem sintomas de infecção, foi comprovada pela ausência de crescimento fúngico em R2A da última água de lavagem. A alta dominância de alguns grupos fúngicos (Tabelas 5, 6 e 7) é uma indicação de que eles possam ter papel relevante na fisiologia da planta. Espécies fúngicas podem produzir ampla variedade de reguladores de crescimento, como giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) e auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012) e também conferir tolerância a fatores bióticos e abióticos adversos (HUBBARD *et al.*, 2014).

Os fungos endofíticos presentes no xilema apresentaram altos *bootstraps* (Figura 5) e similaridade com aqueles que são geralmente encontrados no solo e nas folhas de eucalipto, fato que pode explicar a origem da colonização xilemática. Micro-organismos endofíticos podem colonizar a planta por meio de ferimentos, nos sítios de emergência de raízes laterais (HALLMAN *et al.*, 1997) ou pela liberação de enzimas hidrolíticas (ROBL *et al.*, 2013) que lhes permitem adentrar e colonizar a planta (HALLMAN *et al.*, 1997). Dentro da planta, os exsudatos xilemáticos podem funcionar como meio de transporte para a colonização endofítica, seguindo o fluxo ascendente da seiva do xilema. Tal fato pode explicar a ocorrência de *Fusarium solani* e *Marasmius alliaceus* em folhas e exsudatos xilemáticos de Catas Altas (Figuras 5 e 7) e *Boletus rubropunctus* em folhas e exsudatos de Santa Bárbara (Figuras 6 e 7).

As comunidades fúngicas nas folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto mostraram-se distintas uma da outra. Somente os fungos *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* estavam presentes nas duas comunidades (Tabelas 5, 6 e 7). As espécies de *Fusarium* são relatadas como as mais frequentemente isoladas como endofíticas em plantas tropicais (VEGA *et al.*, 2010). Fungos do gênero *Marasmius* são reconhecidos pela produção de

metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli* (ROSA *et al.*, 2003). Esse grupo já foi descrito como endofítico (NGIENG *et al.*, 2013). Entretanto, na literatura consultada, não foi encontrada relatos de endofitismo para a espécie *Marasmius alliaceus*. O gênero *Boletus* apresenta espécies descritas como endofítica em folhas de *Pinus* sp., (ARNOLD *et al.*, 2007). No entanto, a espécie *Boletus rubropunctus* é relatada aqui como endofítica pela primeira vez.

A presença de *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* nos exsudatos xilemáticos de eucalipto indica que esses micro-organismos podem ser transportados às folhas por meio do fluxo ascendente da seiva do xilema, após adentrarem a planta via raiz. A presença de fungos endofíticos em folhas e exsudatos aqui relatada amplia a compreensão da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de fungos endofíticos nessa importante espécie florestal é etapa importante para o acesso a esse patrimônio genético na busca de metabólitos e processos que possam contribuir para a melhoria no desenvolvimento da planta.

CONCLUSÕES

A DGGE foi eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade.

Os filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica endofítica em eucalipto.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilemáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W.; MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410. 1990.
- ARNOLD, A. E., HENK, D. A., EELLS, R. L., LUTZONI, F., & VILGALYS, R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v. 99, p. 185-206, 2007.

- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, 88, p. 541–549, 2007.
- BANSO, D. S & RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 81-88, 2008.
- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 391-403, 2010.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. (2014). Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- ELLOUZE, W., ESMAEILI TAHERI, A., BAINARD, L. D., YANG, C., BAZGHALEH, N., NAVARRO-BORRELL, A., HANSON, K & HAMEL, C. Soil fungal resources in annual cropping systems and their potential for management. **BioMed Research International**, 2014.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- FISHER, P. J., PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, p. 338-345, 1993.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 19-27, 2011.
- HALLMAN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** v. 4, p. 9, 2001.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUBRRARD, M., GERMIDA, J. J. & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 109-122, 2014.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- IGLESIAS-TRABADO, G & WILSTERMANN, D. *Eucalyptus universalis*. Global cultivated eucalypt forests map, 2008.
- ISAAC, S. Mycology Answers: Old papers, manuscripts and books often develop brown spots and patches; are these caused by fungi?. **Mycologist**, v. 9, n. 3, p. 138-139, 1995.
- KAUR, S., SINGH, H. P., BATISH, D. R & KOHLI, R. K. Chemical characterization and allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*. **Journal of Plant Interactions**. v. 6, p. 297-302, 2011.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) Suitable for Large-Scale Sequence-Based Community Structure Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LIANG, Z., DRIJBER, R. A., LEE, D. J., DWIEKAT, I. M., HARRIS, S. D & WEDIN, D. A. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 956-966, 2008.
- LINDOW, S. E & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875–1883, 2003.
- LUO, J., WALSH, E., NAIK, A., ZHUANG, W., ZHANG, K., CAI, L & ZHANG, N. Temperate pine barrens and tropical rain forests are both rich in undescribed fungi. **PloS One**, v. 9, p. e103753, 2013.
- MATTIELLO, E. M., RUIZ, H. A., SILVA, I. R. D., SARKIS, J. E. S., NEVES, J. C. L & PUCCI, M. M. Phloem mobility of boron in two eucalypt clones. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1695-1704, 2009.
- MAY, L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 829-841, 2001.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C & UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p.695–700, 1993.

- NGIENG, N. S., ZULKHARNAIN, A., ROSLAN, H. A., & HUSAINI, A. Decolourisation of synthetic dyes by endophytic fungal flora isolated from Senduduk plant (*Melastoma malabathricum*). **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PFAUTSCH, S., GESSLER, A., ADAMS, M. A & RENNENBERG, H. Using amino-nitrogen pools and fluxes to identify contributions of understory *Acacia* spp. overstory *Eucalyptus regnans* and stand nitrogen uptake in temperate Australia. **New Phytologist**, v. 183, p. 1097-1113, 2009.
- POSADAS J. B., MARICEL, A. L., MINI J. I & LECUONA R, E. Natural Tolerance to UV-B and Assessment of Photoprotectants in Conidia of Six Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Griv) Vuillemin. **World Applied Sciences Journal**, v. 20, p. 1024-1030, 2012.
- QI, F., JING, T & ZHAN, Y. Characterization of endophytic fungi from *Acer ginnala* Maxim. in an artificial plantation: media effect and tissue-dependent variation. **PLoS ONE**, v. 7, p. 46785-46785, 2012.
- REASONER, D. J & GELDREICH, E. E A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, p. 1-7, 1985.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C., VICENTE, V. A., PRADELLA, J. G. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v.13, p. 1-12, 2013.
- ROCKWOOD, D. L., RUDIE, A. W., RALPH, S. A., ZHU, J. Y & WINANDY, J. E. Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1361-1378, 2008.
- ROSA, L. H., MACHADO, K. M. G., JACOB, C. C., CAPELARI, M., ROSA, C. A., & ZANI, C. L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 967-974, 2003.
- SANCHEZ-AZOFEIFA, A., OKI, Y., FERNANDES, G. W., BALL, R. A & GAMON, J. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees**, v. 26, p. 291–299, 2012.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.

- TORSVIK, V & OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p. 240-245. 2002.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- VEGA, F. E., SIMPKINS, A., AIME, M. C., POSADA, F., PETERSON, S. W., REHNER, A., INFANTE, F., CASTILLO, A & ARNOLD, E. A. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, n. 3, p. 122–138, 2010.
- YADETA, K. A & THOMMA, B. P. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-12, 2013.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 3

FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS ENDOFÍTICOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As folhas do eucalipto sustentam diversidade variável de fungos filamentosos e de leveduras que podem exercer influência na sanidade e no desenvolvimento da planta. Endofíticos interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença. Fungos simbiossiontes podem utilizar açúcares solúveis simples, como glicose e frutose, os quais podem funcionar como principal fonte de carbono para esses micro-organismos. O eucalipto é cultivado em todo o mundo e é a espécie da família Myrtaceae mais amplamente distribuída e utilizada em plantios comerciais. Neste estudo, a diversidade e a distribuição de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos do híbrido eucalipto urograndis foram determinadas e relacionadas à concentração de açúcares em folhas provenientes de plantas em cinco fases de desenvolvimento, incluindo as mudas de viveiro e plantas em campo. O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Foram identificadas: 15 espécies e dois gêneros de fungos e duas espécies e sete gêneros de leveduras. As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a estrutura da comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em folhas. Muitas das espécies identificadas são específicas de determinada fase de desenvolvimento. Os fungos endofíticos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos de folhas de plantas da fase de jardim clonal; *Chaetomella acutisetula* e *Ascotricha chartarum* de folhas da fase de sombreamento; *Erratomyces patellii* e *Saxomyces* sp. de folhas da fase de saída do sombreamento; *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da fase de expedição, e *Mycosphaerella populicola*, das folhas de plantas do campo. As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* são específicas das folhas das fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento, respectivamente. Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar folhas de plantas provenientes de mais de uma fase de desenvolvimento. O fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem em plantas nas fases de expedição e de campo, e o gênero *Candida*, nas de jardim clonal, sombreamento e saída do sombreamento. Neste estudo é apresentada pela primeira vez a presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

Palavras-chave: diversidade, fungos, leveduras, endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

A parte aérea das plantas, especialmente as folhas, é considerada habitat de grande importância agrônômica e ecológica, por hospedar grande diversidade de micro-organismos endofíticos e epifíticos, incluindo fungos e leveduras. Os micro-organismos endofíticos, em particular, já foram encontrados em várias espécies de plantas, sendo importantes componentes da biodiversidade (ARNOLD *et al.*, 2000). *Eucalyptus* spp. são as plantas da família Myrtaceae mais amplamente distribuídas e utilizadas em plantios comerciais em muitos países (FAO, 2015), devido ao seu rápido crescimento, à sua adaptabilidade e ao valor comercial de sua madeira (BROOKER, 2000). A avaliação da diversidade e abundância de fungos filamentosos e de leveduras em eucalipto, com a utilização de metodologia independente de cultivo, reconhecidamente retrata, com maior fidelidade, a complexidade dessas comunidades e suas interações com a planta (KEMLER *et al.*, 2013). Assim, a complexidade da microbiota fúngica endofítica tem sido subestimada até o momento.

As leveduras compreendem o maior grupo de micro-organismos epifíticos em interação com plantas (WHIPPS *et al.*, 2008), enquanto fungos endofíticos são abundantes em folhas assintomáticas de várias árvores tropicais (ARNOLD, 2005). Esses micro-organismos apresentam grande influência sobre a planta, por afetarem a estrutura da comunidade e a diversidade de organismos a ela associados ou a adaptabilidade e evolução do hospedeiro (OMACINI *et al.*, 2001; BRUNDRETT, 2006). Além disso, são fontes de várias enzimas de interesse industrial, como celulasas, xilanases, lacases, pectina liase, hemicelulasas, entre outras, e, por isso, estão entre os micro-organismos de maior interesse para produção de biocompostos industriais (LUMYONG *et al.*, 2002; ROBL *et al.*, 2013).

Endofíticos são organismos que vivem interiormente nos tecidos da planta, não causando sintomas de doenças (ARNOLD *et al.*, 2007), e, em associação com árvores, podem reduzir danos às folhas e as perdas ocasionadas por patógenos (ARNOLD *et al.*, 2003). Apesar de o Brasil ter a maior área de plantio de eucalipto no mundo e da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de fungos nessa planta (CHEEWANGKON *et al.*, 2009; SÁNCHEZ MÁRQUEZ *et al.*, 2011), pouco se conhece sobre a dinâmica das comunidades microbianas endofíticas durante as fases de desenvolvimento da planta em viveiro e no campo. A compreensão do impacto das práticas de produção de mudas em viveiros sobre a estrutura das comunidades microbianas endofíticas é fundamental para a produção de mudas mais saudáveis e resistentes ao transplante para o campo.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de fungos filamentosos e de leveduras endofíticas associados às folhas de eucalipto em fases distintas do desenvolvimento da planta, em viveiros comerciais e em campo, e relacioná-la às concentrações de açúcares foliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Este estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP – etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e a campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato.

Fertilizantes	Doses* (kg/m³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira

(CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de $340 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ /rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é $19^\circ 24' 54''$, a longitude $42^\circ 25' 56''$ e a altitude 318 m. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulinitico ou caulinitico-oxidico ou gibbsitico-oxidico, hipoferrico ou mesoferrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente; a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56, 39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Amostragem

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20°C . Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato ($0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi

repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspenso e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspenso *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Extração de açúcares

As amostras de folhas de eucalipto foram analisadas quanto ao conteúdo de glicose, frutose e sacarose (LISEC *et al.*, 2006) por metodologia adaptada. O extrato das amostras de folhas de cada uma das cinco fases de desenvolvimento

da planta foi preparado por maceração, em almofariz e pistilo, de cerca de 50 a 60 mg de tecido foliar, seguindo-se a transferência do macerado para tubo de polipropileno e adição de 1000 µL de metanol (100%). Essa mistura foi aquecida a 70°C sob agitação de 950 rpm durante 60 min, seguindo-se a centrifugação a 14000g por 10 min. Cerca de 600 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos contendo 500 µL de clorofórmico e 800 µL de água. Após centrifugação a 12000g por 15 min, a fase polar foi coletada (1000 µL), e os açúcares quantificados por ensaios enzimáticos acoplados, pelo aumento da densidade óptica a 340 nm da razão NADP/NADPH⁺H⁺ detectada (Multiscan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As enzimas utilizadas foram glicose 6-fosfato (0,2 mg/mL), hexoquinase (0,2 mg/mL), fosfoglicose isomerase (0,2 mg/mL) e invertase (1 mg/mL). Sucessivamente, essas enzimas foram adicionadas ao extrato de folhas e as concentrações de glicose, frutose e sacarose expressas em mmol/kg de massa seca. A concentração de sacarose foi estimada como correspondente à metade da concentração de hexose. As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise da diversidade de fungos e leveduras

A diversidade de fungos e de leveduras em folhas de eucalipto foi examinada por DGGE, e a estratégia Nested-PCR foi utilizada. Na primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos e dos domínios D1-D2 de rRNA 26S de leveduras. Os oligonucleotídeos iniciadores NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram os utilizados para amplificação de fungos, e o NL1 (COCOLIN *et al.* 2000) e NL4 (PRAKITCHAIWATTANA *et al.*, 2004), para leveduras. Os fragmentos específicos gerados foram utilizados como molde para segunda PCR, sendo a região V7-V8 amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000) para amplificação de fungos e NL1GC e LS2 (COCOLIN *et al.* 2000) para leveduras. Esses oligonucleotídeos continham grampo GC incorporado à região *forward*.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µmol de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mmol de cloreto de magnésio, 0,16 µmol dos *primers* NS1, EF3, NL1 e NL4, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações para fungos foram realizadas sob as seguintes

condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72°C e extensão final durante 10 min a 72°C. Para a amplificação dos *amplicons* das leveduras a temperatura inicial foi de 95°C e a de anelamento 52°C. A segunda PCR foi realizada com 1,0 µL da primeira como molde, e substituição do *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC e NL1 e NL4 por NL1GC e LS2. Os *amplicons* de fungos filamentosos foram amplificados em desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min, extensão por 1 min a 72°C e extensão final a 72°C durante 10 min. Com os *amplicons* de leveduras, a desnaturação inicial foi a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, 52°C e 72°C durante 2 min para anelamento e extensão, e, extensão final a 72°C por 7 min.

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após a Nested-PCR foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermo-lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização das bandas dos géis com utilização do software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (m/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09 % (v/v) TEMED (N,N,N=,N=tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% (fungos filamentosos) e 40%-60% (leveduras) ureia/formamida [(100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida)]. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis obtidos por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, os *amplicons* eluídos em 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos *over night* a 4°C. Uma

alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência dos fungos filamentosos e das leveduras foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos filamentosos e de leveduras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e a ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software Sigma plot (Systat Software, Inc. 2008). Foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificar a correlação entre os teores de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e os índices de riqueza e diversidade a 5% de probabilidade (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S ou 26S, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética foi baseado no alinhamento dessas sequências, utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram realizados por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a estrutura da comunidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em fases distintas de desenvolvimento das plantas foram examinadas por DGGE e sequenciamento do rRNA 18S e 26S. O protocolo de extração de DNA e a amplificação dos genes rRNA 18S e 26S foram eficientes para acessar a diversidade dessas comunidades endofíticas em folhas de eucalipto (Figura 1).

A análise por DGGE mostrou que o número de táxons representados pelas UTOs, é afetado pelas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2), indicando mudança na comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em interação com a planta. O padrão obtido pelos *primers* proporcionou a observação de bandas mais e menos intensas no perfil eletroforético (Figuras 1 e 2), permitindo a análise de populações de maior e menor abundância.

O perfil da comunidade de leveduras mostrou maior complexidade (Figura 2) e homogeneidade nas diferentes amostras em comparação ao perfil de fungos (Figura 1), evidente pelo maior número de UTOs e pela maior riqueza e diversidade (Figuras 4 e 5).

A análise de agrupamento hierárquico por UPGMA revelou que os padrões dos perfis entre as etapas de cultivo foram diferentes (Figura 1B e 2B). Os resultados da análise de agrupamento indicam a formação de grupos distintos que compartilham entre 25% (Figura 1) e 35% (Figura 2) de similaridade e subgrupos mais similares que tendem a agruparem juntos. As folhas das plantas oriundas do jardim clonal e das plantas recém-saídas do sombreamento apresentaram composição da comunidade fúngica similar, e as do sombreamento e expedição formaram pelo menos um clado com 43,9% e 64,2% de similaridade (Figura 1). À exceção do subgrupo das folhas em sombreamento, em todas as fases de desenvolvimento das plantas, a comunidade de leveduras foi similar, alcançando valores de mais de 87% de similaridade no jardim clonal (Figura 2).

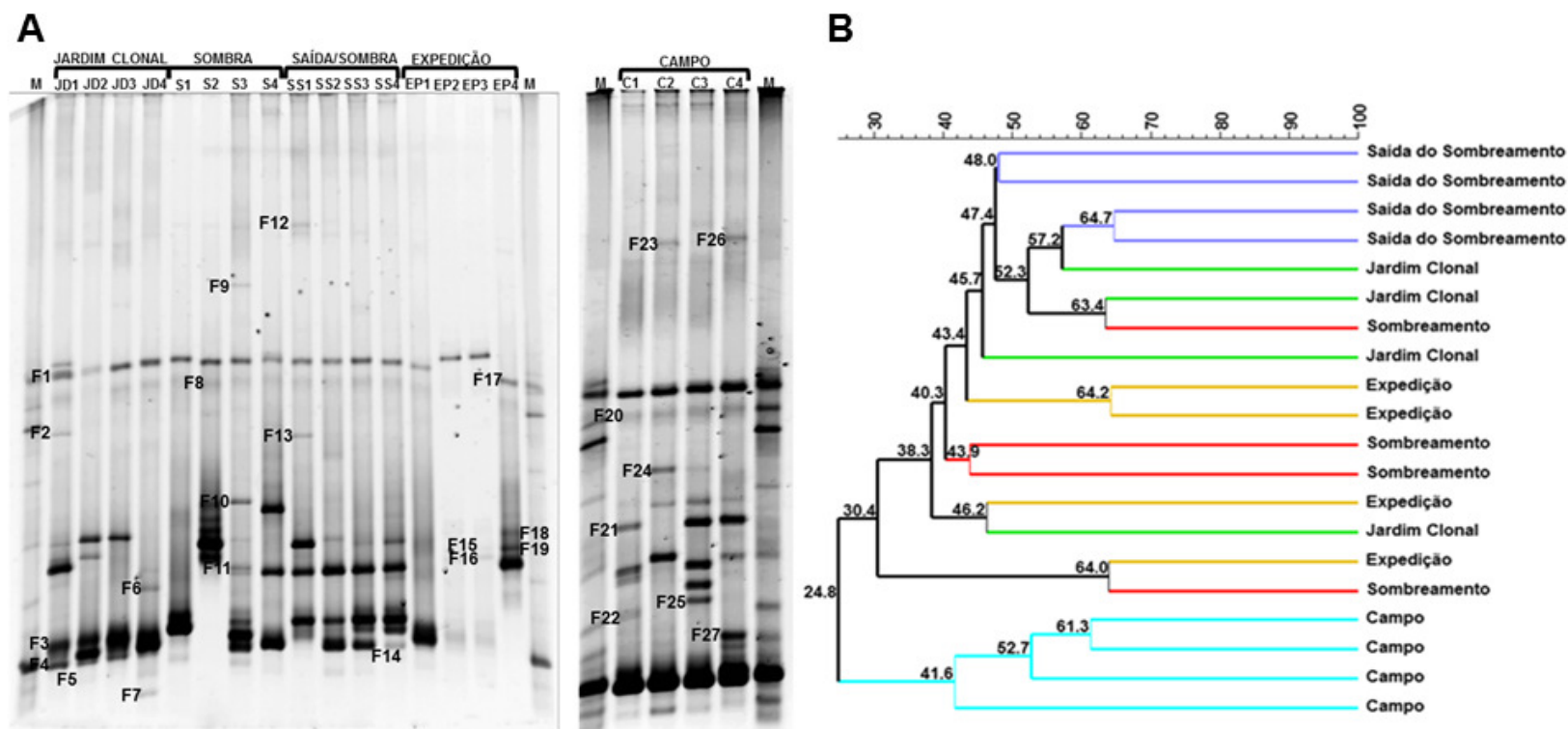


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos durante as fases de desenvolvimento do eucalypto. A – Gel a partir da DGGE. As letras F seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalypto em quatro repetições.

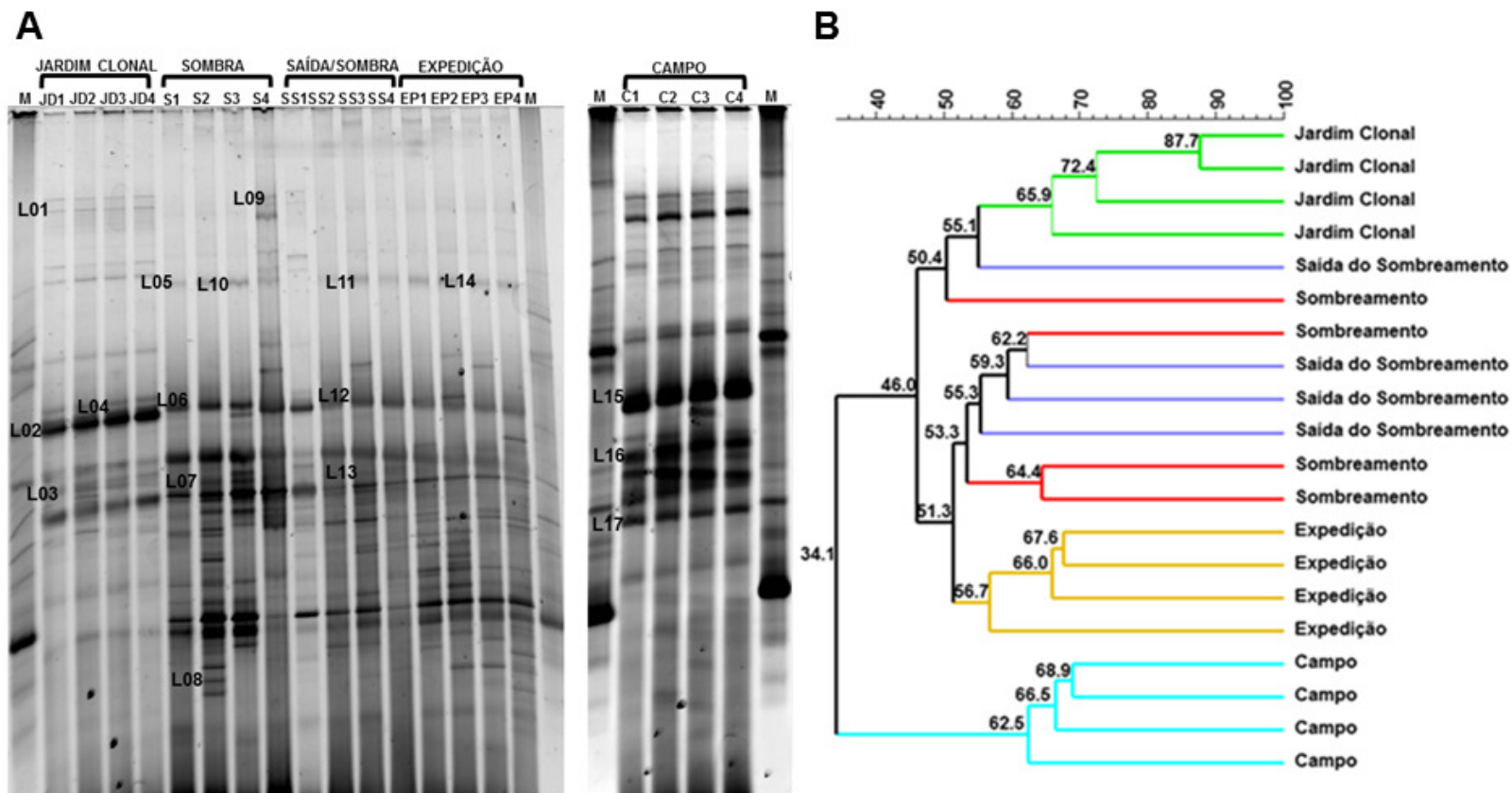


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de leveduras endofíticas durante as fases de desenvolvimento do eucalipto. A – Gel a partir da DGGE. As letras L seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalipto em quatro repetições.

Embora a maioria das UTOs (8 e 10) seja comum entre as fases de desenvolvimento das plantas, existem UTOs específicas para cada uma delas, refletindo diferenças na estrutura das comunidades de fungos filamentosos e leveduras. A maior incidência de UTOs específicas de fungos ocorreu nas folhas provenientes do campo, enquanto para leveduras isso ocorreu nas folhas da expedição e campo (Figura 3). Mesmo sendo pequenas, essas mudanças mostraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto modulam a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, fato mais evidente para as leveduras.

A diversidade e a riqueza de fungos endofíticos não foram influenciadas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 4), diferentemente do observado para as leveduras que apresentaram maiores médias desses índices nas amostras das plantas em expedição (Figura 5). As folhas do jardim clonal foram as que mostraram os menores índices de diversidade e de riqueza de leveduras (Figura 5).

A concentração de glicose e frutose variou em relação às folhas provenientes das fases de desenvolvimento das mudas e no campo, enquanto os teores de sacarose foram mais próximos. As maiores concentrações de glicose e frutose foram encontradas nas folhas das plantas em expedição e no campo, enquanto as de sacarose somente em campo (p -valor $< 0,05$) (Figura 6). Entretanto, as correlações entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de riqueza e diversidade de Shannon foram moderadamente negativas ($-0,8 < r \leq -0,5$) (p -valor $> 0,05$).

A identificação das UTOs foi realizada pela excisão das bandas do gel da DGGE, sequenciamento do rRNA 18S e 26S e comparação das sequências obtidas pelo algoritmo BLASTn (NCBI). O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Dentro desses filos, foram identificadas 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos (Figura 7) e duas espécies e sete gêneros de leveduras (Figura 8), em plantas de diferentes idades, em viveiro e em campo.

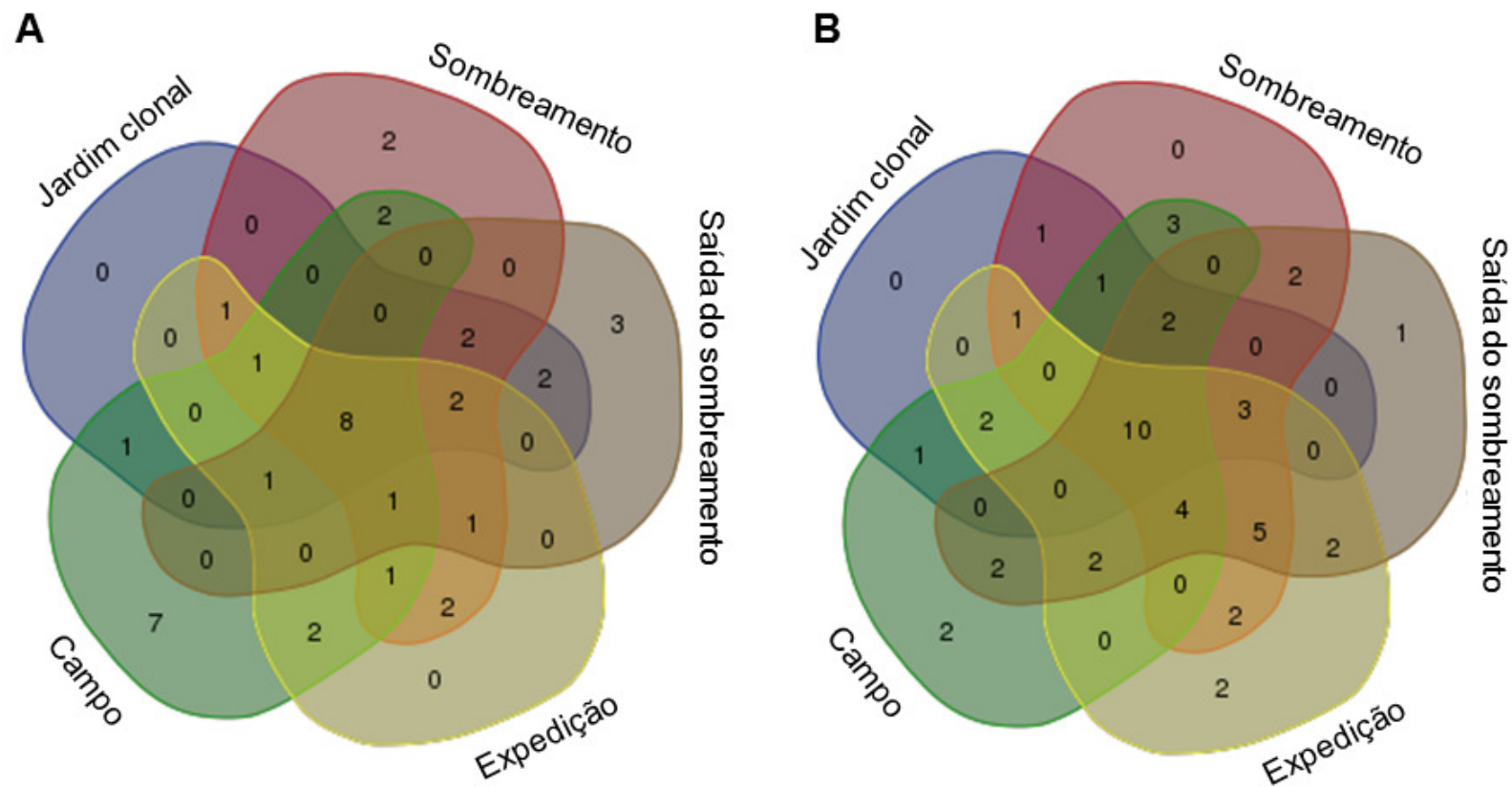


Figura 3: Distribuição de UTOs de fungos (A) e de leveduras (B) pelo diagrama de venn em diferentes etapas de desenvolvimento das folhas de eucalipto: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo.

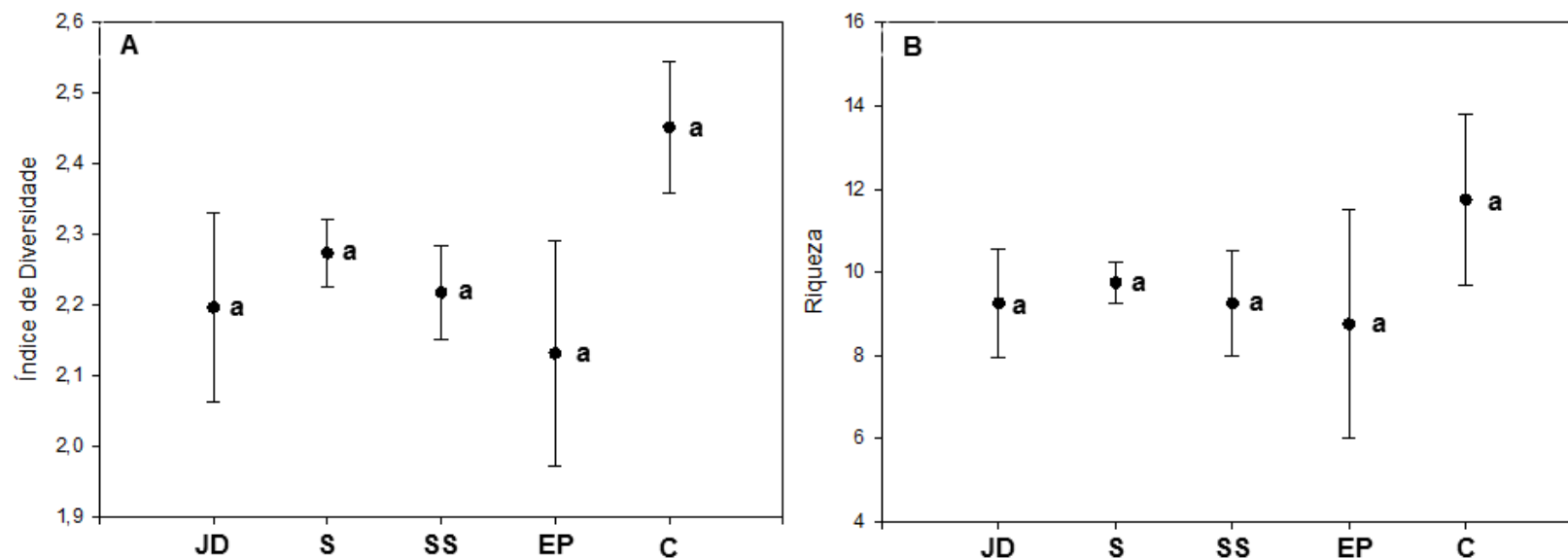


Figura 4: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de fungos endofíticos em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

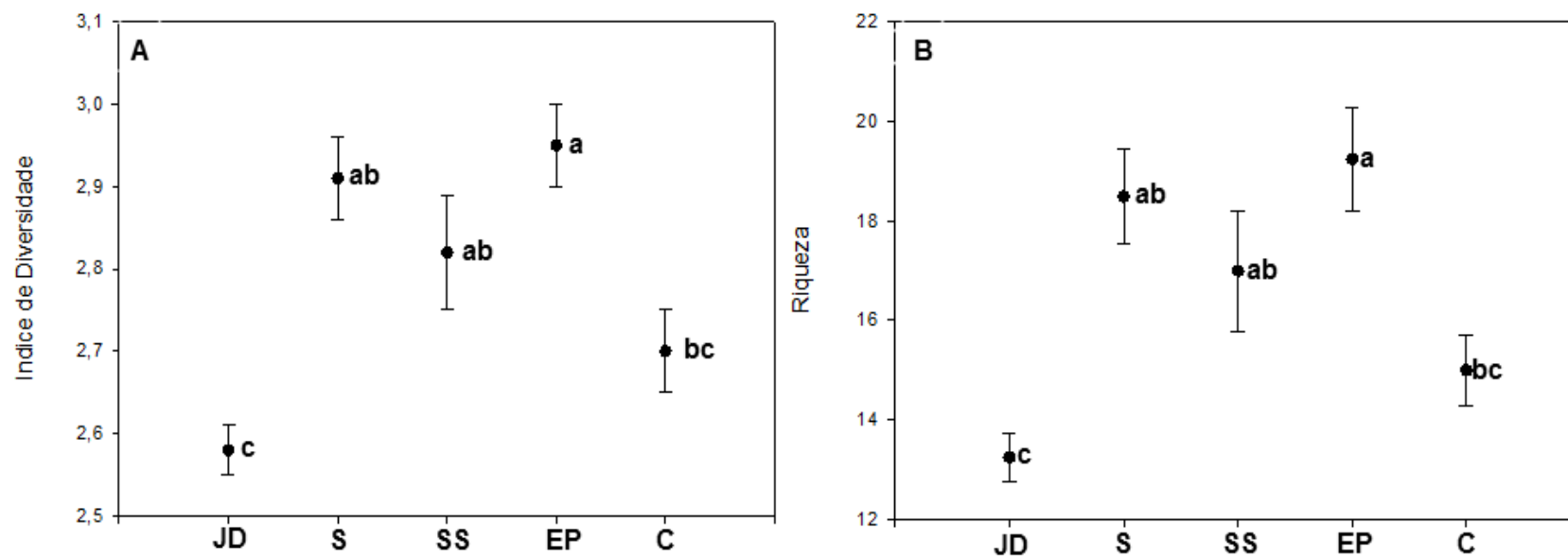


Figura 5: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de leveduras endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

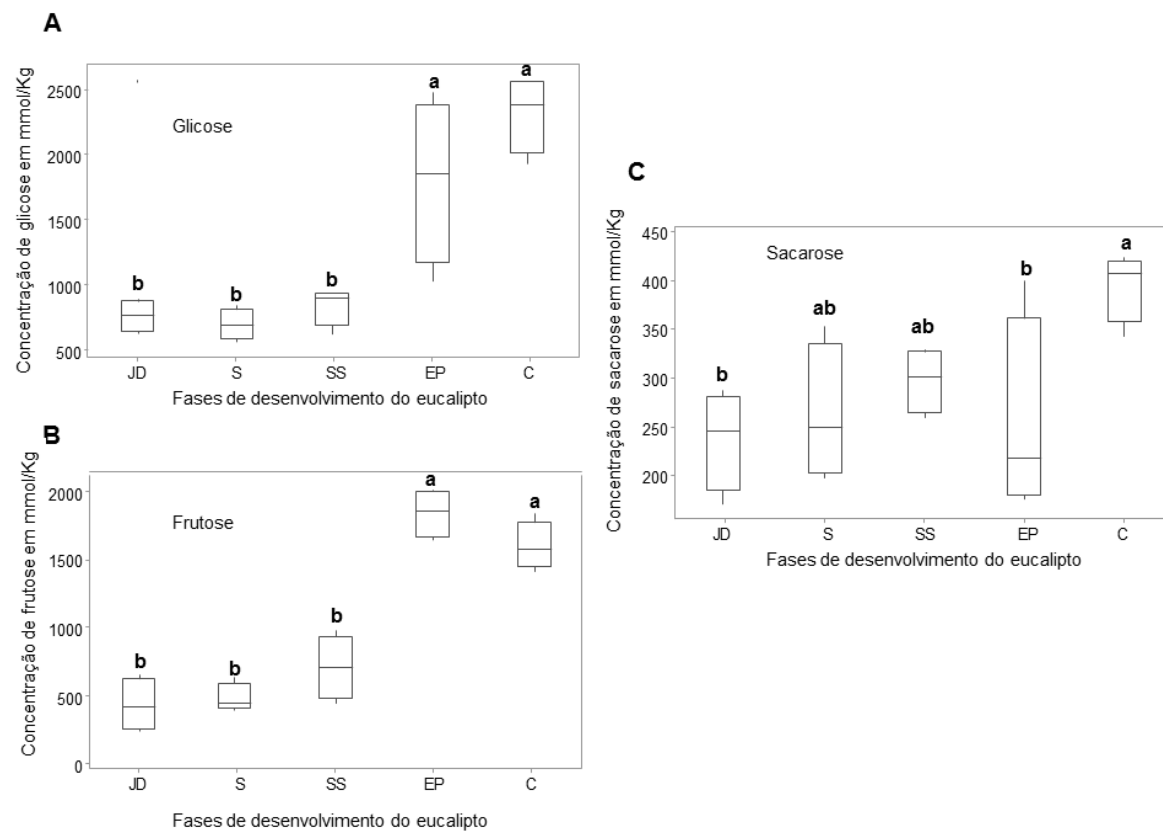


Figura 6: Boxplots mostrando as concentrações de açúcares (glicose, frutose e sacarose) em mmol/kg de folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. (A): glicose (B): frutose e (C): sacarose. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação entre fungos endofíticos e eucalipto é dependente das fases de desenvolvimento da planta, pois a maioria das espécies é fase-específica (Tabela 2). Entretanto, *Cladosporium* sp. e *Teratosphaeria acidotherma*, se mostraram presentes em mais de uma etapa (Tabela 2). Essas diferenças na colonização endofítica em folhas de eucalipto podem indicar a presença de condições mais favoráveis ao estabelecimento de determinadas espécies em dado momento. O menor número de fungos endofíticos identificados pelo sequenciamento do rRNA 18S foram provenientes das plantas sombreadas, todas elas específicas dessa fase de desenvolvimento (Tabela 2).

A comunidade de leveduras em interação com o eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento das plantas foi acessada pela primeira vez em eucalipto e, à semelhança do que ocorre em *Coffea arabica* (MASOUD *et al.*, 2004), é composta por muitos representantes de poucas espécies ou gêneros, distribuídas nos filos Ascomycota e Basidiomycota. A maioria das UTOs sequenciadas foi identificada em nível de gênero por apresentarem identidades abaixo de 97% com as sequências do banco de dados NCBI (Tabela 3). Entretanto, os representantes do filo Basidiomycota *Rhodospodium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* apresentaram identidades de 99 e 98%, respectivamente, valores esses que possibilitaram a identificação em nível de espécie. Essas leveduras são específicas das fases de expedição e campo (Tabela 3). Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em folhas de eucalipto. As leveduras endofíticas identificadas em interação com eucalipto mostraram ser dependentes da fase de desenvolvimento em associação com a planta. Tanto fungos quanto leveduras não são persistentes durante o desenvolvimento do eucalipto.

A análise filogenética das sequências de rRNA 18S revelou que a comunidade de fungos endofíticos presente nas folhas de eucalipto pertence aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), valores que suportam a análise (Figura 7).

Tabela 2: Distribuição das espécies/gêneros de fungos endofíticos identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade		Banda	Filo
			(%)	Acesso/NCBI		
Jardim Clonal (JD)	<i>Diplomitoporus crustulinus</i>	9 e ⁻¹³⁸	99	AY336770.1	B10	Basidiomycota
	<i>Podosphaera tridactyla</i>	5 e ⁻¹³⁵	99	AB022392.1	B07	Ascomycota
	<i>Aspergillus restrictus</i>	2 e ⁻¹³⁸	99	AB008407.1	B11	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Ascotricha chartarum</i>	6 e ⁻¹⁵⁵	99	AB048283.1	B12	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	3 e ⁻¹³³	99	AY544728.1	B13	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹³⁰	98	AB537894.1	B14	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	7 e ⁻⁹⁹	91	AY544728.1	B15	Ascomycota
Saída do Sombreamento (SS)	<i>Erratomyces patelii</i>	2 e ⁻¹⁰⁸	96	DQ663693.1	B17	Basidiomycota
	<i>Saxomyces</i> sp.	1 e ⁻¹¹⁶	98	KC315864.1	B20	Ascomycota
Expedição (EP)	<i>Lepidostroma</i> sp.	6 e ⁻⁴⁰	99	AB767250.1	B21	Basidiomycota
	<i>Schizophyllum radiatum</i>	5 e ⁻¹¹¹	95	AY705952.1	B22	Basidiomycota
	<i>Mycosphaerella lateralis</i>	7 e ⁻¹³⁹	99	GU214531.1	B25	Ascomycota
	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B26	Ascomycota
Campo (C)	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B27	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹⁰¹	92	AB537895.1	B29	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	3 e ⁻¹³²	99	AB537895.1	B30	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	98	GU214618.1	B33	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	99	GU214618.1	B34	Ascomycota
	<i>Mycosphaerella populicola</i>	8 e ⁻⁹³	92	EU167578.1	B39	Ascomycota

Tabela 3: Distribuição das espécies/gêneros de leveduras endofíticas identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade (%)	Acesso/NCBI	Banda	Filo
Jardim Clonal (JD)	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L01	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	80	EU585764.1	L02	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L03	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	90	EU585764.1	L04	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L05	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L06	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L07	Ascomycota
	<i>Saturnispora</i> sp.	4e ⁻⁰⁹	95	KC832478.1	L08	Ascomycota
	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L09	Ascomycota
	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L10	Ascomycota
Saída da Sombreamento (SS)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L11	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L12	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L13	Ascomycota
	<i>Malassezia obtusa</i>	6e ⁻⁹⁶	91	EU192365.1	B18	Basidiomycota
	<i>Bensingtonia ingoldii</i>	2e ⁻¹⁰⁶	93	D38234.1	B19	Basidiomycota
Expedição (EP)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L14	Ascomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B23	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B24	Basidiomycota
Campo (C)	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L15	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L16	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L17	Ascomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B28	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B31	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	8e ⁻¹³⁸	99	AB073272.1	B32	Basidiomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B37	Basidiomycota

Entre os Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Pedosphaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. A UTO B10 agrupou com os dois fungos do gênero *Diplomitoporus*, a B17 agrupou com as espécies *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com *Cortinarius*, todos confirmados como Basidiomycota com altos *bootstraps* (Figura 7).

A amplificação e análise de sequências do gene rRNA 18S e 26S revelou que as UTOs estão relacionadas a leveduras pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota, com agrupamentos de alta sustentação filogenética (Figura 8). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram altos *bootstraps* com valores de 99 e 100. Os melhores agrupamentos formados entre os Basidiomycota foram os das bandas 23 e 28, com as espécies *Rhodosporidium toruloides* e *Rhodotorula glutinis* e as do gênero *Aureobasidium* (Figura 8). As leveduras ascomicéticas, por sua vez, mostraram agrupamentos fortes entre si, com os altos *bootstraps* dos nós mais externos, confirmando a proximidade filogenética entre elas e as do banco de dados NCBI (Figura 8).

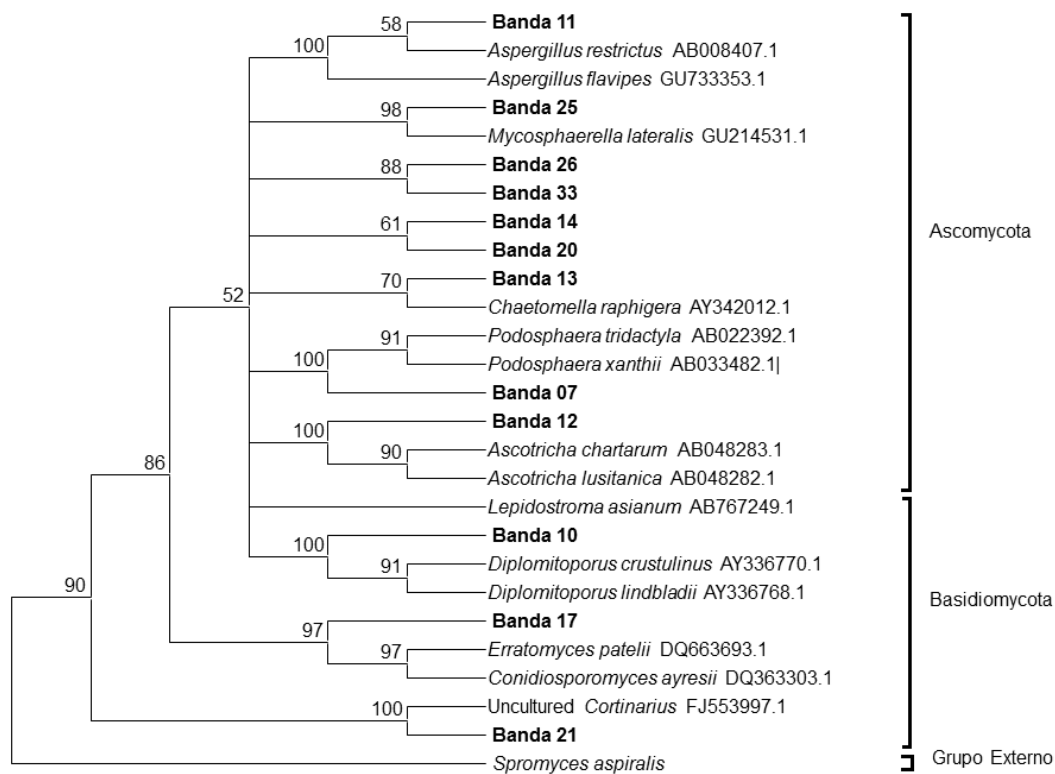


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces aspiralis* foi utilizado como grupo externo.

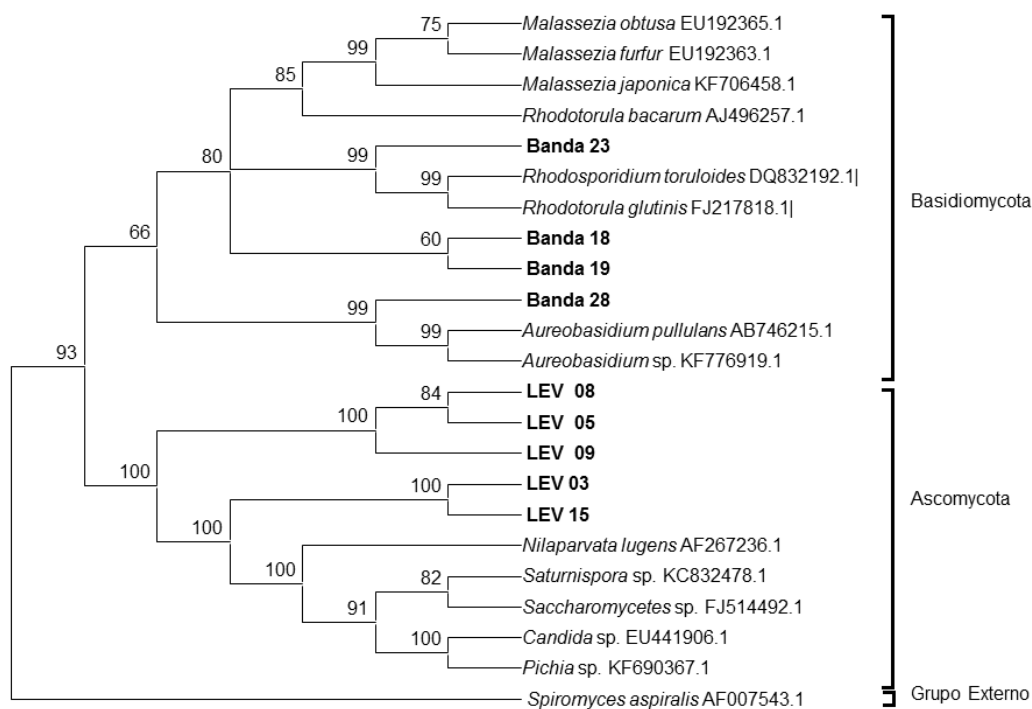


Figura 8: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências dos genes rRNA 18S e 26S de leveduras encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces spiralis* foi utilizado como grupo externo.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos e de leveduras endofíticos acessada por DGGE mostrou a presença de UTOs mais e menos intensas no gel, representando populações com abundância distinta (Figuras 1 e 2). Essa técnica é a escolha para avaliação da diversidade microbiana em vários ambientes (BRESOLIN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; KITTELMANN *et al.*, 2012), o que inclui as folhas de eucalipto (Figura 1 e 2). Essa análise mostrou-se mais robusta quando realizada em conjunto com a abordagem Nested-PCR (Figuras 1 e 2) e permite a análise de comunidades microbianas complexas (OLIVEIRA *et al.*, 2013), proporcionando boa resolução de populações menos abundantes.

Nested-PCR-DGGE mostrou ser eficiente em diferenciar a estrutura das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2). As mudanças foram mais acentuadas na composição da comunidade de leveduras pela formação de clados mais distintos, com UTOs mais similares em um mesmo agrupamento (Figuras 1 e 2). Essas UTOs, em sua maioria, são compartilhadas entre todas as fases de desenvolvimento (8 e 10). Entretanto, mesmo sendo poucas, as UTOs específicas refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos e de leveduras (Figura 3) e demonstram que essas comunidades são modeladas pelo desenvolvimento da planta, fato mais acentuado em leveduras (Figura 3).

Enquanto a comunidade de fungos endofíticos não apresenta diferenças significativas na diversidade e na riqueza (Figura 4), a de leveduras mostrou as melhores médias desses índices nas plantas em expedição (Figura 5). Leveduras apresentam sistema de transporte de glicose altamente regulado, podendo absorver eficazmente a glicose em várias concentrações, pela presença de transportadores de alta e baixa afinidade (BARNETT, 2008). Tal fato pode explicar os maiores índices de diversidade e riqueza encontrados (Figura 5). Os valores de riqueza e de diversidade encontrados nesse estudo estão entre aqueles mais comumente encontrados na literatura, entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Mesmo não existindo diferenças significativas nos índices de diversidade e riqueza de espécies de fungos (Figura 4), observou-se a existência de padrões distintos de colonização desses micro-organismos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 3 e Tabela 2).

A Comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é composta por vários gêneros ao longo das etapas estudadas (Tabela 2), e a de leveduras, por menor quantidade de gêneros e espécies (Tabela 3). Portanto, as folhas dessa planta são

habitat que suportam maior comunidade de fungos em relação à de leveduras. Entretanto, ambas sofrem alterações significativas ao longo do desenvolvimento da planta. Representantes da família Myrtaceae são considerados fonte importante de biodiversidade de fungos, sendo que a maior parte desses fungos está associado às folhas de *Corymbia*, *Eucalyptus* e *Syzygium* spp. (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). As espécies fúngicas em associação com eucalipto relatadas no presente trabalho (Tabela 2) são distintas daquelas descritas na Austrália, Nova Zelândia, Madagáscar e Tailândia (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). Isso indica que essa interação planta-micro-organismo é dependente da espécie de planta em associação, da área de cultivo e da idade da planta associada.

A interação fungo endofítico-planta foi também relatada em outras famílias de plantas como Malvaceae, Cecropiaceae, Lauraceae, Fabaceae, Lecythidaceae e Celastraceae (CANNON & SIMMONS, 2002). Especificamente, no caso de eucalipto, a maioria dos trabalhos publicados até o momento priorizaram os métodos dependentes de cultivo (LUPO *et al.*, 2001; CHEEWANGKOON *et al.*, 2009; KHARWAR *et al.*, 2010), os quais subestimam a diversidade e abundância desses micro-organismos. Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

O grande número de UTOs obtidas pelas sequências analisadas por sequenciamento do rRNA 18S e 26S pode ser considerado como indicativo de alto nível de riqueza e diversidade microbiana, considerando-se que o estudo foi realizado com uma única espécie de planta. As fases em expedição e a campo foram as que apresentaram o maior número de fungos e de leveduras distintos (Tabelas 2 e 3). Açúcares solúveis simples, como a glicose e a frutose, podem funcionar como fonte principal de carbono para fungos simbiotes de plantas (BAGO *et al.*, 2000; CHAMBERGO *et al.*, 2002). Além disso, os micro-organismos associados às plantas podem apresentar via metabólica que facilita a absorção e a quebra da sacarose, sendo essa característica vantagem evolutiva e competitiva. A presença de invertases foi descrita em diversos filos fúngicos. As espécies endofíticas apresentam, em geral, diferentes estratégias nutricionais visando à degradação da sacarose (DOIDY *et al.*, 2012).

A maior predominância de algumas espécies de fungos e de leveduras endofíticas na expedição e no campo (Tabelas 2 e 3) pode ser atribuída ao fato de que, nessas etapas, em plantas tropicais, as folhas apresentam concentrações menores de substâncias químicas de defesa, fato que pode permitir maior crescimento desses micro-organismos (ARNOLD *et al.*, 2003).

Outro fator que afeta o crescimento de fungos e contribui para diferenças na densidade e, conseqüentemente, na diversidade microbiana avaliada (Figuras 4 e 5) é a umidade, uma vez que o conteúdo de água próximo à saturação pode afetar a entrada e o crescimento fúngico na planta (RAYNER & BODDY, 1986). As folhas provenientes do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento foram irrigadas diariamente, de acordo com os padrões de umidade apresentados na região, diferente do que ocorreram com as plantas em expedição e a campo, dependentes da precipitação pluviométrica. Esse fato também pode explicar as diferenças na prevalência e frequência de fungos e leveduras nas fases de desenvolvimento do eucalipto.

Ascomycota foi o filo predominante entre as espécies de fungos e leveduras em eucalipto (Tabelas 2 e 3). Entre os fungos endofíticos, *Teratosphaeria acidotherma* e *Cladosporium sp.* e as leveduras do gênero *Candida* e *Nilaparvata* (Figura 9) foram encontrados em mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto (Tabela 2). O predomínio de leveduras do filo Ascomycota pode ser reflexo da adaptação desses micro-organismos às folhas como micro-habitat que favorece o crescimento de espécies fermentativas (POZO et al 2011). Fungos do gênero *Teratosphaeria* foram encontrados em folhas com sintomas de MLD (doença das manchas da folha) em eucalipto na Austrália (ANDJIC et al., 2010). Entretanto, neste estudo, *Teratosphaeria acidotherma* e *Teratosphaeria toledana* (Tabela 2) foram extraídas de folhas saudáveis de eucalipto. Essa observação evidencia que certos micro-organismos podem ser endofíticos em uma planta e patógenos em outras (SAIKKONEN et al. 2004). A diferença entre o estágio endofítico e patogênico pode ser devido a fatores abióticos ou à idade da planta (SAIKKONEN et al., 2004; PORRAS-ALFARO et al., 2011).

Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* estavam presentes em folhas de plantas provenientes de mais de uma etapa de produção de mudas (Tabelas 2 e 3). Esse comportamento mais generalista indica capacidade de adaptação a condições nutricionais e ambientais distintas. O fungo *Cladosporium sp.* e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem na folhas nas etapas de expedição e campo; já o gênero *Candida* está presente em folhas de plantas do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento. Esse comportamento indica que elas possuem informações genéticas para colonizar e persistir em folhas de eucalipto em mais de uma etapa de desenvolvimento dessa planta, sugerindo que sejam micro-organismos endofíticos competentes (HARDOIM et al., 2008), com

papéis relevantes na fisiologia da planta.

Os fungos e as leveduras podem beneficiar as plantas, aumentando a tolerância das mesmas a fatores bióticos e abióticos, melhorando o crescimento e a sobrevivência em condições adversas, competindo com patógenos (HUBBARD *et al.*, 2014) e produzindo ampla variedade de reguladores de crescimento, a exemplo das giberelinas (GAs), do ácido abscísico (ABA) e das auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012). *Candida tropicalis* já foi relatada como tendo capacidade de promoção de crescimento em arroz por meio de alta atividade da ACC deaminase, da produção de ácido indol acético (AIA) e de poliaminas (AMPRAYN *et al.*, 2012). Plantas em estresse produzem altas concentrações de etileno, inibindo o crescimento (GLICK *et al.*, 2007). A ACC deaminase é a enzima responsável pela quebra do precursor do etileno, o aminociclopropano-1-carboxilato – ACC, em amônia e alfa-cetoglutarato. Micro-organismos produtores de ACC-deaminase diminuem os níveis de etileno pelo consumo dos subprodutos da quebra do precursor, ACC, promovendo, ainda, o crescimento vegetal pela síntese de AIA (GLICK, 2014).

Muitas das espécies de fungos filamentosos e leveduras são específicas de algumas fases de desenvolvimento do eucalipto. Os fungos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos do jardim clonal, *Chaetomella acutiseta* e *Ascotricha chartarum* do sombreamento, *Erratomyces patelii* e *Saxomyces* sp. das planta recém-saídas do sombreamento, *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da expedição e *M. populicola* do campo (Tabela 2). As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* estavam presentes apenas nas plantas em sombreamento e nas recém-saídas do sombreamento, respectivamente.

A análise filogenética das sequências de 18 e 26S rDNA confirmou que a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, presente nas folhas de eucalipto em diferentes etapas de desenvolvimento, está incluída nos filos Basidiomycota e Ascomycota, pela formação de clados distintos, com altos *bootstraps* (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), os quais sustentam a análise filogenética (Figura 7).

Entre os fungos pertencentes à Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Podosphaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. Já entre

os Basidiomycota, os melhores agrupamentos foram o da UTO B10 com dois fungos pertencentes ao gênero *Diplomitoporus*, a B17 com *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com o gênero *Cortinarius*, todos com altos *bootstraps* (Figura 7).

Fungos do gênero *Mycosphaerella* são frequentemente relatados como habitantes da parte aérea das plantas, com algumas de suas espécies hospedeiro-específicas (MAXWELL *et al.*, 2005). *Mycosphaerella lateralis* já foi demonstrada em interação patogênica com eucalipto na Austrália, formando lesões necróticas nas folhas (MAXWELL *et al.*, 2000). No presente estudo, entretanto, esse fungo foi identificado em folhas assintomáticas. Tal fato pode indicar que a interação seja dependente da espécie de planta, da área de cultivo, da idade da planta ou de mecanismos de reconhecimento planta-hospedeiro que podem determinar o comportamento fúngico como patogênico ou endofítico (SAIKKONEN *et al.*, 2004; PORRAS-ALFARO *et al.*, 2011).

A levedura cosmoploita *Aureobasidium pullulans* já foi identificada em várias plantas, sendo considerada como potencial agente de controle biológico de patógenos (ANDREWS *et al.*, 1994). Neste estudo, essa levedura é relatada como endofítica de eucalipto (Figura 8) em plantas de 18 meses de idade, mas não nas demais fases de desenvolvimento (Tabela 3).

Ampla variedade de fungos e leveduras endofíticos foi encontrada em eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento da planta durante a produção de mudas em viveiro. A diversidade microbiana levantada neste trabalho sugere significativa importância dos micro-organismos endofíticos nos sistemas de produção de mudas em escala comercial, abrindo novas avenidas para a elucidação do papel de micro-organismos associativos e simbióticos na nutrição vegetal e na adaptação da planta ao meio.

CONCLUSÕES

A excisão, eluição e sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostrou ser boa técnica para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto.

Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto. Essa comunidade é representada por 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos e duas espécies e sete gêneros de leveduras, em plantas de diferentes fases de desenvolvimento.

A relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a levedura e eucalipto, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto. Entretanto, os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto. Já o fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodospiridium fluviale* são persistentes nas etapas de expedição e campo, e o gênero *Candida*, no jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.
- AMPRAYN, K. O., ROSE, M. T., KECSKÉS, M., PEREG, L., NGUYEN, H. T & KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis*) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.
- ANDJIC, V., WHYTE, G., HARDY, G & BURGESS, T. New *Teratosphaeria* species occurring on eucalypts in Australia. **Fungal Diversity**, v. 43, p. 27-38, 2010.
- ANDREWS, J. H., HARRIS, R. F., SPEAR, R. N., LAU, G. W & NORDHEIM, E. V. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 40, p. 6-17, 1994.
- ARNOLD, A. E. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. **Current Trends in Mycological Research** (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68, 2005.
- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, p. 541-549, 2007.
- ARNOLD, A. E., MAYNARD, Z., GILBERT, G. S., COLEY, P. D & KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.
- BAGO, B., PFEFFER, P. E & SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.124, p. 949-958, 2000.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. **Yeast**, v. 25, p. 689-731, 2008.

- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 391-403, 2010.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**. v. 13, p. 79-148, 2000.
- BRUNDRETT, M. C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editors. **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. 281–293, 2006.
- CANNON, P. F & SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**. v. 94, p. 210-220, 2002.
- CHAMBERGO, F. S., BONACCORSI, E. D., FERREIRA, A. J., RAMOS, A. S., FERREIRA, J. R., ABRAHAO-NETO, J., FARAH, J. P & DORRY, EL- H. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 13983-13988, 2002.
- CHEEWANGKOON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C., & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**, v. 23, p. 55-85, 2009.
- COCOLIN, L., BISSON, L & MILLS, D. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 81–87, 2000.
- DOIDY, J., GRACE, E., KÜHN, C., SIMON-PLAS, F., CASIERI, L & WIPF, D. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. **Trends in Plant Science**. v. 17, p. 413-422, 2012.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, p. 30-39, 2014.
- GLICK, B. R., CHENG, Z., CZARNY, J & DUAN, J. **Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria**. In New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research (pp. 329-339). Springer Netherlands, 2007.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T & RYAN, P.D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.

- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HUBBARD, M., GERMIDA, J. J & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology*, v. 116, n.1, p. 109-122, 2014.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHARWAR, R. N., GOND, S. K., KUMAR, A & MISHRA, A. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A proposed taxonomy of anaerobic fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LISEC, J., SCHAUER, N., KOPKA, J., WILLMITZER, L & FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387–396, 2006.
- LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E. H & HYDE, K. D: Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. **Canadian Journal Microbiol**, v. 48, p. 1109-1112, 2002.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.
- MASOUD, W., BJØRG CESAR, L., JESPERSEN, L & JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East África determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**. v. 21, p. 549-556, 2004.
- MAXWELL, A., HARDY, G. E. STJ., WINGFIELD, M. J. & DELL, B. First record of *Mycosphaerella lateralis* on *Eucalyptus* in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 29, p. 279, 2000.
- MAXWELL, A., JACKSON, S. L., DELL, B., & HARDY, G. E. S. J. PCR-identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. **Mycological Research**, v. 109, p. 992-1004, 2005.

- MAY L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 829-841, 2001.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594, 2013.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, 78–81, 2001.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- POZO, M. I., HERRERA, C. M & BAZAGA, P. Species richness of yeast communities in floral nectar of southern Spanish plants. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 82-91, 2011.
- PRAKITCHAIWATTANA, C. J., FLEET, G. H & HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, v.4, p. 865–877, 2004.
- RAYNER, A. D. M & BODDY, L. Population structure and the infection biology of wood-decay fungi in living trees. **Advance Plant Pathology**, v. 5, p. 119–160, 1986.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- SAIKKONEN, K., WALI, P., HELANDER, M & TAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 275-280, 2004.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.

- SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S., BILLS, G. F & ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal species diversity in juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus* from plantations affected by *Mycosphaerella* leaf disease. **Annals of Applied Biology**, v. 158, p. 177-187, 2011.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- WHIPPS, J. M., HAND, P., PINK, D & BENDING, G. D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 1744-1755, 2008.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 4

DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As associações de plantas com bactérias endofíticas contribuem significativamente para a fitossanidade e produtividade das culturas. Bactérias endofíticas adaptaram-se à vida no interior dos tecidos vegetais, podendo contribuir positivamente para processos-chave para nutrição das culturas, a exemplo da fixação biológica de nitrogênio. O *Eucalyptus* é um dos gêneros de plantas mais cultivados e valorizados economicamente no mundo. A caracterização da comunidade microbiana associada às espécies deste gênero pode proporcionar novas ferramentas biotecnológicas para o cultivo sustentável e mais econômico dessas plantas. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, incluindo os grupos com potencial para fixação de N associados às folhas dessa planta. A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica foi acessada por PCR-DGGE, isolamento e sequenciamento do gene rRNA 16S. Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma-) e Actinobacteria foram identificados na comunidade investigada. Nessa comunidade, esse é o primeiro relato das espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* como endofíticas. A diversidade variou entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, sendo Proteobacteria o filo mais representativo em folhas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento, e Firmicutes no campo. A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento em estudo, com muitas espécies encontradas apresentando potencial para fixação de nitrogênio.

Palavras-chave: diversidade, bactérias endofíticas, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

Eucalyptus é um dos gêneros de planta mais cultivados em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, pelo rápido crescimento, adaptabilidade e valor comercial da madeira produzida (BROOKER, 2000). O rápido crescimento do eucalipto demanda alta disponibilidade de nutrientes, especialmente nitrogênio (SMETHURST *et al.*, 2004). Esse elemento pode ser obtido pela fixação biológica, realizada por bactérias de vida livre e por endofíticas (SUMMAN *et al.*, 2005; REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo da comunidade microbiana do eucalipto pode proporcionar melhor panorama das interações planta-micro-organismo, permitindo ampliar o entendimento da contribuição da microbiota associada para a nutrição florestal.

A parte aérea de várias plantas abriga ampla diversidade de micro-organismos, especialmente bactérias e fungos, com grande importância ecológica (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Essa diversidade tem sido alvo de vários estudos que revelam a presença de bactérias em diferentes órgãos do hospedeiro, influenciando sua sanidade e desenvolvimento (BRADER *et al.*, 2015). Micro-organismos endofíticos adaptam-se a ambientes específicos do corpo da planta e, ao colonizá-los (BULGARELLI *et al.*, 2013), podem estimular o crescimento vegetal por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de auxinas e seus análogos e pela síntese de giberelinas (WAQAS *et al.*, 2012). A interação eucalipto-bactérias endofíticas é pobremente documentada, sendo a maioria das pesquisas focada nos micro-organismos associados às raízes (BONITO *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2014).

A diversidade microbiana tem sido acessada em diversas plantas agronomicamente importantes pela utilização da análise molecular das comunidades microbianas por meio de métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) e independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Apesar da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de bactérias em *Eucalyptus* spp. (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), da importância das endofíticas como parte da comunidade microbiana dessas plantas (BRADER *et al.*, 2015) e do Brasil ser o maior produtor mundial dessa essência florestal, pouco se conhece sobre a microbiota endofítica associada ao eucalipto. Variações na estrutura dessa comunidade em função da idade da planta e das fases de desenvolvimento em viveiros comerciais são totalmente desconhecidas. Da mesma forma, a diversidade de bactérias com potencial de fixação de nitrogênio

sob essas mesmas condições necessita ainda ser caracterizada.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas, incluindo aquelas com potencial de fixação de nitrogênio, em associação com folhas de plantas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento em viveiros comerciais e em campo, combinando métodos dependentes e independentes de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Esse estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP - etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato

Fertilizantes	Doses* (kg/m³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é 19° 24' 54”, a longitude 42° 25' 56” e a altitude 318 metros. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulínítico ou caulínítico-oxídico ou gibbsítico-oxídico, hipoférrico ou mesoférrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente, a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56,39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20 °C. Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato (0,05 mmol.L⁻¹), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de

sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspensionado e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspensionado *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Análise da Diversidade de bactérias totais e diazotróficas

A estratégia Nested-PCR foi utilizada para acessar a diversidade de bactérias totais em folhas de eucalipto por DGGE. O DNA total, na primeira PCR, foi utilizado como molde para amplificação do gene rRNA 16S, e, juntamente com primers P027/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005), produziram *amplicons* específicos que serviram de molde para a segunda PCR, com os primers 984GC/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005).

As PCRs foram realizadas em volume final de 25 µL, sendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µM de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 µM dos primers, 20 ng de molde e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 47 °C por 1 min, extensão por 2 min a 72 °C e extensão final durante 10 min a 72 °C.

O acesso à diversidade de bactérias potencialmente fixadoras de N em folhas de eucalipto foi obtido por PCR em duas reações: uma utilizando os primers polF/polR (POLY *et al.*, 2001) e outra substituindo polF por polFGC. As reações foram realizadas em volume de 50 µL contendo tampão 1X, 1.5mM MgCl₂, 0.12mM of dNTPs, 0.3 µM de cada *primer*, 1U Taq polymerase e 10 ng molde, submetidos a desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 0,5 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min e extensão final de 72 °C por 10 min. (MAPELLI *et al.*, 2013).

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após as PCRs foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioideus thermo- lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (37.5:1, acrilamida – N,N=–metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris–HCl, pH 8.0, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09% (v/v) TEMED (N,N,N=,N=–tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 40%–60% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em

tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e as imagens dos géis obtidas por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de bactérias totais e fixadoras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessas comunidades foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software sigmaplot (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Isolamento de bactérias endofíticas

As folhas desinfestadas de cada uma das fases de desenvolvimento do eucalipto foram utilizadas para estabelecer a densidade de bactérias cultiváveis por folha ([UFC] folha⁻¹). As folhas foram individualmente trituradas em homogeneizador em tubos contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7). A suspensão foi, então, filtrada em gaze esterilizada, e o filtrado diluído seriadamente em tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7.0). Alíquotas de 100 µL foram espalhadas em meio sólido R2A e incubadas a 28°C por 72 horas.

Extração de DNA de culturas puras

O DNA total das culturas puras crescidas em meio R2A líquido foi extraído utilizando o Kit de purificação de DNA (Promega™, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. A integridade e a quantidade de DNA extraído foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corados com Gel Red® 1000X, e as imagens obtidas utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

BOX-PCR

BOX-PCR foi realizado utilizando o primer BOX-A1R (VERSALOVIC *et al.*, 1994) para analisar a diversidade genômica em nível de isolado. A PCR foi preparada em volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão, 3,75 µL de MgCl₂ 25mmol, 0,5 µL de dNTPs 10 mmol, 1,25 µL de DMSO, 1,25 µL de BSA (soro albumina bovina), 0,5 µL oligonucleotídeos iniciadores BOX-A1R (10mM) e 0,25 µL de Taq DNA polymerase (BONIEK *et al.*, 2010), 1 µL de DNA e 15,25 µL de água mili-Q autoclavada. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94° C por 7 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min, extensão por 8 min a 65°C e extensão final durante 16 min a 65°C (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Os *amplicons* obtidos pela PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) a 100V durante 6 horas e corados com Gel Red® 1000X. As imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil). Para determinar a similaridade entre os isolados o gel de agarose contendo os produtos BOX-PCR foi analisado por UPGMA (agrupamento médio entre grupos) software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). O dendrograma resultante foi avaliado com base no coeficiente de Jaccard, o qual analisa a similaridade e a distância com base nas bandas obtidas. Isolados com valores de similaridade acima de 90% foram considerados iguais.

Amplificação e sequenciamento do rRNA 16S

Os *primers* universais P27F/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005) foram utilizados para amplificar o gene rRNA 16S dos isolados bacterianos diferenciados por BOX-PCR. A reação foi realizada contendo aproximadamente 20 ng de DNA, tampão (Promega), 2,25 mmol of MgCl₂, 210 mmol de cada *primer*, 250 µM of deoxinucleotídeos (dNTPs), e 0,02 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega). A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf-Germany) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 min, e extensão a 72°C por 1,5 min, com extensão final de 7 min a 72°C. Os *amplicons* foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) e o gel corado com Gel Red® 1000X. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank*

(NCBI). Para cada sequência bacteriana foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97%, identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências do gene rRNA 16S utilizando ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética baseado no alinhamento dessas sequências foi feito utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram obtidos por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica em folhas de plantas de eucalipto provenientes das fases do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e a campo foram examinadas por DGGE, cultivo em placa e sequenciamento do rRNA 16S. A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e potenciais fixadoras de nitrogênio. Essa abordagem permitiu a identificação de comunidades mais e menos abundantes pela presença de bandas mais e menos intensas nos géis (Figuras 1 e 2). A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes fases de desenvolvimento dessa planta (Figura 2).

O perfil de bandas e a análise de agrupamento mostraram que a comunidade bacteriana endofítica em folhas de eucalipto foi homogênea, com alta similaridade, e as populações mais distintas estão presentes no jardim clonal e no campo. Essas duas fases mostraram a formação de dois grupos distintos, com menor similaridade que os demais (Figura 1). Portanto, a comunidade bacteriana endofítica de eucalipto variou em relação às fases de desenvolvimento dessa

planta.

Em comparação com a comunidade de bactérias endofíticas totais, a de diazotróficos revelou-se mais heterogênea entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, pelo menor número de agrupamentos distintos. A comunidade de endofíticas diazotróficas no campo é distinta das outras etapas de desenvolvimento, com valores de similaridade inferiores a 58,3% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelas diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). A DGGE mostrou sensibilidade em detectar diferenças na comunidade endofítica diazotrófica em folhas de eucalipto, sendo o gene *nifH* marcador molecular eficiente para verificar diferenças de forma rápida na diversidade e distribuição de diazotróficas endofíticas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas.

A distribuição de bandas revelou poucas alterações na estrutura da comunidade de bactérias endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto, sendo que a maior parte delas foi ocasionada pelas bactérias diazotróficas (Figura 3). A maioria das UTOs é compartilhada entre as fases de desenvolvimento das plantas para ambas as comunidades. Entretanto, a presença de UTOs específicas é evidente, o que reflete as diferenças na estrutura da comunidade nas folhas provenientes do campo (Figura 3). Essas mudanças demonstraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a comunidade de bactérias endofíticas nas condições avaliadas, fato mais evidenciado entre as bactérias diazotróficas.

Os índices de diversidade de Shannon e de riqueza foram calculados para as comunidades de bactérias endofíticas em interação com as folhas de eucalipto. A diversidade e a riqueza de bactérias endofíticas totais foram maiores nas folhas provenientes do campo (Figura 4). De forma distinta, para as bactérias diazotróficas, as maiores médias desses índices foram obtidas para as amostras de folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo (Figura 5). Esses resultados indicam que as fases de desenvolvimento de eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias diazotróficas endofíticas do que a de bactérias totais. As folhas provenientes do jardim clonal e da expedição foram as que mostraram as menores médias de diversidade e de riqueza de bactérias endofíticas diazotróficas (Figura 5).

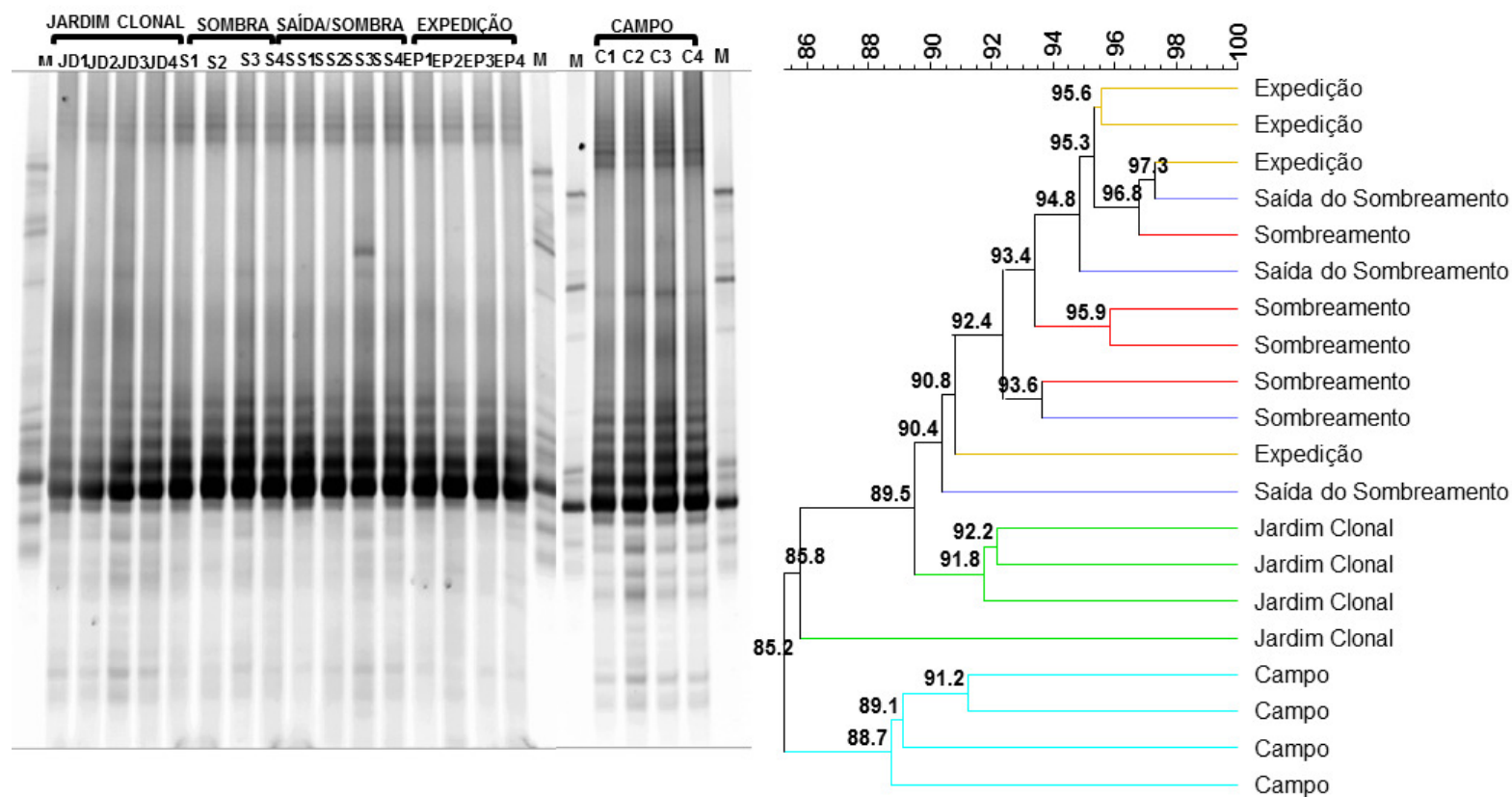


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes rRNA 16S. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene rRNA 16S das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

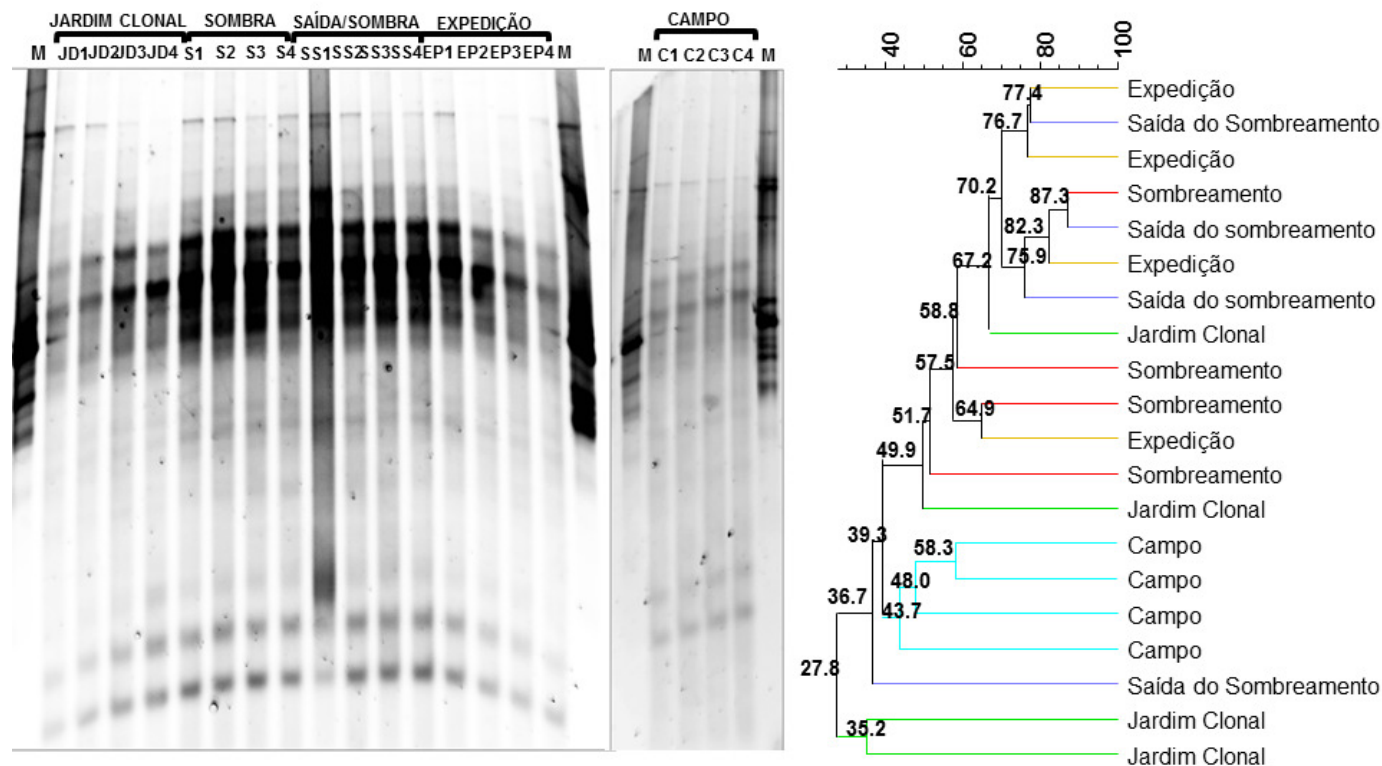


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes *nifH*. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém- saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene *nifH* das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

Os isolados com perfil genômico distinto, segundo a técnica de BOX-PCR, e com índices de similaridade inferiores a 90% (dados não publicados) foram identificados por sequenciamento do rRNA 16S e comparados com sequências obtidas pelo algoritmo BLAST (NCBI). O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria (Figura 6). Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, seja no viveiro ou em campo. As sequências de rRNA 16S obtidas de 32 isolados apresentaram alta identidade com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Entre essas sequências, somente duas, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores de identidade inferiores a 97%. Esses isolados foram identificados apenas em nível de gênero, e os demais, em nível de espécie (Figura 6).

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento das plantas, já que apenas 27% das espécies identificadas foram isoladas em mais de uma etapa, como *Bacillus flexus*, presente desde as folhas do jardim clonal até as do campo (Figura 6). A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S (44%) foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento (35%). A colonização endofítica pelo gênero *Bacillus* em folhas de eucalipto inicia-se no jardim clonal e se estende em etapas subsequentes em que são encontradas as espécies *B. flexus*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Figura 6).

A análise filogenética das sequências de rDNA 16S com identidades acima de 97% confirmou que a comunidade de bactérias endofíticas em folhas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto pertencem aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, pela formação de clados distintos com altos *bootstraps* (Figuras 7). Os *bootstraps* apresentados pela maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007) (Figura 7).

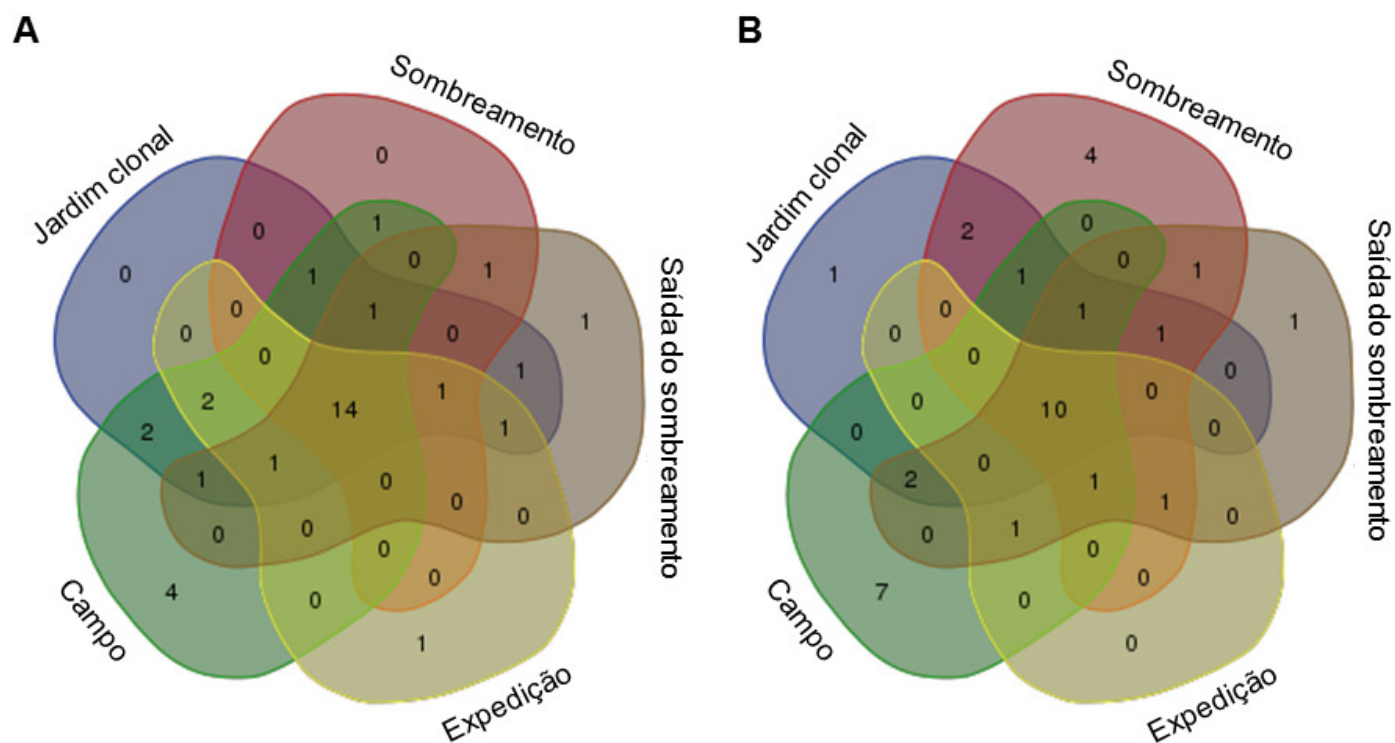


Figura 3: Distribuição de UTOs de bactérias endofíticas totais (A) e potencialmente diazotróficas (B) pelo diagrama de venn em diferentes etapas de desenvolvimento das folhas de eucalipto: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo.

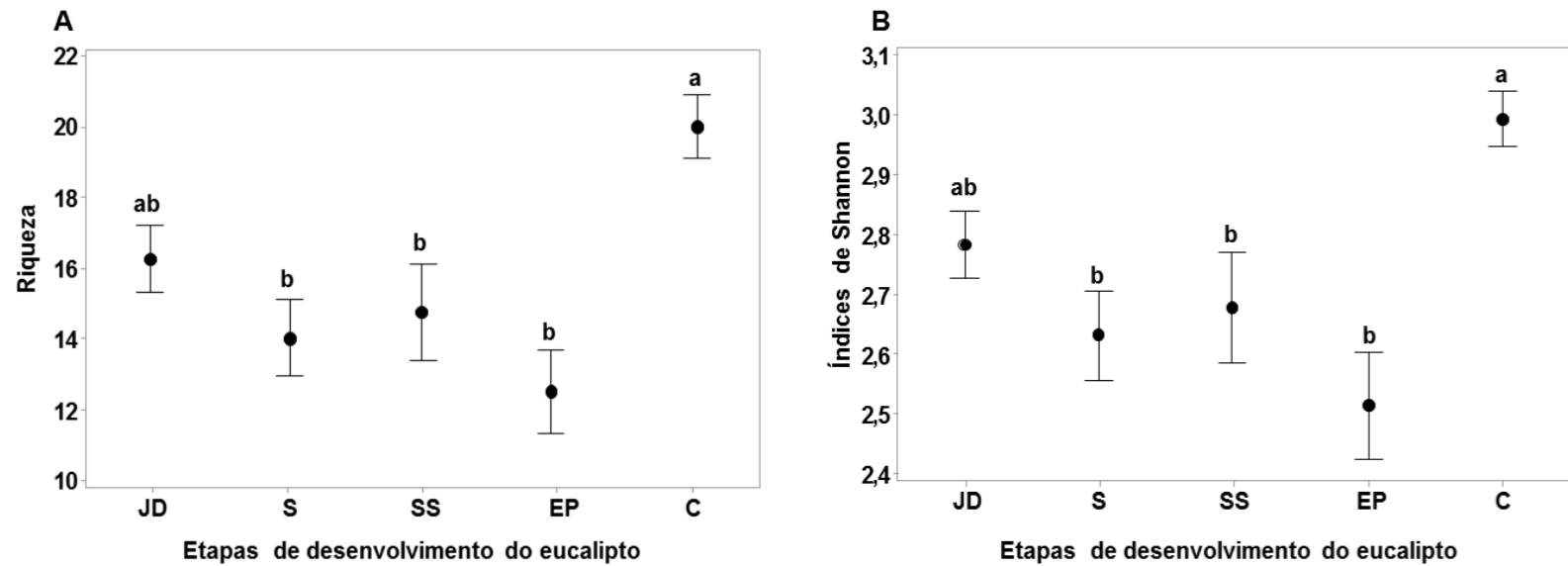


Figura 4: Perfil de Riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas totais provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

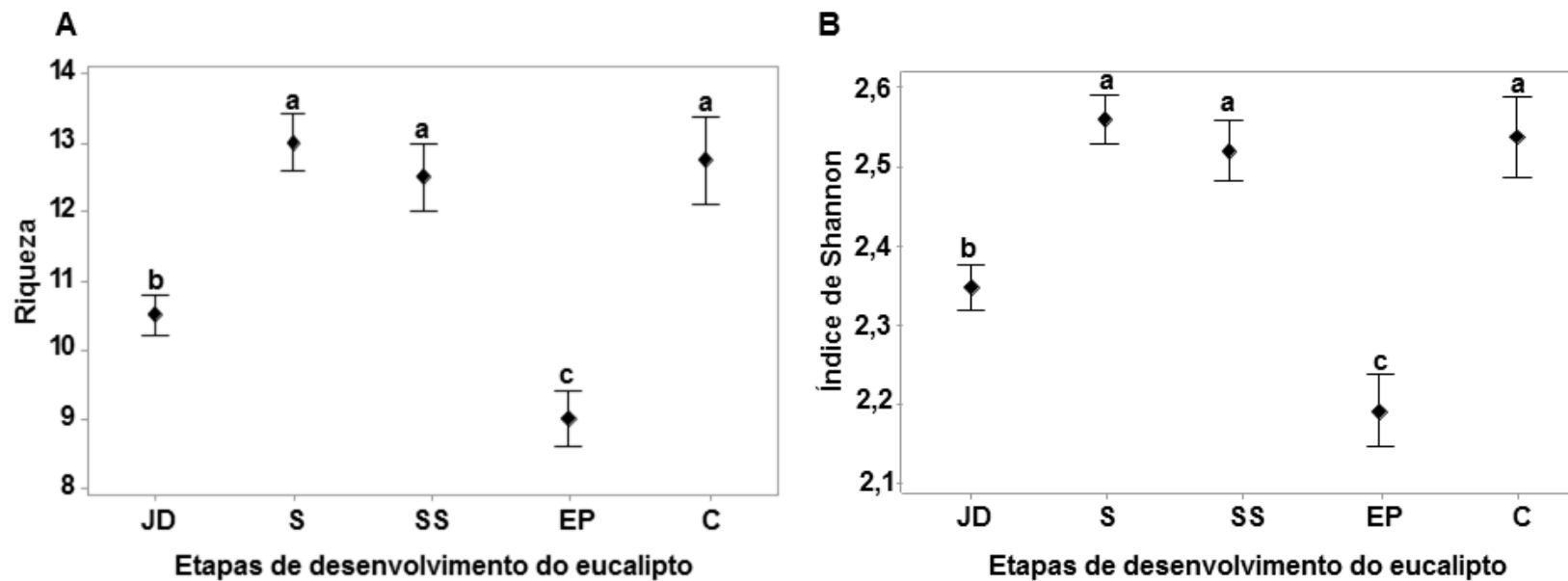


Figura 5: Perfil de riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise filogenética das sequências revelou que a maioria delas pertence ao filo Gammaproteobacteria, em que se destacam os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Firmicutes e Alphaproteobacteria são os filos que apresentaram o maior número de gêneros distintos. Betaproteobacteria foi o filo menos representativo entre os encontrados, sendo o isolado BAC 06 identificado como *Massilia timonae* e próximo filogeneticamente a *Massilia timonae* (Figura 7). Entre os Firmicutes, *Bacillus* foi gênero predominante (Figura 6) com *bootstrap* 99 (Figura 7). *Paenibacillus terrigena* (BAC 33) e *Paenibacillus darwinianus* (BAC 29), colonizadoras exclusivas da expedição e do campo, respectivamente, ainda não foram documentadas em interação endofítica com plantas. *Terrabacter lapilli* (BAC 32) é a única actinobacteria isolada de folhas de eucalipto que ainda não foi registrada como endofítica. Alphaproteobacteria contribui com a presença de muitas bactérias diazotróficas, o que inclui *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium grahamii* e *Rhizobium pusense* (Figuras 6 e 7). O isolado BAC 16, identificado como *Rhizobium pusense* (Figura 6), agrupou com alta sustentação filogenética com *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium pusense* (Figura 7). Nesse filo, *Rhizobium grahami* (BAC 25) e *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) foram pela primeira vez identificadas como endofíticas (Figura 6). Essas duas espécies foram isoladas de mudas de eucalipto recém-saídas do sombreamento, não persistindo as demais fases de desenvolvimento da planta. *Novosphingobium barchamii* apresentou proximidade filogenética com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7). Para a maioria dos isolados essa análise (Figura 7) confirmou a identificação realizada pela comparação com as sequências encontradas no BLAST (Figura 6). Outra espécie acrescida ao universo das endofíticas é a Gammaproteobacteria *Stenotrophomonas panacihumi* (Figuras 6 e 7), isolada de mudas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento (Figura 6). Portanto, as folhas de eucalipto sustentam uma comunidade de bactérias endofíticas diversa e dependente das fases de desenvolvimento dessa planta.

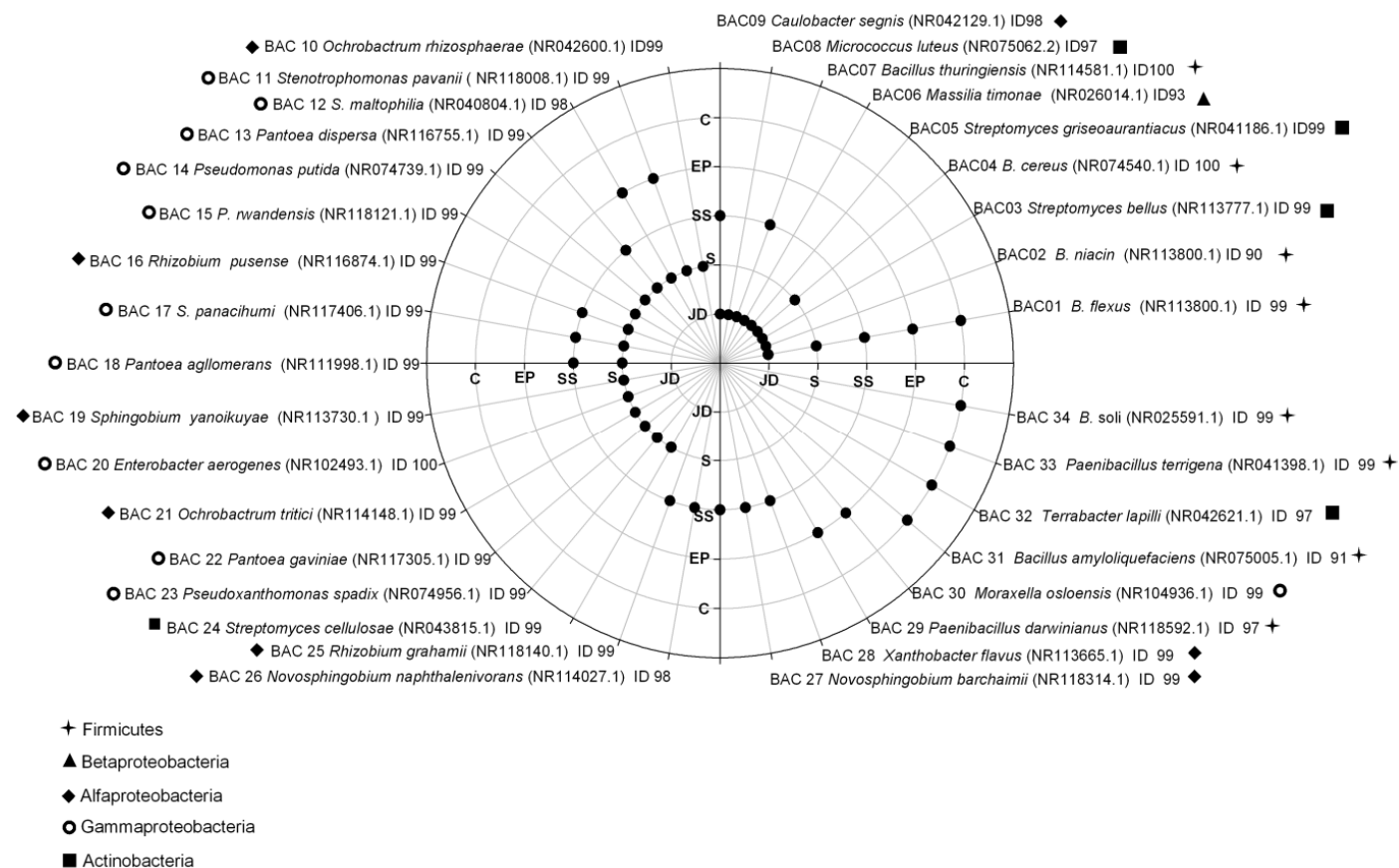


Figura 6: Distribuição das espécies de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; 1, 2, 3 e 4: Repetições. As espécies estão acompanhadas do número de acesso do *GenBank* (NCBI) e dos valores de identidades (ID) em porcentagem.

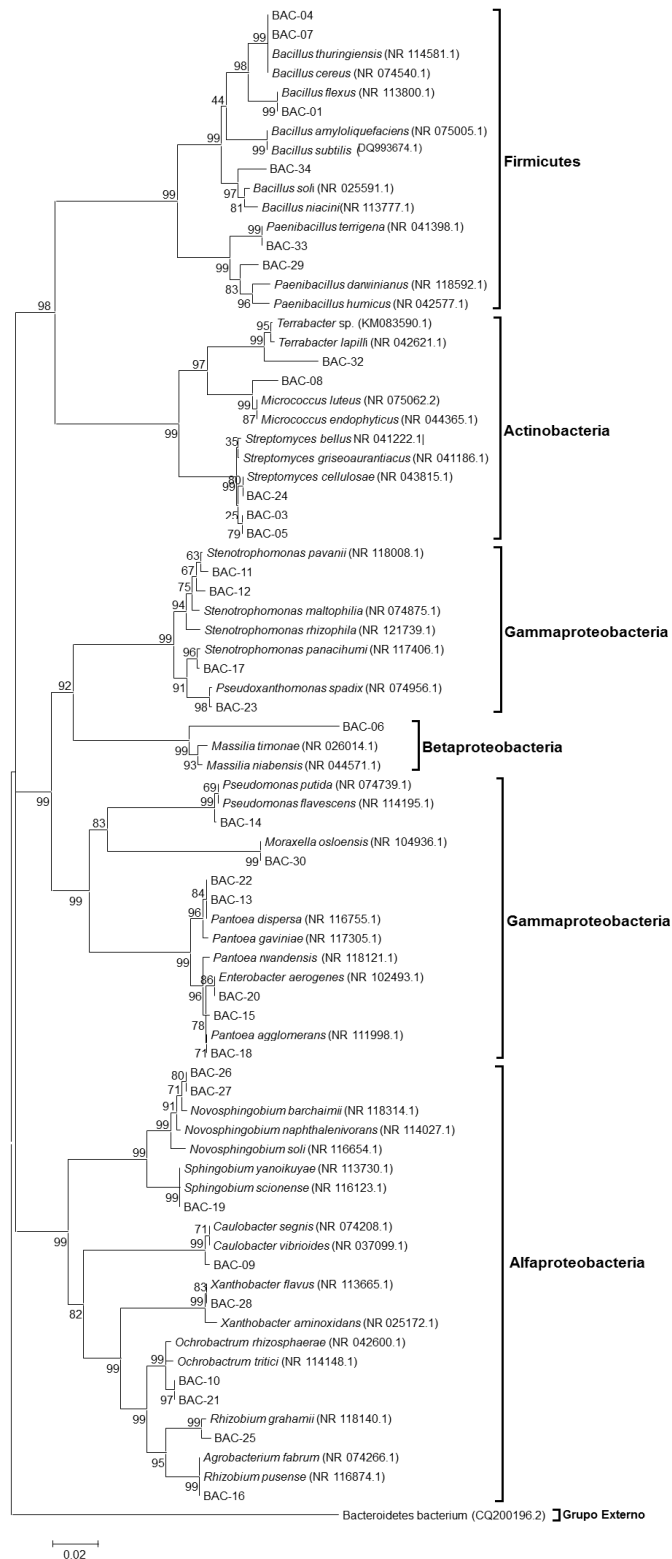


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 16S de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A amplificação do gene rDNA 16S e a separação dos *amplicons* por DGGE mostrou eficiência no acesso à diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto. Através do sequenciamento dos isolados e identificação por busca no NCBI, mais informações sobre essa comunidade foram obtidas. Com essas informações, as sequências e a filogenia foram conhecidas. DGGE é boa escolha para avaliação da diversidade das interações planta-micro-organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2013), sendo o método semiquantativo rápido para descrição de comunidades microbianas complexas (PETERSEN & DAHLLOF, 2005). O estudo dessas interações é importante, uma vez que o interior das plantas é habitat de grande diversidade de micro-organismos endofíticos que desempenham papéis relevantes na sanidade e no desenvolvimento das plantas (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Ao adaptarem-se a esse ambiente e colonizá-lo, os micro-organismos endofíticos expressam potencial metabólico diferenciado dos micro-organismos de vida livre (BRADER *et al.*, 2014).

A análise de agrupamento das bandas de DGGE de fragmentos rRNA 16S exibiu separação eletroforética clara e a formação de grupos distintos. Esses agrupamentos foram menos evidentes na comunidade de bactérias diazotróficas comparada com a de bactérias totais com valores de similaridade inferiores a 30% entre as fases de desenvolvimento do eucalipto. Essas pequenas porcentagens de similaridade (Figura 1) indicam alta variação entre os grupos bacterianos (ALTIMIRA *et al.*, 2012) nas folhas de eucalipto. Entretanto, a comunidade de endofíticas diazotróficas no campo parece recrutar uma microbiota própria, a qual é distinta das outras etapas de desenvolvimento da planta, com similaridade entre 43 e 58% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelos potencialmente diazotróficos presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). O gene *nifH* utilizado na DGGE mostrou ser marcador molecular eficiente em verificar diferenças na diversidade e distribuição da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas em folhas de eucalipto. Essa abordagem consistente proporciona a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes nessa comunidade (Figura 2). Esses resultados mostraram que essas fases modulam a comunidade de bactérias endofíticas, sendo que muitas delas têm potencial para estimular o crescimento vegetal por fixação de nitrogênio. Essa capacidade possibilitaria condições para a melhoria da nutrição das plantas pela presença da enzima nitrogenase (OLDROYD & DIXON, 2014). Este estudo pode,

então, fornecer contribuições para a busca de soluções biotecnológicas para resolver o problema do nitrogênio em plantas.

A diversidade de bactérias endofíticas em árvores é estudada com menor frequência quando comparada a outras plantas (EL-DEEB *et al.*, 2013; KUKLA *et al.*, 2014; MIGUEL *et al.*, 2013). Em *Eucalyptus*, pouco se conhece sobre as interação planta-bactéria, e os estudos existentes enfatizam o solo (DA SILVA *et al.*, 2014), a rizosfera e as raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010), os caules (PROCÓPIO *et al.*, 2009) e as sementes (FERREIRA *et al.*, 2008).

A modulação da composição das comunidades de bactérias endofíticas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto é evidenciada pelos maiores índices de riqueza e diversidade nas folhas provenientes do campo (Figura 4). Embora o perfil de diversidade da comunidade endofítica diazotrófica seja distinto, pois as maiores médias dos índices foram obtidas em folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo, as etapas de desenvolvimento da planta também modulam essa comunidade (Figura 5). As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas do que as de bactérias totais.

Índices de diversidade são essenciais nesse tipo de abordagem entre comunidades (MOHAMMAD & RAWASHDEH, 2015), e as mais diversas apresentam maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2011). Os índices encontrados neste estudo estão entre aqueles comumente citados na literatura (Figura 4), que mostram valores variando entre 1,5 e 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). As diferenças na diversidade de bactérias endofíticas podem ser atribuídas às concentrações distintas de açúcares encontradas nesse ambiente, aliada às variações catabólicas encontradas na maioria das bactérias heterotróficas filogeneticamente próximas (RODIONOV *et al.*, 2010). A fixação de nitrogênio requer a utilização de fontes de carbono e energia, e os gêneros que apresentam essa capacidade podem ser distintos em tempo de geração, taxa de crescimento e quantidade consumida de carboidratos (NAHER *et al.*, 2008). Em cianobactérias a clivagem da sacarose é essencial no metabolismo do carbono e fixação do nitrogênio (FIGUEROA *et al.*, 2013). Assim, em etapas com concentrações superiores de sacarose pode haver predomínio de bactérias diazotróficas que, à semelhança de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, utilizariam sacarose como fonte de energia (VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto é composta pelos filos Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta-, e Gamma) e Actinobacteria. As

bactérias endofíticas isoladas e identificadas por sequenciamento do rRNA 16S, em sua maioria, mostraram identidades superiores a 97% com as sequências depositadas NCBI, e somente dois isolados, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores inferiores a esse (Figura 6). Em geral, identidades acima de 97% são adotadas em estudos de filogenia como padrão para conceituação de organismos da mesma espécie (AL-BATAYNEH *et al.*, 2011), embora autores reconheçam que valores entre 98,5 e 99% são mais desejáveis e consistentes (STACKEBRANDT & EBERS, 2006). A confiabilidade dos alinhamentos foi confirmada utilizando-se o *e-value* (dados não mostrados), o qual indica a probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de bases, outro alinhamento com escore igual ou superior (KERFELD & SCOTT, 2011). Os isolados com identidades inferiores a 97% foram classificados em nível de gênero, após alinhamentos das sequências obtidas por sequenciamento do rDNA 16S com sequências correspondentes do NCBI (Figura 6).

O principal filo encontrado em plantas sombreadas e recém-saídas do sombreamento foi Proteobacteria, classes Alfa-, Beta- e Gamma (Figura 6). Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria apresentam habilidade em catabolizar carboidratos simples e complexos (LI *et al.*, 2014), o que facilita a adaptação ao habitat endofítico. A análise da diversidade da comunidade de folhas por meio das sequências de rRNA 16S, em abordagens dependentes e independentes de cultivo tem mostrado a dominância de Proteobacteria (BULGARELLI *et al.*, 2013). Entre os micro-organismos encontrados, muitos são potencialmente diazotróficos (Figura 6) (KÖBERL *et al.*, 2013), com a presença do gene *nifH*, o qual está relacionado à fixação de nitrogênio (WEBER *et al.*, 2013). Bactérias pertencentes à Firmicutes geralmente predominam na rizosfera (BODENHAUSEN *et al.*, 2013); porém, muitas de suas espécies apresentam boa adaptação ao estilo de vida endofítico (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa colonização frequentemente tem origem na infecção de bactérias do solo nas junções das raízes laterais e na rápida disseminação pelos espaços intercelulares do sistema radicular (CHEN & ZHU, 2015). Entretanto, a maioria das bactérias endofíticas isoladas das diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto demonstrou interação etapa-específica, com poucas delas colonizando mais de uma etapa (Figura 6).

A presença de espécies específicas em cada etapa na comunidade endofítica indica que parte dela pode não ser originária do solo, e sim alcançar o interior da folha pelos estômatos, ferimentos, ou outras portas de entrada (ROMERO *et al.*, 2014). Nesse novo habitat, Proteobacteria pode ter crescido e

proliferado mais rapidamente em fontes de carbono mais prontamente disponíveis (LEFF *et al.*, 2014) no sombreamento e na saída do sombreamento (capítulo 2). Assim, a comunidade de endofíticas pode ser influenciada pela composição e concentração de açúcares e aminoácidos. Plantas mais jovens e em sombreamento apresentam maiores conteúdos de aminoácidos (CHEN & POLAND, 2009; STEINBAUER *et al.*, 2013). Muitos gêneros de Proteobacteria utilizam preferencialmente ácidos orgânicos ao invés de açúcares (PORTAIS & DELORT, 2002), o que também pode ter contribuído para a predominância de Proteobacteria nessas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figura 6).

O predomínio de Firmicutes nas folhas oriundas do campo (Figura 6) pode ser atribuído às maiores concentrações de açúcares (capítulo 2) acompanhadas dos menores teores de aminoácidos (STEINBAUER, 2013). Entretanto, *Bacillus flexus* mostrou-se abundante em todas as fases de desenvolvimento (Figura 6), podendo o início da colonização desse gênero ocorrer no jardim clonal, evidenciado pela ocorrência de algumas de suas espécies em mais de uma fase de desenvolvimento das mudas (Figura 6). A colonização e permanência de *Bacillus flexus* indica a existência de maquinaria genética específica para colonização e persistência em folhas de eucalipto, sendo um endofítico competente (HARDOIM *et al.*, 2008), generalista e com maior capacidade competitiva. Folhas são um habitat mais dinâmico em comparação com a rizosfera e a comunidade microbiana em interação com ela está mais sujeita a variações de temperatura, umidade e radiação durante o dia e a noite, fatores que mudam a comunidade microbiana e a fisiologia da planta (TURNER *et al.*, 2013).

A versatilidade metabólica de bactérias do gênero *Bacillus* confere maior resistência e resiliência desses micro-organismos em vários ambientes com temperaturas, concentrações de sais e pH variáveis (AQEL *et al.*, 2012). Durante as etapas de desenvolvimento do eucalipto ocorrem mudanças na fisiologia da planta (MANKESSI *et al.*, 2010), as quais podem ser responsáveis por modificar a comunidade de bactérias endofíticas. Essas mudanças permitem às bactérias endofíticas multiplicarem-se rapidamente e predominarem em condições favoráveis, mantendo latência em condições menos propícias ao crescimento e proliferação. Bactérias endofíticas em interação com eucalipto podem ser relevantes para a fisiologia da planta e proporcionar tolerância a fatores bióticos e abióticos. Essas características aumentam a sobrevivência e o crescimento da planta em condições adversas e em competição com patógenos (GAIERO *et al.*, 2013). Acrescente-se, ainda, a produção de grande variedade de reguladores de crescimento como

giberelinas, ácido abscísico e auxinas (GAIERO *et al.*, 2013).

A análise filogenética das sequências de rRNA 16S confirmou que a comunidade de endofíticas em folhas de eucalipto está incluída em Firmicutes, Proteobacteria (Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria pela formação de clados distintos (Figura 7). Os *bootstraps* acima de 95 (Figura 7) na maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007). Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Esses gêneros são fixadores de nitrogênio e produtores e excretadores de AIA e aminoácidos (LIBA *et al.*, 2006). Esses metabólitos liberados pelos endofíticos podem ser utilizados pela planta e aumentar sua taxa de crescimento (KEMBEL *et al.*, 2014). A fixação de nitrogênio é amplamente difundida entre bactérias e essa capacidade pode proporcionar uma oportunidade para melhorar a nutrição de plantas (OLDROYD & DIXON, 2014). Entre as Proteobacterias fixadoras de nitrogênio estão dois isolados de *Rhizobium* (Figura 6), com alta identidade e *bootstrap*, geneticamente relacionados com *Agrobacterium*, *Ochrobactrum rhizosphaerae* e *Ochrobactrum tritici* (Figura 7).

Ochrobactrum rhizosphaerae foi descrita recentemente no solo com capacidade de utilizar sacarose e frutose como fontes de carbono (KAMPFER *et al.*, 2008), sendo neste estudo descrita aqui como endofítica em eucalipto. *Xantobacter flavus* é outra fixadora de N descrita há 36 anos com sistema similar a *Azotobacter* e utiliza muitos ácidos orgânicos. A maioria dos carboidratos é utilizada por esses micro-organismos após incubação prolongada (MALIK & CLAUS, 1979). Essas bactérias formam um clado distinto com alto *bootstrap*, o que garante a proximidade filogenética entre elas. Os genes de fixação de nitrogênio presentes podem ser uma das características que as aproximam filogeneticamente.

A maioria dos Firmicutes isolados das várias fases de desenvolvimento do eucalipto pertencente ao gênero *Bacillus* e o filo Alfaproteobacteria foi o que contribuiu com o maior número de gêneros distintos (Figura 6). *Bacillus* geralmente é a bactéria endofítica mais encontrada, sendo fonte de várias enzimas com grande potencial biotecnológico, como amilases, proteases, celulasas e lipases (KANNAN *et al.*, 2015). Essas enzimas parecem ser fundamentais para o início da colonização endofítica (SEO *et al.*, 2010). Esses micro-organismos são capazes de produzir auxinas e giberelinas, em adição à fixação de nitrogênio, e secretar substâncias importantes no controle biológico de patógenos (BACON *et al.*, 2015).

O filo Betaproteobacteria foi o menos representativo entre os isolados e BAC 06 foi identificado como *Massilia timonae* (Figuras 6 e 7). Essa espécie é

colonizadora da rizosfera, raízes (OFEK *et al.*, 2012) e folhas (JACKSON *et al.*, 2013) e promotora de crescimento pela produção de AIA, sideróforos em várias espécies de planta. A sensibilidade de *Massilia timonae* à competição (OFEK *et al.*, 2012) pode ser a causa da incapacidade dela em manter-se em outras fases de desenvolvimento do eucalipto, fato que pode ter ocorrido também com outras espécies (Figura 6). Essa comunidade bacteriana endofítica em eucalipto é diversa e dependente dessas fases. Muitas delas são potencialmente diazotróficas e podem contribuir para a fixação de nitrogênio e promoção de crescimento (Figura 6).

A comunidade bacteriana endofítica em eucalipto *Eucalyptus* difere de acordo o órgão de isolamento, área geográfica do cultivo e a espécie de planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). Os poucos estudos existentes envolvendo essa planta mostraram a presença de *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp, *Curtobacterium* sp, *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* (CASTELLANOS *et al.*, 2010).

As espécies isoladas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto ainda não foram registradas em interação endofítica com essa planta. Este estudo, portanto, contribuiu com a inclusão de novas endofíticas em *Eucalyptus*, inclusive aquelas com potencial para fixação de nitrogênio (Figuras 6 e 7). O gênero *Novosphingobium* já foi descrito como endofítico (CASTRO *et al.*, 2014); entretanto, esse é o primeiro registro da espécie *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) como endofítica. Essa espécie está filogeneticamente relacionada com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7) e apresenta maquinaria genética que possibilita a adaptação em diversos habitat como solo, sedimentos e ambientes aquáticos (ADDISON *et al.*, 2007). O interior das folhas de eucalipto recém-saídas do sombreamento é outro importante habitat ocupado por *Novosphingobium barchamii* (Figura 6 e 7). Essa espécie utiliza glicose, sacarose e ramnose como fontes de carbono sendo isolada de solos contaminados com o inseticida hexaclorociclohexano (NIHARIKA *et al.*, 2013). *Rhizobium grahamii*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*

e *Terrabacter lappili* são outras novas espécies endofíticas isoladas de folhas de eucalipto (Figuras 6 e 7). Os altos valores de identidade e *bootstrap* confirmam a identificação dessas espécies como endofíticas (Figura 7). *Rhizobium* é comumente citado como endofítico em várias plantas, porém, a literatura consultada não aponta *Rhizobium grahami* como um deles. Essa bactéria pertence a um novo grupo filogenético de rizóbio, juntamente com *Rhizobium mesoamericanum* e outros (ALTHABEGOITI *et al.*, 2014). A presença de *Stenotrophomonas panacihumi* em interação com plantas é inédita (Figura 6), sendo até o momento encontrada apenas em solos cultivados com plantas medicinais (YI *et al.*, 2010). *Stenotrophomonas panacihumi* mostrou proximidade filogenética com *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas pavani* e *Stenotrophomonas maltophyla* (Figura 7), sendo essas duas últimas isoladas como endofíticas fixadoras em cana-de-açúcar (RAMOS *et al.*, 2014). *P. darwinianus* e *Panibacillus terrigena* são espécies incluídas em Firmicutes, o filo mais abundante entre os grupos bacterianos no ambiente como solos da Antártica (DSOUZA *et al.*, 2014), e rizosfera de bambú (HAN *et al.*, 2009). A habilidade de bactérias desse gênero em colonizar vários ambientes é atribuída à diversidade fisiológica pela formação de endósporos resistentes a estresse, à secreção de enzimas extracelulares e a compostos antimicrobianos. A presença dessas enzimas garante a hidrólise de uma variedade de carboidratos (PRIEST, 2009). A colonização inédita de *Panibacillus darwinianus* e *Panibacillus terrigena* em eucalipto ocorreu em plantas oriundas da expedição e campo, respectivamente (Figura 6). O filo actinobacteria é pouco explorado como fonte de novas bactérias endofíticas. Entretanto, mais recentemente, o número de relatos vem aumentando em várias plantas (BODENHAUSEN *et al.*, 2013; MIGUEL *et al.*, 2013; ROMERO *et al.*, 2014; LEFF *et al.*, 2014). Neste estudo, *Terrabacter lappili*, isolada de folhas de eucalipto em campo, é mais uma actinobacteria incluída entre as endofíticas (Figuras 6 e 7).

A comunidade bacteriana endofítica é parte importante do microbioma de eucalipto. Entre as bactérias que compõem essa comunidade estão as endofíticas diazotróficas, que podem contribuir com o nitrogênio necessário ao crescimento dessa planta. Entretanto, novas abordagens envolvendo a expressão de genes *nifH*, responsáveis pela fixação de N fazem-se necessárias. A descrição da diversidade desses micro-organismos em diferentes fases de desenvolvimento possibilita melhor compreensão sobre a dinâmica da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de bactérias endofíticas é etapa importante para determinar outros possíveis benefícios da interação endofítico-eucalipto e

determinar o papel ecológico que elas têm nessa interação.

CONCLUSÕES

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio. A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou-se distinta em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria. Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas*, e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento. A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.

REFERÊNCIAS

- ADDISON, S. L., FOOTE, S. M., REID, N. M & LLOYD-JONES, G. *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2467-2471, 2007.
- AL-BATAYNEH, K. M., JACOB, J. H & HUSSEIN E. I. Isolation and molecular identification of new thermophilic bacterial strain of *Geobacillus pallidus* and

Anoxybacillus flavithermus. **International Journal Integrative Biology**. v. 11, p. 39-43, 2011.

ALTHABEGOITI, M. J., ORMEÑO-ORRILLO, E., LOZANO, L., TEJERIZO, G. T., ROGEL, M. A., MORA, J & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Characterization of *Rhizobium grahamii* extrachromosomal replicons and their transfer among rhizobia. **BMC Microbiology**, 14, p. 1-14, 2014.

ALTIMIRA, F., YÁÑEZ, C., BRAVO, G., GONZÁLEZ, M., ROJAS, L. A & SEEGER, M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-12, 2012.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.

AQEL, H., AL-QUADAN, F & BOULENOUAR, N. Effects of temperature, pH-values and sodium chloride concentrations on the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by thermotolerant *Bacillus* strains. **Journal Bioscience Biotechnology**, v. 1, p. 57-65, 2012.

BACON, C. W., PALENCIA, E. R & HINTON, D. M. (2015). Abiotic and Biotic Plant Stress-Tolerant and Beneficial Secondary Metabolites Produced by Endophytic *Bacillus* Species. In: **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets** (pp. 163-177). Springer India.

BLACKWOOD, C. B., OAKS, A & BUYER, J. S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6193-6198, 2005.

BODENHAUSEN, N., HORTON, M. W & BERGELSON, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

BONIEK, D., FIGUEIREDO, D., PYLRO, V. S & DUARTE, G. F. Characterization of bacterial strains capable of desulphurisation in soil and sediment samples from Antarctica. **Extremophiles**, v. 14, p. 475-481, 2010.

BONITO, G., REYNOLDS, H., ROBESON, M. S., NELSON, J., HODKINSON, B. P., TUSKAN, G., SCHADT, C. W & VILGALYS, R. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3356-3370, 2014.

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

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 13, p. 79-148, 2000.

BULGARELLI, D., SCHLAEPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de Bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CASTRO, R. A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., BATISTA, B. D., LUVIZOTTO, D. M., MARCON, J., FERREIRA, A., MELO, I. S & AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springer Plus**, v. 3, p. 1-10, 2014.
- CHEN, Y & POLAND, T. M. Interactive influence of leaf age, light intensity, and girdling on green ash foliar chemistry and emerald ash borer development. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 806-815, 2009.
- CHEN, C & ZHU, H. Are common symbiosis genes required for endophytic rice-rhizobial interactions? **Plant Signaling & Behavior**, v 8, p. 1-4, 2013.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-Fixing Bacteria in *Eucalyptus globulus* Plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- DSOUZA, M., TAYLOR, M. W., TURNER, S. J & AISLABIE, J. Genome-Based Comparative Analyses of Antarctic and Temperate Species of *Paenibacillus*. **PloS One**, v. 9, p. e108009, 2014.
- EL-DEEB, B., FAYEZ, K & GHERBAWY, Y. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 1, p. 56-64, 2013.
- FERREIRA, A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., ODA, S., AZEVEDO, J. L & ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, p. 8-14, 2008.
- FIGUEROA, C. M., DIEZ, M. D. A., KUHN, M. L., MCEWEN, S., SALERNO, G. L., IGLESIAS, A. A & BALLICORA, M. A. The unique nucleotide specificity of the sucrose synthase from *Thermosynechococcus elongatus*. **FEBS Letters**, v. 587, p. 165-169, 2013.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. D. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting

- switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, p.19-27, 2011.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.
- HAN, J., XIA, D., LI, L., SUN, L., YANG, K & ZHANG, L. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Microbial Ecology**, v. 58, p. 363-373, 2009.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16, p. 463-471, 2008.
- HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K & WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.
- JACKSON, C. R., RANDOLPH, K. C., OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- KÄMPFER, P., SESSITSCH, A., SCHLOTER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J & SCHOLZ, H. C. *Ochrobactrum rhizosphaerae* sp. nov. and *Ochrobactrum thiophenivorans* sp. nov., isolated from the environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1426-1431, 2008.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMBEL, S. W., O'CONNOR, T. K., ARNOLD, H. K., HUBBELL, S. P., WRIGHT, S. J & GREEN, J. L. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 13715-13720, 2014.
- KERFELD, C. A & SCOTT, K. M. Using BLAST to Teach “e-value-evolutionary” Concepts. **PLoS Biology**, v. 9, p. 1-4, 2011.
- KÖBERL, M., SCHMIDT, R., RAMADAN, E. M., BAUER, R & BERG, G. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-9, 2013.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p.
- KUKLA, M., PŁOCINICZAK, T & PIOTROWSKA-SEGET, Z. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. **Chemosphere**, v. 117, p. 40-46, 2014.

- LEFF, J. W., DEL TREDICI, P., FRIEDMAN, W. E & FIERER, N. Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees. **Environmental Microbiology**, p. 1-10, 2014.
- LI, X.; RUI, J., XIONG, J., LI, J., HE, Z., ZHOU, J., YANNARELL, A. C., RODERICK, I. & MACKIE, R. I. Functional Potential of Soil Microbial Communities in the Maize Rhizosphere. **PloS One**, v. 9, p. 1-9, 2014.
- LIBA, C. M., FERRARA, F. I. S., MANFIO, G. P., FANTINATTI-GARBOGGINI, F.,

ALBUQUERQUE, R. C., PAVAN, C., RAMOS, P. L., MOREIRA-FILHO, C. A

& BARBOSA, H. R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1076-1086, 2006.
- MALIK, K. A & CLAUS, D. Xanthobacter flavus, a new species of nitrogen-fixing hydrogen bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 29, p. 283-287, 1979.
- MANKESSI, F., SAYA, A. R., BOUDON, F., GUÉDON, Y., MONTES, F., LARTAUD, M., VERDEIL, J. L & MONTEUUIS, O. Phase change-related variations of dome shape in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems. **Trees**, v. 24, p. 743-752, 2010.
- MAPELLI, F., MARASCO, R., ROLLI, E., BARBATO, M., CHERIF, H., GUESMI, A., OUZARI, I., DAFFONCHIO, D & BORIN, S. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- MOHAMMAD, I & ALRAWASHDEH, I. Genetic Diversity Determination for Peganum Harmala Species using Shannon's, Simposn, Eveness, Density and Richness Parameters In Jordan. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 5, n. 2, p. 1-5, 2015.

- NAHER, U. A., RADZIAH, O., HALIMI, M. S., SHAMSUDDIN, Z. H & RAZI, I. M. Specific growth rate and carbon sugar consumption of diazotrophs isolated from rice rhizosphere. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 1008 – 1014, 2008.
- NIHARIKA, N., MOSKALIKOVA, H., KAUR, J., SEDLACKOVA, M., HAMPL, A., DAMBORSKY, J., PROKOP, Z & LAL, R. *Novosphingobium barchaimii* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 667–672, 2013.
- OFEK, M., HADAR, Y & MINZ, D. Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). **PloS One**, v. 7, p. e40117, 2012.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- PETERSEN, D. G & DAHLLÖF, I. Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 339-348, 2005.
- POLY, F., RANJARD, L., NAZARET, S., GOURBIÈRE, F & MONROZIER, L. J. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2255-2262, 2001.
- PORTAIS, J. C & DELORT, A. M. Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can ¹³C-NMR tell us? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 375-402, 2002.
- PRIEST, F. G (2009) Genus I. *Paenibacillus*. In: DE VOS. P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W *et al.*, editors. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Firmicutes**. 2nd ed. New York, USA: Springer. pp. 1422.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- RAMOS, P. L., VAN TRAPPEN, S., THOMPSON, F. L., ROCHA, R. C., BARBOSA, H. R., DE VOS, P & MOREIRA-FILHO, C. A. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 926-931, 2014.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 14, P. 435-443, 2011.

- RODIONOV, D. A., YANG, C., LI, X., RODIONOVA, I. A., WANG, Y., OBRAZTSOVA, A. Y., ZAGNITKO, O. P., OVERBEEK, R., ROMINE, M. F., REED, S., FREDRICKSON, J. K., NEALSON, K. H & OSTERMAN, A. L. Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. **BMC Genomics**, v. 11, p. 494, 2010.
- ROMERO, F. M., MARINA, M & PIECKENSTAIN, F. L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, p. 187-194, 2014.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, v. 33, p. 152-155, 2006.
- STEINBAUER, J. Shoot feeding as a nutrient acquisition strategy in free-living psyllids. **PloS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.

- VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M., CRUZ-VÁZQUEZ, F., TREJO-CONTRERAS, M. J., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., BRAVO-PATÍÑO, A., CAJERO-JUÁREZ, M., CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P. & VALDEZ-ALARCÓN, J. J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 137-149, 2011.
- VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J & LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209-216, 2010.
- YI, H., SRINIVASAN, S & KIM, M. K. *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **The Journal of Microbiology**, v. 48, p. 30-35, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou-se eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de bactérias, fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade. Os fungos e leveduras dos filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica e de leveduras endofíticas.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilêmáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

A excisão, a eluição e o sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostraram ser boas técnicas para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto. Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto.

Em eucalipto, a relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a de levedura, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto.

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio.

A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto variou em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL

DIVERSIDADE E MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M635d Miguel, Paulo Sérgio Balbino, 1981-
2015 Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto /
Paulo Sérgio Balbino Miguel. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 125f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

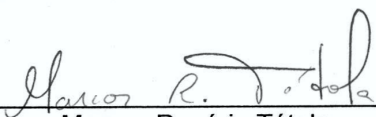
1. Eucalipto - Microbiologia. 2. Fungos.
3. Bactérias endofíticas. 4. Leveduras. 5. Filogenia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

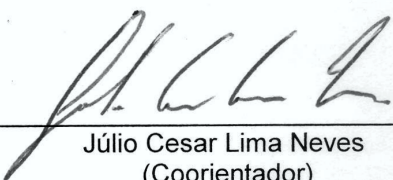
CDD 22 ed. 634.973766

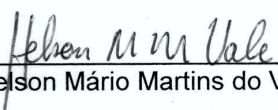
DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

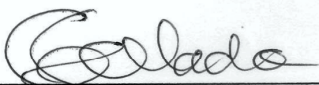
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de maio de 2015.


Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)


Júlio Cesar Lima Neves
(Coorientador)


Helson Mário Martins do Vale


Gleiber Quintão Furtado


Maurício Dutra Costa
(Orientador)

A Deus.

*À minha esposa,
à minha mãe e ao meu irmão.*

Dedico.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; mas os insensatos
desprezam a sabedoria e a instrução”. (Prov.1:7)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor e consumidor da minha fé.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pela orientação e pela confiança.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pela orientação no início deste trabalho.

Aos professores Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves, pela coorientação.

À minha amada esposa Mara, que me incentivou todos os dias com seu amor, dedicação, paciência, confiança e compreensão.

À minha mãe, D. Aparecida, que sempre lutou e me sustentou em oração.

Ao meu irmão Fábio, um grande amigo e incentivador.

Aos amigos Julio Delvaux, Marcelo Nagem e Bruno Coutinho Moreira, pelo apoio, pela amizade e pelo auxílio neste trabalho.

Aos irmãos da Igreja Metodista Wesleyana de Viçosa, pelas orações feitas pela minha vida.

A todos que de alguma forma me ajudaram na condução deste trabalho.

BIOGRAFIA

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL, filho de Francisco de Oliveira Miguel e de Aparecida de Fátima Balbino Miguel, nasceu em Astolfo Dutra – MG, no dia 19 de junho de 1981.

Em dezembro de 2008 graduou-se em Ciências Biológicas pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. Em fevereiro de 2011, obteve o título de *Magister Science* em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, e, em março do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da mesma instituição, submetendo-se à defesa da tese de doutorado em maio de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
CAPÍTULO 1.....	04
INTRODUÇÃO.....	05
REVISÃO DE LITERATURA	06
Endofíticos	06
Colonização da planta.	08
Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos	11
Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos.....	13
Eucalipto	16
Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto	18
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2.....	29
RESUMO	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
Área de estudo.....	32
Amostragem	33
Descontaminação superficial das folhas de eucalipto	34
Extração de DNA metagenômico em folhas e exsudatos xilemáticos.....	34
Análises da diversidade de fungos endofíticos	35
Análise filogenética	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 3.....	57
RESUMO	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS	60
Áreas de estudo	60

Amostragem	61
Descontaminação superficial de folhas.....	61
Extração de DNA metagenômico em folhas.....	62
Extração de açúcares	62
Análise da diversidade de fungos e leveduras	63
Análise filogenética	65
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
CAPÍTULO 4	90
RESUMO	91
INTRODUÇÃO	92
MATERIAL E MÉTODOS	93
Área de estudo	93
Amostragem	94
Descontaminação superficial de folhas	94
Extração de DNA metagenômico	95
Análise da diversidade de bactérias endofíticas totais e diazotróficas.....	96
Isolamento de bactérias endofíticas.....	97
Extração de DNA de culturas puras	97
BOX-PCR.....	98
Amplificação e Sequenciamento do rRNA 16S	98
Análise filogenética	99
RESULTADOS	99
DISCUSSÃO	110
CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS.....	117
CONCLUSÕES GERAIS.....	124

RESUMO

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2015. **Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves.

Árvores pertencentes ao gênero *Eucalyptus* estão entre as mais cultivadas em todo o mundo. O rápido crescimento do eucalipto e a sua adaptabilidade a vários ambientes podem ser compreendidos pelo estudo da comunidade microbiana presente nessa planta. Essa comunidade é composta por micro-organismos endofíticos e epifíticos. Endofíticos colonizam os tecidos internos de plantas saudáveis sem causar sintomas ou efeitos negativos à planta. Neste estudo, foram avaliadas a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de plantas de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco. Avaliou-se, também, a diversidade de bactérias, fungos e leveduras em plantas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo. A diversidade microbiana foi relacionada à concentração de açúcares. Após extração de DNA de folhas e exsudatos xilemáticos, os *amplicons* obtidos por amplificação das subunidades do rRNA 16S, 18S e 26S foram utilizados na DGGE e as bandas eluídas dos géis foram sequenciadas. A avaliação da composição da comunidade bacteriana em folhas do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo também foi comprovada pelo isolamento e sequenciamento do rRNA 16S das colônias. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela idade das plantas e pela sazonalidade. A análise filogenética mostrou a dominância de fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota. Neste estudo, foi apresentado o relato inédito de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos em plantas. No viveiro, a colonização endofítica da parte aérea de eucalipto foi dependente das fases de desenvolvimento da planta. Neste estudo, foi relatada pela primeira vez a presença das leveduras dos gêneros *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia* e das espécies *Rhodosporidium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* como endofíticas em eucalipto. Bactérias dos filos Firmicutes, Proteobacteria, classes Alfa, Beta e Gamma, e Actinobacteria foram identificadas

na comunidade investigada. Nessa comunidade, as espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* foram identificadas pela primeira vez como endofíticas. Proteobacteria foi o filo mais representativo em folhas de mudas nas fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento; e Firmicutes, em plantas a campo. Observaram-se correlações negativas entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de diversidade e riqueza microbianas. A distribuição das espécies de fungos, leveduras e bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento da planta. Algumas espécies bacterianas encontradas apresentam potencial para fixação de nitrogênio.

ABSTRACT

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, May, 2015. **Endophytic microbial diversity in Eucalypts**. Adviser: Maurício Dutra Costa. Co-advisers: Marcos Rogério Tótola and Júlio César Lima Neves.

Plants belonging to the *Eucalyptus* genus are among the most cultivated in the world. Eucalypts are fast-growing plants and their ability to adjust to a variety of environments can be understood by studying the associated microbiome. Eucalypt microbiome is composed by endophytic and epiphytic microorganisms. Endophytes colonize the internal tissues of healthy plants without causing symptoms or negative effects. In this study, the endophytic fungal diversity and distribution were evaluated in leaf and xylematic exudates from 18- and 72-month-old eucalypt plants in the beginning of the rainy season, in the rainy season and in the dry season. The bacterial, fungal, and yeast diversity in plants from different developmental stages was also evaluated: clonal garden, shading, post-shading, expedition and field. The microbial diversity was correlated with the sugar concentration in leaves. Following DNA extraction from leaf and xylematic exudates, amplicons generated by the amplification of 16S, 18S, and 26S rRNA subunits were submitted to DGGE, and the bands excised were sequenced. Bacterial community composition in leaves from the clonal garden, shading, post-shading, expedition, and field was also evaluated and confirmed by isolating bacteria and sequencing the 16S rRNA from bacterial colonies. Endophytic fungal community in leaves was affected by plant age and seasonality. Phylogenetic analyses revealed the dominance of Basidiomycota and Ascomycota phyla during the development stages studied. In this work, the first report of *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi*, and *Teratosphaeriaecea* sp. as inhabitants of the xylematic exudates in plants is provided. In the nursery, endophytic colonization of eucalypt shoots was dependent on the plant developmental stages. In this study, the yeasts *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia*, *Rhodosporidium fluviale*, and *Aureobasidium pullulans* were described as endophytic for the first time. Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, and Gamma- classes) and Actinobacteria were identified in the endophytic community. *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, and *Terrabacter lappili* were identified as endophytic for the first time. Proteobacteria was the most represented phylum in

leaves from the shading and post-shading stages, while Firmicutes was the main phylum found in leaves of plants in the field. Negative correlations were observed between the glucose, fructose, and sucrose contents in leaves and the microbial diversity and richness indices measured. The distribution of endophytic fungal, yeast, and bacterial species in eucalypt revealed to be distinct and specific to the developmental stage of eucalypt plants. Some of the bacterial species found in eucalypt leaves show the potential for nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade de adaptação das plantas ao ambiente envolve interações com diferentes espécies de micro-organismos. Dentre essas, as interações endofíticas são amplamente conhecidas pelos benefícios proporcionados ao hospedeiro, os quais incluem o estímulo ao crescimento pela fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), a síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e a supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006). Os micro-organismos endofíticos encontram-se associados a plantas saudáveis, sem causar sintomas de doença ou danos. Podem melhorar o estado sanitário (CLARKE *et al.*, 2006) e o desenvolvimento da planta (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012), o que justifica o grande volume de pesquisas sobre esses micro-organismos (BRADER *et al.*, 2014).

O eucalipto está entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta e a sua elevada produção de biomassa demandam alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004). Muitos desses nutrientes podem ser absorvidos mais eficientemente quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Portanto, estudos envolvendo essas comunidades podem proporcionar melhor compreensão das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento das plantas (BRADER *et al.*, 2014). O entendimento da diversidade dos endofíticos em associação com as plantas pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

O acesso à diversidade microbiana pode ser obtido por abordagens moleculares por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos, proporcionando novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; DA SILVA *et al.*, 2014). Este estudo compreende quatro capítulos. O capítulo 1 teve como objetivo revisar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração e colonização e os métodos de identificação de micro-organismos na planta. No capítulo 2 foi estudada a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilêmáticos em plantas

de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. No capítulo 3 foi avaliada a diversidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento e relacionada à concentração de açúcares. No capítulo 4 foi investigada a diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto em plantas provenientes do jardim clonal, do sombreamento, recém-saídas do sombreamento, da expedição e do campo e relacionadas à concentração de açúcares.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS:
COLONIZAÇÃO, BENEFÍCIOS, IDENTIFICAÇÃO E
DIVERSIDADE EM EUCALIPTO**

INTRODUÇÃO

As plantas sustentam diversidade variável de micro-organismos, que podem influenciar o seu desenvolvimento (SUMAN *et al.*, 2005). Parte dessa diversidade é composta por bactérias (MIGUEL *et al.*, 2013), fungos (DESHMUKH *et al.*, 2006), arqueas e leveduras (OLIVEIRA *et al.*, 2013) endofíticos, os quais interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença (BULGARELLI *et al.*, 2013). Esses micro-organismos têm alto potencial de adaptação e muitos deles persistem ao longo de vários estádios de desenvolvimento da planta (HARDOIM *et al.*, 2008). Quando em interação, eles são responsáveis por estimular o crescimento por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e pela supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, sendo de grande valor econômico e alternativa viável para a indústria madeireira (FAO, 2015). As espécies e híbridos de eucalipto estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, e a madeira é usada para a produção de celulose em função da rápida taxa de crescimento, da adaptação a várias condições ecológicas e pela qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta demanda alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004), os quais podem ser melhor acessados quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo das comunidades microbianas associadas ao eucalipto pode proporcionar melhor entendimento das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento vegetal (BRADER *et al.*, 2014).

O acesso à diversidade microbiana pode ocorrer por métodos moleculares que dependem (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou não de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A diversidade microbiana em eucalipto é pouco documentada (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), malgrado a importância econômica da cultura para o país, que é o maior produtor mundial. O objetivo desta revisão foi levantar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração, colonização e os métodos de identificação desses micro-organismos na planta, com base em dados atuais sobre o assunto.

REVISÃO DE LITERATURA

Endofíticos

Micro-organismos são essenciais para a manutenção da vida na Terra, mas pouco se sabe sobre a diversidade microbiana presente no solo, nos oceanos, na atmosfera, nos seres humanos e nas plantas (TURNER *et al.*, 2013). No interior das raízes, nas folhas e em outras partes da planta, comunidades microbianas distintas proporcionam melhor acesso da planta aos nutrientes e auxiliam na supressão de diversas doenças (SMITH, 2014). O termo endofíticos se refere a micro-organismos que, em alguma fase de seu ciclo de vida, vivem em associação com plantas saudáveis, sem causar sintoma de doença ou prejuízo ao hospedeiro. Esses micro-organismos adaptam-se ao habitat específico representado pelo corpo das plantas, apresentando potencial metabólico distinto da microbiota do solo (BRADER *et al.*, 2014).

No contexto da interação endofítica, as bactérias que se destacam são pertencentes aos filos Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma), Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (BACON & HINTON, 2007). Já os fungos endofíticos estão distribuídos, em sua maioria, nos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011). A detecção dos micro-organismos endofíticos é realizada por métodos culturais ou moleculares (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A densidade populacional de micro-organismos endofíticos é variável e depende das espécies endofíticas, do genótipo da planta, do estágio de desenvolvimento, das condições ambientais (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO 2006), da localização do cultivo (FISHER *et al.*, 1993) e da parte da planta em associação (MAGNANI *et al.*, 2010). As associações endofíticas podem, ainda, mostrarem-se dependentes de muitos fatores, incluindo o tipo de hospedeiro, a densidade de plantas no local, a disponibilidade de nutrientes no solo e as interações com outros micro-organismos (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011).

O sucesso da colonização endofítica depende da expressão de genes cujos produtos serão importantes para a entrada e a sobrevivência do micro-organismo no interior do hospedeiro (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). A planta que abriga associações endofíticas compartilha recursos com os parceiros microbianos, codificando diversos transportadores no genoma que permitem a transferência de carbono de si para a microbiota associada (TAGHAVI *et al.*, 2010).

A interação endofítica pode impactar a nutrição, a adaptação e o desenvolvimento vegetal (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012) e, por meio

da competição, suprimir patógenos e melhorar a sanidade das plantas (CLARKE *et al.*, 2006; SATHISH *et al.*, 2012). Os micro-organismos endofíticos podem também beneficiar a planta pelo aumento da resistência a estresses abióticos (NAGABHYRU *et al.*, 2013).

A existência da interação planta-micro-organismo endofítico tem sido constatada em frutos (MIGUEL *et al.*, 2013), caules, folhas (PROCÓPIO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2008; TUPPAD & SHISHUPALA, 2014), raízes (TUPPAD & SHISHUPALA, 2014) e em outras partes da planta. Hipotetiza-se que a entrada de micro-organismos endofíticos seja controlada pela planta e pelas condições ambientais (HARDOIM *et al.*, 2008). Algumas evidências sugerem que a planta tem papel ativo na seleção de certos micro-organismos para a vida endofítica. No entanto, os mecanismos pelos quais isso é feito ainda não são conhecidos (HARDOIM *et al.*, 2008). Micro-organismos endofíticos que ocupam o mesmo nicho em diferentes plantas podem ser muito distintos taxonomicamente (TURNER *et al.*, 2013).

A capacidade de micro-organismos endofíticos de colonizarem os tecidos internos das plantas pode conferir vantagens ecológicas quando esses são comparados aos micro-organismos epifíticos. O habitat representado pelo ambiente interno do corpo das plantas é mais protegido de variações extremas de temperatura, do potencial osmótico, da radiação ultravioleta e da competição com outros micro-organismos (HALLMAN *et al.*, 1997).

Em relação ao ciclo de vida, os micro-organismos endofíticos podem ser obrigatórios ou facultativos. Micro-organismos endofíticos obrigatórios são estritamente dependentes da associação com a planta para o crescimento e a sobrevivência. Em contrapartida, os facultativos apresentam ciclo de vida bifásico, alternando entre a planta e o ambiente (HARDOIM *et al.*, 2008). O estilo de vida facultativo é o mais comum. Os micro-organismos endofíticos obrigatórios, em face da menor competição com outros micro-organismos no interior da planta, podem apresentar arsenal químico menos rico em relação àqueles da rizosfera e da filosfera. Entretanto, os micro-organismos endofíticos podem produzir metabólitos mais específicos que podem sustentar a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014). Os colonizadores facultativos, por sua vez, têm de ser capazes de sobreviver na rizosfera antes de adentrar a planta, podendo produzir metabólitos inibitórios a outros micro-organismos ou que facilitem a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014).

Colonização da planta

A rizosfera corresponde ao volume de solo influenciado pelas raízes da planta. A diversidade microbiana rizosférica é alta por ser esse ambiente rico em fontes de energia prontamente disponíveis (BRADER *et al.*, 2014), provenientes da rizodeposição de mucilagens e exsudatos (PHILIPPOT *et al.*, 2013). A relação entre micro-organismos endofíticos e rizosféricos é bastante próxima. Muitos deles penetram o hospedeiro pelas raízes (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009) e colonizam novos habitat, escapando da competição intensa vigente na rizosfera (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Entretanto, existem características distintas entre os micro-organismos rizosféricos e os endofíticos, uma vez que nem todas as populações microbianas da rizosfera podem adentrar a planta, modificar seu metabolismo e adaptar-se ao ambiente interno dos tecidos vegetais (TURNER *et al.*, 2013). Muitos micro-organismos competentes na rizosfera podem, coincidentemente, tornarem-se endofíticos após entrarem na planta via raiz, mas a falta de genes-chave para o sucesso ecológico daqueles em endofitismo não permite a persistência no hospedeiro. A competência endofítica é adquirida pela expressão de genes que devem contribuir para a persistência e para o sucesso da colonização dos espaços internos da planta (HARDOIM *et al.*, 2008).

A rizosfera é região de elevada competição entre as populações microbianas aí presentes. Proteobactérias de rápido crescimento, denominadas estrategistas-r, são capazes de se instalar no solo rizosférico e de utilizar ampla diversidade de compostos de carbono derivados das raízes. Não somente bactérias prosperam rapidamente na rizosfera rica em nutrientes, mas também fungos, oomicetos, vírus e arqueas (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Os pontos de emergência de raízes laterais e a zona de diferenciação e alongamento das raízes são locais proeminentes para ingresso ativo de micro-organismos. Nesses locais, os tecidos não completamente diferenciados podem facilitar a penetração microbiana (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Os espaços intercelulares da epiderme, das regiões corticais e das células vegetais lisadas são os principais locais de colonização, com densidades de até 10^{10} células/cm³ (CHI *et al.*, 2005). Os tecidos vasculares e as células do xilema também podem ser invadidos, embora, muitas vezes, em densidades mais baixas (COMPANT *et al.*, 2010). No caso específico de fungos, geralmente, a infecção endofítica nas folhas ocorre horizontalmente por meio de esporos trazidos pelo ar (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

A colonização endofítica bacteriana pode ocorrer em três etapas. Na primeira, ela move-se em direção às raízes da planta passivamente, através do fluxo de água do solo, ou ativamente, por meio da atividade flagelar induzida por compostos liberados pelo hospedeiro (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008), em mecanismo de quimiotaxia. Em *Azospirillum*, por exemplo, a quimiotaxia é induzida por açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outros compostos (COMPANT *et al.*, 2005). Para tal, genes envolvidos no reconhecimento dos compostos e quimiotaxia devem ser ativados. A expressão de genes envolvidos na quimiotaxia em *Pseudomonas aeruginosa*, a exemplo de *cheY*, *cheA* e *pctA*, que codificam, respectivamente, um regulador de resposta de dois componentes, um regulador de resposta de quimiotaxia e uma proteína quimiostática, é regulada negativamente pelos exsudados de uma cultivar de beterraba, mas não por exsudados de outra cultivar. Assim, a composição dos exsudados depende da cultivar, da exposição da planta ao estresse e do estágio de desenvolvimento, o que pode resultar em diferenças na comunidade bacteriana rizosférica e, consequentemente, da endofítica (COMPANT *et al.*, 2010).

Numa segunda etapa, a adsorção não específica da bactéria às raízes, seguida pelo ancoramento das mesmas, vai ocorrer (SPRENT & DEFARIA, 1988). Uma vez ligadas às raízes, as bactérias sofrem várias divisões celulares e se estabelecem em microcolônias (HARDOIM *et al.*, 2008). Por fim, as bactérias endofíticas podem alcançar o interior da planta por meio de tecidos danificados que surgem naturalmente como resultado do crescimento vegetal, pelos radiculares, por junções epidérmicas ou, ainda, via ferimentos (SPRENT & DEFARIA, 1988. HARDOIM *et al.*, 2008). Dentro da planta, a colonização pode ser sistêmica, pela migração através do sistema vascular e do apoplasto, ou local, como nos tecidos do córtex e do xilema (HALLMANN *et al.*, 1997).

Em bactérias gram-negativas, o antígeno-O da camada LPS pode contribuir para a colonização radicular, processo dependente da espécie bacteriana envolvida. Outra estrutura importante na colonização é o pílus do tipo IV, o qual é essencial para o estabelecimento de microcolônias de *Azoarcus* nas raízes de gramíneas (DÖRR *et al.*, 1998).

A colonização bem sucedida inclui genes envolvidos na quimiotaxia, formação de flagelos e pili, além de várias vias metabólicas e sistemas de transporte (COMPANT *et al.*, 2010). A análise do genoma de *Klebsiella pneumoniae* demonstrou que essa espécie apresenta características típicas de bactérias diazotróficas, anaeróbias facultativas e endofíticas, com a presença de genes

envolvidos na degradação de carboidratos, de compostos aromáticos e celulolíticos, na ciclagem de nutrientes e de carbono e na capacidade de formar associações endofíticas (FOUNTS *et al.*, 2008).

A penetração de fungos endofíticos dá-se por hifas de penetração ou apressórios pela parte basal dos pelos radiculares. A ramificação das hifas formam muitos clamidóporos preenchendo todo o pelo radicular (ERNST *et al.*, 2003; DESHMUKH *et al.*, 2006). Essa penetração pode dar-se de maneira semelhante em outras partes da planta, como folhas e caules, e, também, por ferimentos, incluindo os causados por herbivoria e outros mecanismos. Fungos endofíticos não penetram as células das plantas e, geralmente, se abrigam nos espaços intercelulares, enquanto utilizam baixos níveis de nutrientes nos fluidos intercelulares, não proporcionando danos ao hospedeiro (GAO *et al.*, 2005). As sementes podem funcionar como veículo de transporte de propágulos fúngicos para a próxima geração de hospedeiros (ERNST *et al.*, 2003).

A colonização endofítica é possível pela grande diversidade de enzimas produzidas pelo micro-organismo, tais como celulasas, pectinases e xilanasas (SEO *et al.*, 2010; KANNAN *et al.*, 2015). A degradação enzimática da parede celular tem sido observada no momento da colonização da epiderme radicular, mas não nos espaços intercelulares do córtex; porém, muito pouco é conhecido sobre a regulação desses processos. Entretanto, sabe-se que a liberação constitutiva de hidrolases não é desejada, uma vez que poderia resultar em patogenicidade (HALLMAN *et al.*, 1997). Os níveis de enzimas degradadoras da parede celular produzidas por bactérias diferenciam as endofíticas, com baixos níveis, das patogênicas, com níveis altos e danosos (HARDOIM *et al.*, 2008).

A colonização das folhas é afetada por estruturas, como vasos condutores, pelos e estômatos. A comunidade residente no interior da planta, quando comparada ao exterior, está em habitat sujeito a maiores flutuações de temperatura, umidade e radiação (TURNER *et al.*, 2013). Esses fatores alteram a fisiologia da planta e, aliados a outros, como estágio de crescimento, tipo de solo, regime hídrico, manejo e densidade de bactérias, podem promover a mudança na estrutura da comunidade endofítica (HARDOIM *et al.*, 2012). Outro fator que diferencia as comunidades endofíticas é a idade das plantas, com as mais jovens apresentando maior densidade que as mais maduras (TURNER *et al.*, 2013).

A complexidade da interação endofítica e a sua contribuição para as plantas justificam novos estudos. O rápido avanço nas tecnologias de sequenciamento de nova geração e no processamento e interpretação dos dados gerados possibilita o

conhecimento da amplitude da diversidade microbiana nesse ambiente (KEMLER *et al.*, 2013). A abordagem metabolômica possibilita o acesso a informações mais amplas sobre a composição dos metabólitos produzidos pelas plantas (JORGE *et al.*, 2014). A interação de plantas com bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio necessita ser mais bem compreendida e caracterizada (CARVALHO *et al.*, 2014b). O acesso à diversidade desses micro-organismos é a etapa inicial e relevante para esse entendimento (TAGHAVI *et al.*, 2010), e estudos da expressão de genes podem possibilitar a identificação das diversas vias metabólicas envolvidas nessas associações (CARVALHO *et al.*, 2014b).

Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos

A interação entre micro-organismos endofíticos e plantas contribui para a adaptação a diversos nichos e para a produção de vários metabólitos que podem ser importantes na aquisição de nutrientes pela planta (BRADER *et al.*, 2014).

A disponibilidade de nitrogênio é um dos fatores que mais limitam o crescimento vegetal, requerendo a adição do elemento ao solo em altos níveis para a manutenção da produtividade agrícola (OLDROYD & DIXON, 2014). A fixação biológica é importante fonte de nitrogênio na agricultura e representa alternativa promissora à fertilização química. Bactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (SUMMAN *et al.*, 2005; OLDROYD & DIXON, 2014), e os endofíticos podem contribuir significativamente para o sucesso de abordagens biotecnológicas visando o suprimento de nitrogênio às culturas.

A capacidade de fixar nitrogênio é encontrada nos principais grupos filogenéticos bacterianos (OLDROYD & DIXON, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas são geneticamente diversas, sendo identificadas principalmente entre as Proteobacterias (Alfa-, Beta- e Gamma), a exemplo dos gêneros *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Esses micro-organismos possuem o complexo enzimático da nitrogenase (ARAÚJO *et al.*, 2014), sendo a maquinaria de fixação e de regulação do processo muito similar à de *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Interações planta-bactérias diazotróficas ocorrem em diferentes níveis, podendo apresentar especificidade em relação ao hospedeiro (ARAÚJO *et al.*, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas podem expressar os genes *nifH*, além de outros, importantes ao processo de fixação biológica, podendo contribuir com quantidades significativas de N para a planta (TURNER *et al.*, 2013).

Bactérias, leveduras e fungos endofíticos podem produzir fitormônios, principalmente ácido indol acético (AIA) (WAQAS *et al.*, 2012; HOFFMAN *et al.*, 2013; NUTARATAT *et al.*, 2014). Além do AIA, as giberelinas, as citocininas e o ácido abscísico podem também ser sintetizados por esses micro-organismos e disponibilizados para as plantas (KHAN *et al.*, 2012; GAIERO *et al.*, 2013). As auxinas e as citocininas estão envolvidas nos processos regulatórios que determinam a arquitetura da raiz. Já as giberelinas são importantes nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, promovendo o aumento do crescimento caulinar e radicular e da densidade dos pelos radiculares (CARVALHO *et al.*, 2014a). Os fitormônios são os principais agentes que regulam a resposta da planta frente às mudanças ambientais (MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2009). Além disso, podem atuar como antimicrobianos, a exemplo do ácido fenil-acético, produzido por *Azospirillum brasiliense*, com atividade antagonica a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011).

A microbiota endofítica pode melhorar a sanidade vegetal por meio da produção de moléculas antagonistas a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011). A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, pode ser controlada pela secreção de substâncias antimicrobianas que impedem a germinação dos uredósporos (SHIOMI *et al.*, 2006). Os melhores resultados com esse tipo de controle são obtidos com o uso de *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Klebsiella pneumoniae* (SHIOMI *et al.*, 2006).

A proteção da planta por bactérias endofíticas pode ocorrer pela perturbação do *quorum-sensing*, mecanismo necessário para a virulência em alguns patógenos. Esse mecanismo geralmente é mediado pelas *N*-acil homoserina lactonas (AHLs). A produção de lactonases degradadoras de AHLs por bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Klebsiella* pode interferir na comunicação patógeno-patógeno e impedir a expressão de genes de virulência (FRIESEN *et al.*, 2011).

A produção de alcalóides por fungos endofíticos pode reduzir a herbivoria, resultando na diminuição do consumo de folhas e sementes por animais (FRIESEN *et al.*, 2011). Da mesma forma, o uso de endofíticos pode ser estratégia interessante no controle biológico (TURNER *et al.*, 2013). Leveduras endofíticas produzem enzimas hidrolíticas, a exemplo das celulases, quitinases, glucanases e proteases, que degradam quitina, β -1,3-glucana, manoproteínas e celulose, componentes da parede celular de vários fungos fitopatogênicos (NATURAT *et al.*, 2014).

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* são reconhecidamente produtoras de antibióticos, compostos voláteis, substâncias antifúngicas, antivirais e inseticidas (TURNER *et al.*, 2013). Já alguns fungos, principalmente os representantes do filo Ascomycota, são eficientes produtores de compostos antibacterianos (DESHMUKH *et al.*, 2014) e de compostos oxidantes durante a colonização vegetal. A produção de antioxidantes está ligada ao aumento da tolerância ao estresse em plantas hospedeiras (WHITE-JÚNIOR & TORRES, 2010).

Os micro-organismos endofíticos são, portanto, fontes de novos produtos naturais, com potencial biotecnológico. Dada a capacidade dos mesmos de degradar compostos orgânicos, são importantes na biorremediação e na fitorremediação (RYAN *et al.*, 2008). Com a utilização de técnicas de engenharia genética, podem ainda ser melhorados no que concerne ao potencial de degradação de compostos xenobióticos (BARAC *et al.*, 2004).

Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos

O critério para distinguir micro-organismos endofíticos requer a desinfestação da superfície da planta pela utilização de álcool 70%, hipoclorito de sódio 3% e água esterilizada, em tempos variáveis a depender do tecido vegetal utilizado. Essa etapa visa à eliminação de epifíticos presentes na filosfera (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Após a desinfestação das partes vegetais desejadas, a diversidade microbiana endofítica pode ser acessada pela utilização de análises moleculares das comunidades por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.*, 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A comprovação da natureza endofítica dos micro-organismos extraídos das plantas pode ser obtida pelo plaqueamento da última água de lavagem do procedimento de desinfestação da planta, ou pela incubação de partes do material vegetal submetido à desinfestação superficial (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). O tempo de incubação e o meio de cultura utilizado são dependentes do micro-organismo que se deseja estudar.

A análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) é um dos métodos dependentes de cultivo utilizados como discriminadores taxonômicos para a identificação de espécies em comunidades microbianas (HILL *et al.*, 2000). Esse método consiste na esterificação dos lipídeos extraídos da amostra, seguida da

separação e identificação por cromatografia gasosa desses compostos. A identificação é baseada nos tempos de retenção da amostra na coluna cromatográfica, comparados aos tempos de retenção de padrões submetidos ao mesmo processo (KIRK *et al.*, 2004). Esse método é utilizado para se estudar a composição das comunidades microbianas, bem como as mudanças nas populações em razão da presença de contaminantes químicos no ambiente (SICILIANO & GERMIDA, 1998) ou, ainda, para a identificação de isolados de bactérias endofíticas de plantas (VEGA *et al.*, 2008; MIGUEL *et al.*, 2013).

A identificação de isolados bacterianos desconhecidos de uma amostra também pode ser realizada pelo sequenciamento do gene rDNA 16S e subsequente comparação da sequência obtida com as depositadas nos bancos de dados, como o *Genbank* (National Center for Biotechnology Information) (TEMMERMAN *et al.*, 2004). O gene rRNA 16S é alvo de estudos de diversidade porque está presente em todos os organismos procariotos, sendo pouco sujeito à transferência horizontal (KIRK *et al.*, 2004). A sequência do gene rRNA 16S contém regiões variáveis espécie-específica, o que permite a identificação dos isolados bacterianos em nível de espécie (CAI *et al.*, 2003). Esse gene é, portanto, o de escolha para a construção de *primers*, reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e alinhamento de sequências (HARDOIM *et al.*, 2012; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Com esse tipo de análise, é possível conhecer os gêneros bacterianos em mais de 90% dos casos e as espécies entre 65 a 83% (JANDA & ABBOTT, 2007). Quando o poder discriminatório não é suficiente, a análise filogenética exclui outros gêneros e espécies. Assim, os dados de sequenciamento são mais apurados em razão das relações filogenéticas disponíveis (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). Uma limitação considerável da técnica ocorre quando duas espécies bacterianas distintas compartilham sequência rRNA 16S muito similares (WOO *et al.*, 2008).

O sequenciamento do gene rRNA 16S origina dados não ambíguos e reprodutíveis, mesmo para isolados raros (DRANCOURT *et al.*, 2000), tendo se tornado método de referência para a taxonomia e a identificação bacterianas (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). O uso de sequências do rRNA 16S tem levado à reclassificação e à renomeação de gêneros e espécies bacterianas, além de permitir a classificação de micro-organismos não-cultivados e facilitar a descoberta e a classificação de novas espécies (WOO *et al.*, 2008).

A identificação de espécies fúngicas e de leveduras é obtida pela sequência de DNA do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA 18S ou pelo fragmento rRNA

18S (NILSSON *et al.*, 2008). ITS é uma região multicópia que nos eucariotos é compreendida por uma região não codificante, uma codificadora e outra não codificante. A variabilidade dessa região proporciona resolução suficiente para identificação de fungos e leveduras (ARNOLD, 2007). Já a região D1/D2 do gene rRNA 26S e o sequenciamento desse domínio têm proporcionado a identificação de espécies de leveduras de forma rápida e precisa (HESHAM *et al.*, 2014).

A análise do perfil fisiológico das comunidades é outro método dependente de cultivo para análise da diversidade microbiana. Através dele é possível determinar a capacidade do micro-organismo em utilizar diferentes fontes de carbono *in vitro*. Essa metodologia é baseada no uso de microplacas contendo 190 fontes alternativas de carbono. A técnica é importante quando se avalia a diversidade metabólica potencial de comunidades microbianas em diferentes ambientes (KIRK *et al.*, 2004; BOCHNER, 2009). A abordagem polifásica é baseada na combinação entre características morfológicas e bioquímicas das espécies de micro-organismos com informações de sequências e reconstrução filogenética, sendo a escolha para estudos de caracterização da comunidade microbiana (VANDAMME *et al.*, 1996), por tornar as análises mais robustas (STACKEBRANDT & EBERS, 2006).

Diferentemente das endossimbioses ou dos sistemas patogênicos bem estudados, as bases moleculares das interações endofíticas ainda não são bem compreendidas (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Análises genômicas comparativas poderão fornecer melhor compreensão da dinâmica da comunidade, sinalização e funções nas associações endófito-planta (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Estudos dependentes de cultivo são importantes; entretanto, não permitem o acesso à totalidade da diversidade microbiana. A utilização de tecnologias de sequenciamento *high-throughput* nos últimos anos tem permitido a identificação de milhares a milhões de sequências nas amostras, revelando, inclusive, espécies raras. A abordagem metagenômica revela a diversidade da comunidade microbiana em interação com a planta (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação do metagenoma pode ser realizada por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), o qual é satisfatório para avaliação da diversidade, mas limitado para detecção de espécies (DAVID *et al.*, 2014). Os fragmentos de DNA de mesmo tamanho, amplificados por PCR, são submetidos à eletroforese em gel com gradiente desnaturante, geralmente de formamida e ureia, e utilizados para análise da estrutura da comunidade microbiana (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013). Essa técnica

permite a identificação de populações de menor e maior abundância em comunidades rizosféricas e endofíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014) e contribui para elucidar mudanças na estrutura da comunidade microbiana em resposta a determinados fatores ao longo do tempo (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

A tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilita o sequenciamento do DNA de amostras ambientais em plataformas que geram informação em milhões de pares de bases em corrida única. Nessa abordagem é possível a identificação de táxons microbianos com alta resolução (PHILIPPOT *et al.*, 2013). O princípio da NGS é a geração de sequências curtas abundantes que podem ser montadas em elementos contíguos maiores para sequenciar todo o genoma. A técnica requer material genético de alta qualidade, limpo e concentrado (YOCKTENG *et al.* 2013). Essa metodologia é utilizada para se estimar a diversidade em comunidades complexas, permitindo análise mais robusta dos ambientes estudados. Entretanto, a grande quantidade de dados gerados proporciona grandes desafios, especialmente no que diz respeito à bioinformática (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

Eucalipto

Florestas são o ecossistema terrestre dominante na Terra, cobrindo cerca de 4,03 bilhões de hectares, o que significa aproximadamente 30% da área terrestre total do planeta (PAN *et al.*, 2013). Elas contribuem para a biodiversidade e fornecem inumeráveis bens e serviços ambientais, sendo responsáveis pela sustentação de imensa variedade de indústrias, empregos e renda em todo o mundo (FAO, 2015).

As espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, sendo a madeira do tronco utilizada como matéria-prima para a produção de celulose e madeira, devido à sua rápida taxa de crescimento, à adaptação a várias condições ecológicas e pela boa qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). Nativa da Austrália, a planta está distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais, contando até o momento com cerca de 700 espécies descritas (HUDSON *et al.*, 2015). Em muitos países, é a escolha para geração de bioenergia (BAUHUS *et al.*, 2010).

As espécies de *Eucalyptus* mostram alta diversidade de genes para metabólitos especializados, como terpenos, que atuam como defensivos químicos (MYBURG *et al.*, 2014). Espécies desse gênero apresentam ainda grande

diversidade e altas concentrações de óleos de importância ecológica e médica (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009), e, em razão da grande relevância dessa planta, o genoma de *Eucalyptus grandis* foi recentemente sequenciado (MYBURG *et al.*, 2014). Pela importância econômica que apresentam, as espécies de eucalipto são muito utilizadas em estudos de melhoramento genético (HUDSON *et al.*, 2015).

No Brasil, 72% dos 7,6 milhões de hectares de florestas plantadas são eucalipto e pinus. A maioria dessa área (54,2%) está concentrada na região sudeste, sendo Minas Gerais o estado que mais contribui para essa atividade. A maior concentração dos plantios nas regiões Sul e Sudeste do país é justificada pela localização das principais indústrias de papel e celulose, de painéis de madeira, siderurgia a carvão vegetal e madeira processada mecanicamente (IBA, 2014).

O significado social e econômico do setor florestal em 2013 pode ser avaliado pelo número de empregos gerados, mais de 4,4 milhões, pelos 6,4 bilhões de reais obtidos com os produtos exportados e pela contribuição para o Produto Interno Bruto de cerca de 56 bilhões de reais, além de 8,8 bilhões de dólares em impostos arrecadados (IBA, 2014).

A produtividade das áreas plantadas é garantida com a utilização de fertilizantes, os quais mantêm ou restauram a fertilidade dos solos, aumentando o rendimento e a qualidade das plantas cultivadas. O manejo tem sido progressivamente melhorado para reduzir custos e impactos negativos ao ambiente. O plantio de eucalipto é realizado em áreas onde os solos são ácidos, havendo necessidade de adição de quantidades significativas de nutrientes. Entretanto, essa planta apresenta baixa resposta à adubação nitrogenada (GAMA-RODRIGUES *et al.*, 2005).

A propagação clonal de eucalipto por miniestaquia alia a qualidade da muda à redução dos custos da produção. Com essa metodologia obtém-se melhor desempenho de enraizamento, sistema radicular com maior qualidade, maior velocidade de emissão das raízes e redução das atividades operacionais (HOPPE *et al.*, 2004). Após o enraizamento em casa de vegetação, por cerca de 30 dias, as mudas são transferidas para aclimação em casa de sombra, com 50% de incidência de luz, por um período de aproximadamente 10 dias. Nessa etapa, geralmente as plantas recebem uma dose de fertilizante NPK 5-17-3 de 0,25 g/muda. Após esse período, as plantas sem brotos são colocadas a pleno sol para rustificação, sem a utilização de qualquer defensivo agrícola, a menos que haja incidência de doenças, fato que raramente ocorre. Nessa fase, a umidade deve ser

controlada de acordo com o teor de água do substrato. Posteriormente, as mudas são classificadas de acordo com porte apresentado (pequeno, médio e grande) e preparadas para envio ao plantio, sempre considerando o tamanho médio do lote de mudas (HOPPE *et al.*, 2004).

Comunidades microbianas distintas vivem no interior de raízes, folhas e outras partes da planta. Essas interações proporcionam às plantas acesso a nutrientes e auxílio na supressão de doenças, sendo importantes na agricultura (SMITH, 2014). O estudo das comunidades microbianas pode, portanto, contribuir para compreender sua relação com a adaptabilidade do eucalipto a vários ambientes, com sua sanidade e o desenvolvimento dessa planta.

Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto

Endofíticos estão em interação com várias espécies de plantas e compõem a comunidade microbiana de várias espécies de eucalipto (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Esses micro-organismos têm potencial para reduzir a incidência de doenças (CLARKE *et al.*, 2006) e aumentar a produtividade (PAZ *et al.*, 2012), o que pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

A comunidade e a densidade bacteriana endofítica em eucalipto variam de acordo com o órgão e a localização na planta, a área geográfica do cultivo, as condições ambientais, a espécie e o genótipo da planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). As comunidades endofíticas bacterianas em eucalipto reportadas até o momento são compostas por *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia* e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* em raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010). Essa comunidade distinta pode ser transferida das sementes para as mudas e, quando inoculados em sementes ou em mudas, as características benéficas dos micro-organismos podem ser expressas no hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2008).

Árvores tropicais sustentam grande abundância de fungos endofíticos em suas folhas. Essa comunidade fúngica presente (ARNOLD, 2005) afeta a estrutura e a diversidade dos organismos associados às plantas, além da sua adaptabilidade

e evolução (OMACINI *et al.*, 2001). À semelhança do que ocorre em outras plantas, fungos endofíticos também se associam ao eucalipto, e a diversidade deles nessa planta mostra dominância de Ascomycota (KEMLER *et al.*, 2013). Essa interação parece ser dependente da espécie de planta (LUPO *et al.*, 2001; KHARWAR *et al.*, 2010) e do local do cultivo (FISHER *et al.*, 1993). Muitos deles são antagonistas a diversos patógenos (KHARWAR *et al.*, 2010), pela produção de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (SATHISH *et al.*, 2012). A produção desses compostos por esses micro-organismos pode proporcionar maior capacidade competitiva no interior da planta.

A colonização de fungos endofíticos ocorre mais frequentemente pela penetração das hifas de fungos epifíticos na superfície da planta, seguida pela adaptação ao novo habitat (KHARWAR *et al.*, 2010). Entretanto, nem todos epifíticos podem adentrar a planta, modificar o metabolismo e adaptar-se a esse habitat (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação da comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é geralmente baseada em metodologias dependentes de cultivo (FISHER *et al.*, 1993; LUPO *et al.*, 2001), que subestimam a diversidade desses micro-organismos. Abordagens metagenômicas se fazem necessárias a fim de se elucidar a presença de representantes mais raros presentes nessa comunidade.

Para se compreender como a comunidade microbiana endofítica do eucalipto pode afetar a adaptabilidade a vários ambientes, a sanidade e o desenvolvimento, a avaliação da diversidade de endofíticos é etapa importante. Entretanto, pouco é conhecido sobre esse aspecto em eucalipto, sendo que a maioria dos relatos enfatiza o isolamento desses micro-organismos. Portanto, torna-se necessária a investigação desses micro-organismos em outras partes da planta, bem como em outras áreas de cultivo, e a utilização de metodologia independente de cultivo para melhor elucidar a dinâmica dessa interação.

O sequenciamento de nova geração através das diversas plataformas disponíveis permite a maior cobertura de uma amostra individual. Essa maior cobertura aumenta a possibilidade de detecção de maior número de representantes de filos microbianos, o que é de extrema importância em estudos ecológicos (SIQUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2012). Os avanços das técnicas moleculares como RT-PCR e RNA-Seq (VARGAS *et al.*, 2014) permitem o estudo da expressão de genes envolvidos na fixação de nitrogênio e síntese de hormônios de crescimento vegetal (BRUTO *et al.*, 2014; VARGAS *et al.*, 2014). Com essas técnicas é possível a investigação simultânea do perfil de transcrição de vários genes da planta e do

hospedeiro (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2013). Assim, é possível realizar uma análise detalhada do perfil de genes dos micro-organismos e das modificações que ocorrem na planta em resposta a mudanças ambientais ou a condições impostas (BERTHRONG *et al.*, 2009). Esses avanços, aliados ao estudo da diversidade dos micro-organismos por sequenciamento de genes extraídos de diferentes partes do sistema solo-planta, suportam a ideia de que micro-organismos endofíticos podem ser alternativa para se melhorar a aquisição de nutrientes em plantas importantes, como eucalipto, aumentando a produtividade da planta e sustentabilidade do processo de produção.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. O., VITORINO, A. C. T., MERCANTE, F. M & OLIVARES, F. L. Biological nitrogen fixation by diazotrophic bacteria in association with grasses of economic importance. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 2898-2903, 2014.
- ARNOLD, A. E. 2005. **Diversity and Ecology of fungal endophytes in tropical forests**. Current Trends in Mycological Research (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.
- BACON, C. W & HINTON, D. M. **Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility**. In: GNANAMANICKAM, S. S. 1 ed. Plant-Associated Bacteria. Netherlands: Springer. 2007, p. 155-195.
- BARAC, T., TAGHAVI, S., BORREMANS, B., PROVOOST, A., OEYEN, L., COLPAERT, J. V., VANGRONVELD, J & VAN DER LELIEL, D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water- soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**. v. 22, p. 583–588, 2004.
- BAUHUS, J., VAN DER MEER, P., KANNINEN, M (Ed.). **Ecosystem goods and services from plantation forests**. Routledge, 2010.
- BERTHRONG, S. T., SCHADT, C. W., PINEIRO, G & JACKSON, R. B. Afforestation alters the composition of functional genes in soil and biogeochemical processes in South American grasslands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6240-6248, 2009.
- BOCHNER, B. R. Global phenotypic characterization of bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p.191–205, 2009.
- BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F & SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.
- BRUTO, M., PRIGENT-COMBARET, C., MULLER, D & MOËNNE-LOCCOZ, Y. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-

- promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-10, 2014.
- BULGARELLI, D., SCHLAEPPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.
- CAI, H., ARCHAMBAULT, M & PRESCOTT, J. F. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p. 465–469, 2003.
- CAMILIOS-NETO, D., BONATO, P., WASSEM, R., TADRA-SFEIR, M. Z., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., VALDAMERI, G., DONATTI, L., FAORO, S., WEISS, V. A., CHUBATSU, L. S., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M, Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, v. 15, p. 378, 2014.
- CARVALHO, T. L. G., BALSEMÃO-PIRES, E., SARAIVA, R. M., FERREIRA, P. C. G & HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 2014, p. 1-12, 2014a.
- CARVALHO, T. L. G., PIRES, E., SARAIVA, R., VARGAS, L., BOMFIM, A. C. J., BALLESTEROS, H & HEMERLY, A. S. Nitrogen fixation in grasses-gluconacetobacter activates genes in sugarcane. **BMC Proceedings**, v. 8, p. –20, 2014b.
- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CHEEWANGKON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**. V. 23, p. 55-85, 2009.
- CHI, F., SHEN, S. H., CHENG, H. P., JING, Y. X., YANNI, Y. G., DAZZO, F. B, Ascending migration of endophytic Rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7271-7278, 2005.
- CLARKE, B. B., WHITE JR, J. F., HURLEY, R. H., TORRES, M. S., SUN, S & HUFF, D. R. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. **Plant Disease**, v. 90, p. 994-998, 2006.
- COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT C & AIT BARKA, E. 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, 2005.
- COMPANT, S., CLÉMENT, C & SESSITSCH, A, Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization,

mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

DAVID, V., TERRAT, S., HERZINE, K., CLAISSE, O., ROUSSEAU, S., TOURDOT-MARÉCHAL, R & ALEXANDRE, H. High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 811-821, 2014.

DESHMUKH, S., HÜCKELHOVEN, R., SCHÄFER, P., IMANI, J., SHARMA, M., WEISS, M & KOGEL, K. H. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 18450-18457, 2006.

DESHMUKH, S. K., VEREKAR, S. A & BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-43, 2014.

DÖRR, J., T., HUREK & B. REINHOLD-HUREK. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 7-17, 1998.

DRANCOURT, M., BOLLET, C., CARLIOZ, A., MARTELIN, R., GAYRAL, J. P & RAOULT, D. 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3623–3630, 2000.

ERNST, M., MENDGEN, K. W & WIRSEL, S. G. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 580-587, 2003

FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.

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

FISHER, P. J.; PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, p. 338-345, 1993.

FOUNTS, D. E., TYLER, H. L., DEBOY, R. T., DAUGHERTY, S., REN, Q., BADGER, J. H., DURKIN, A. S., HUOT, H., SHRIVASTAVA, S., KOTHARI, S., DODSON, R. J., MOHAUD, Y., KHOURI, H., ROESCH, L. F. W., KROGFELT, K. A., STRUVE, C., TRIPLETT, E. W & METHE, B. A. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella*

- pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 7, p. 1-18, 2008.
- FRIESEN, M. L., PORTER, S. S., STARK, S. C., VON WETTBERG, E. J., SACHS, J. L. & MARTINEZ-ROMERO, E. Microbially mediated plant functional traits. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 23-46, 2011.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S. & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAMA-RODRIGUES, E. D., BARROS, N. D., GAMA-RODRIGUES, A. D. & SANTOS, G. D. A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 893-901, 2005.
- GAO, X. X., ZHOU, H., XU, D. Y., YU, C. H., CHEN, Y. Q., & QU, L. H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology letters**, v. 249, p. 255-266, 2005.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HARDOIM, P. R., HARDOIM, C. C., VAN OVERBEEK, L. S. & VAN ELSAS, J. D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS One**, v. 7, p. e30438, 2012.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HESHAM, A. E. L., WAMBUI, V., JO, H. O & MAINA, J. M. Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8 S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, p. 37-43, 2014.
- HILL, G. T., MITKOWSKI, A., ALDRICH-WOLFE, L., EMELEA, L. R., JURKONIE, D. D., FICKE, A., MALDONADO-RAMIREZA, S., LYNCHA, S. T & NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 25–36, 2000.
- HOFFMAN, M. T., GUNATILAKA, M. K., WIJERATNE, K., GUNATILAKA, L., & ARNOLD, A. E. Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. **PloS one**, v. 8, p. e73132, 2013.
- HOPPE, J. M., & BRUN, E. (2004). Produção de sementes e mudas florestais. Caderno didático, v.1, 388p.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N: Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**. v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUDSON, C. J., FREEMAN, J. S., MYBURG, A. A., POTTS, B. M & VAILLANCOURT, R. E. Genomic patterns of species diversity and divergence in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, v. 2015, p. 1-15, 2015.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- JACKSON, C. R.; RANDOLPH, K. C.; OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- JANDA, J. M & ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2761–2764, 2007.
- JORGE, T. F., RODRIGUES, J. A., CALDANA, C., SCHMIDT, R., VAN DONGEN, J. T., THOMAS-OATES, J & ANTÓNIO, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: metabolite responses to abiotic stress. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 2015, p. 1-30, 2015.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHAN, A. L., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., JUNG, H. Y., LEE, J. H & LEE, I. J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-14, 2012.
- KHARWAR R. N., GOND S. K., KUMAR A & MISHRA A. A. Comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KIRK, J., BEAUDETE, L., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIROMONOS, J., LEE, H & TREVORS, J. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.

- MAGNANI, G. S., DIDONET, C. M., CRUZ, L. M., PICHETH, C. F., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Journal Genetics and Molecular Research**, v. 9, n.1, p.250-258, 2010.
- MALHOTRA, M & SRIVASTAVA, S. Stree-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 73–80, 2009.
- MIGNARD, J. P & FLANDROIS, S. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 574–581, 2006.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffee canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- MYBURG, A. A., GRATTAPAGLIA, D., TUSKAN, G. A., HELLSTEN, U., HAYES, R. D., GRIMWOOD, J *et al.* The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-362, 2014.
- NAGABHYRU, P., DINKINS, R. D., WOOD, C. L., BACON, C. W., & SCHARDL, C. L. Tall fescue endophyte effects on tolerance to water-deficit stress. **BMC Plant Biology**, v. 13, p.127, 2013.
- NILSSON, R. H., KRISTIANSSON, E., RYBERG, M., HALLENBERG, N., & LARSSON, K. H. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics online**, v. 4, p. 193, 2008.
- NUTARATAT, P., SRISUK, N., ARUNRATTIYAKORN, P & LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-694, 2014.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, p. 78-81, 2001.
- PAIVA, J. A.; PRAT, E.; VAUTRIN, S.; SANTOS, M. D.; SAN-CLEMENTE, H.; BROMMONSCHENKEL, S.; FONSECA, P. G. S.; GRATTAPAGLIA, D.; SONG, X.; AMMIRAJU, J. S. S.; KUDRNA, D. WING, R. A.; FREITAS, A. T.; BERGÈS, H.; PETTENATI, J. G & GRIMA-PETTENATI, J. Advancing *Eucalyptus* genomics: identification and sequencing of lignin biosynthesis

- genes from deep-coverage BAC libraries. **BM Genomics**, v. 12, p. 1-13, 2011.
- PAN, Y., BIRDSEY, R. A., PHILLIPS, O. L & JACKSON, R. B. The structure, distribution, and biomass of the world's forests. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 44, p. 593-622, 2013.
- PAZ, I. C. P., SANTIN, R. C. M., GUIMARÃES, A. M., ROSA, O. P. P., DIAS, A. C. F., QUECINE, M. C & MATSUMURA, A. T. S. *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 11, p. 3711-3720, 2012.
- PHILIPPOT, L., RAAIJMAKERS, J. M., LEMANCEAU, P & VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789-799, 2013.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T, Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, p. 14:435–443, 2011.
- RINCON-FLOREZ, V. A., CARVALHAIS, L. C & SCHENK, P. M. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. **Diversity**, v. 5, p. 581-612, 2013.
- RODRIGUEZ, R. J., WHITE JR, J. F., ARNOLD, A. E & REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 82, p. 314e330, 2009.
- ROSENBLUETH, M & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.
- RYAN, R. P., GERMAINE, K., FRANKS, A., RYAN, D. J & DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SATHISH, L., PAVITHRA, N., & ANANDA, K. Antimicrobial activity and biodegrading enzymes of endophytic fungi from *Eucalyptus*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 2574, 2012.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against

- pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SHIOMI, H. F., SILVA, H. S. A., MELO, I. N. S., NUNES, F. V., BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, n.1, p.32-39, 2006.
- SICILIANO, S. D & GERMIDA, J.J. Biolog analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that *Pseudomonad* inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1717–1723, 1998.
- SIQUEIRA-JÚNIOR, J. F., FOUAD, A. F & RÔCAS, I. N. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, P. 1-15, 2012.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- SMITH, P. A. Foliage Friendships. **Scientific American**, v. 311, n. 2, p. 24-25, 2014.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. “Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards,” **Microbiology Today**, v.33, p. 152-155, 2006.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TAGHAVI, S., DER LELIE, D. V., HOFFMAN, A.; ZHANG, Y. B., WALLA, M. D.; VANGRONVELD, J., NEWMAN, N & MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter sp.* 638. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2010.
- TEMMERMAN, R., HUYS, G & SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.348–359, 2004.
- TUPPAD, D, S & SHISHUPALA, S. Evaluation of endophytic fungi from *Butea monosperma* for antimicrobial and enzyme activity. **Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 4, p. 38-45, 2014.
- TURNER, T. R.; JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.

- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., VOS, P., KERSTERS, K & SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407–438, 1996.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VARGAS, L., SANTA BRÍGIDA, A. B., MOTA FILHO, J. P., DE CARVALHO, T. G., ROJAS, C. A., VANEECHOUTTE, D.; VAN BEL, M.; FARRINELLI, L.; FERREIRA, P. C. G.; VANDEPOELE, K & HEMERLY, A. S. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PloS One**, v. 9, p. e114744, 2014.
- VEGA, F. E., PAVA-RIPOLL, M., POSADA, F & BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal Basic Microbiology**, v 45, p371–380, 2005.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209–216, 2010.
- WHITE, J. F & TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. **Physiologia Plantarum**, v. 138, 440-446, 2010.
- WOO, P. C. Y., LAU, S. K. P., TENG, J. L. L., TSE, H & YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p. 908-934, 2008.
- YOCKTENG, R., ALMEIDA, A. M., YEE, S., ANDRE, T., HILL, C & SPECHT, C. D. A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next-generation sequencing and gene expression analyses. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, p. 1300070, 2013.

CAPÍTULO 2

COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NAS FOLHAS E EXSUDATOS XILEMÁTICOS DE EUCALIPTO

RESUMO

As espécies de eucalipto estão entre as mais cultivadas e mais valorizadas economicamente em todo o mundo. No Brasil, apresentam grande importância ambiental e econômica pela geração de milhares de empregos e por ser alternativa à utilização de madeira de florestas nativas. Em ecossistemas florestais, a parte aérea das plantas é considerada habitat comum para vários micro-organismos, e a família Myrtaceae é fonte relevante de biodiversidade de fungos. Entretanto, muito pouco é conhecido sobre a diversidade e a distribuição da microbiota em folhas e exsudatos xilemáticos em eucalipto. O objetivo desse estudo foi mostrar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade. As folhas e os exsudatos xilemáticos foram coletados no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A diversidade foi obtida empregando-se extração de DNA, amplificação da subunidade rRNA 18S, DGGE e sequenciamento das bandas eluídas. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela localidade das plantas e pela sazonalidade entre as épocas de coleta. Mudanças observadas na distribuição dos grupos filogenéticos encontrados nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos indicam que a composição da comunidade endofítica em eucalipto é dependente da posição das folhas na copa das árvores e do local de cultivo. A análise filogenética mostrou a dominância dos filos Basidiomycota e Ascomycota nos ambientes estudados. Esse é o primeiro relato da presença de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos de uma planta.

Palavras-chave: diversidade, fungos endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

As espécies de eucalipto estão entre as mais utilizadas em florestas plantadas, em razão de suas características de crescimento, adaptabilidade a condições de clima e solo distintos e valor de sua madeira (FAO, 2015). A madeira do eucalipto pode ser utilizada de várias maneiras, incluindo a produção de papel e celulose, de painéis, de madeira processada mecanicamente e na siderurgia a carvão vegetal (IBA, 2013). Além disso, também pode fornecer fonte rentável de lignocelulose para a produção de energia e biocombustíveis avançados (ROCKWOOD *et al.*, 2008). No Brasil, as plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) apresentam crescimento uniforme e alta produção de celulose, características que impulsionaram o crescimento das florestas plantadas a partir da década de 1990 (IGLESIAS-TRABADO & WILSTERMANN, 2008).

As partes aéreas das plantas são habitat comum para vários micro-organismos (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015), sendo a interação com elas importante na manutenção do equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos, dos fluxos de gases e de outros processos determinantes no ecossistema (LINDOW & BRANDL, 2003). Assim, os significados agrônomo e ambiental dos micro-organismos que habitam a parte aérea da planta podem ser expressos na adaptabilidade de populações de plantas e também na qualidade e produtividade das culturas (TURNER *et al.*, 2013). Em escala global, a diversidade de fungos tem se mostrado maior em florestas tropicais, onde a diversidade de plantas terrestres também é maior; porém, a verdadeira escala de diversidade dos endofíticos associados ainda não é bem conhecida (LUO *et al.*, 2014).

Fungos endofíticos estão presentes nas plantas terrestres e são especialmente abundantes e diversos em folhas de várias árvores tropicais. Esses micro-organismos são considerados componentes importantes da biodiversidade em escala global (ARNOLD, 2005). A diversidade de fungos endofíticos na estrutura da comunidade fúngica pode afetar a adaptabilidade e evolução da planta no ambiente em que se encontra (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015).

A caracterização da comunidade microbiana associada às plantas do eucalipto em florestas comerciais brasileiras, além de contribuir para o conhecimento da interação planta-micro-organismo, é de suma importância quando se pretende maximizar a produtividade e o manejo de uma cultura de grande expressão para a economia do país. A maioria dos trabalhos sobre a diversidade de fungos endofíticos têm sido realizados com métodos dependentes de cultivo desses

micro-organismos, o que permite acesso a apenas uma pequena fração dessa diversidade (TORSVIK & OVREAS, 2002). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos e proporcionado novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição e a diversidade da comunidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

As duas áreas de estudo foram as florestas plantadas com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) situadas nos municípios de Catas Altas (Área 1 – Projeto Catas Altas I) e Santa Bárbara (Área 2 – Projeto Serra do Pinho), Minas Gerais, Brasil, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A floresta correspondente a Catas Altas está no sétimo ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1970, e a de Santa Bárbara está no terceiro ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1989. A produtividade média das duas áreas é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos (Tabela 1) e os solos são altamente intemperizados, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o Latossolo Amarelo.

Tabela 1: Georreferenciamento das áreas das florestas plantadas de eucalipto, classe de solo predominante, ano do primeiro plantio e produtividade média da floresta (m³ ha⁻¹)/rotação.

Área/ Projeto	Latitude (w)	Longitude (s)	Altitude (m)	Classe Solo	Implantação/ plantio de eucalipto	Produtividade (m ³ ha ⁻¹)/ rotação
I (Catas Altas)	43° 24' 54"	19° 57' 32"	750	LAd1	1970	340
II (Serra do Pinho)	43° 24' 28"	20° 4' 30"	750	LAW2	1989	340

A vegetação natural dessas áreas era de floresta estacional semidecidual, a qual foi substituída pela cultura do café e por pastagens, respectivamente. Posteriormente, áreas de floresta nativa e extensas áreas de pastagens, em sua maioria compostas por áreas degradadas, foram ocupadas com a cultura do eucalipto (CENIBRA). A idade das plantas à época da amostragem era de 18 meses em Catas Altas (área 1) e de 72 meses em Santa Bárbara (área 2).

Nas duas áreas, o clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão (Tabela 2). As médias de temperaturas máxima, média e mínima nos últimos anos foram de 26,4; 16,9 e 21,6°C, respectivamente, a umidade relativa de 67% e a precipitação e o déficit hídrico de 122,9 e 15,3 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Tabela 2: Histórico de precipitação na região estudada (Catatas Altas/Santa Bárbara).

Ano	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
-----mm ³ -----												
2011	243	123,4	329,5	93,7	21,3	8,9	1,8	1	8,9	231,4	431	664,2
2012	328,3	28,7	166,1	21,8	138,6	16,5	0	5,3	36,8	-	-	-

Amostragem

Após o corte de uma árvore de cada área avaliada, foram coletadas amostras de exsudato xilemático e de folhas em terços equidistantes da copa (superior, médio e inferior). As coletas foram realizadas no início do período chuvoso (outubro de 2011), no período chuvoso (dezembro de 2012) e no período seco (abril de 2012). Cerca de 50 folhas sem sintomas de doenças (150 g) dos terços superior, médio e inferior da parte da copa foram coletadas separadamente. O exsudato xilemático foi coletado após o corte do tronco da árvore em porções de aproximadamente 1 m de comprimento, utilizando motosserra desinfestada em álcool 70%. Após 30 segundos de exsudação, o líquido foi coletado em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL. As amostras foram acondicionadas em caixa contendo gelo para o transporte ao Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. No LEM, as amostras foram estocadas em freezer a - 20°C por cerca de um mês até o processamento.

Descontaminação superficial das folhas de eucalipto

A descontaminação superficial de oito folhas saudáveis provenientes de cada terço das copas das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato ($0,05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, e individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Aliquotas de 100 μL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas e exsudatos xilemáticos

As folhas amostradas de cada terço das copas que se mostraram superficialmente esterilizadas após a incubação em meio R2A foram maceradas em nitrogênio líquido, e o macerado, transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL. Aos eppendorfs contendo as amostras maceradas foram adicionados tampão de extração composto de [(2% (p/v) brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), $1,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,0 e 1g de polivinilpirrolidona e 0,2% (v/v) de β -mercaptoethanol]. As amostras de exsudatos xilemáticos foram inicialmente homogeneizadas em vórtex e uma alíquota de 500 μL transferida para tubos de polipropileno com capacidade para 2 mL. Aos tubos foram adicionados 1000 μL de tampão de extração, 0,5 g de *beads* de 106 μm , 50 μL de SDS 4% (dodecil sulfato de sódio) e 400 μL de fenol-clorofórmio (1:24). A mistura foi submetida a agitação em homogeneizador por 10 min, e colocada em banho-maria a 60°C durante 10 min. Os tubos foram centrifugados a $15000g$, e o sobrenadante, transferido para tubos contendo 400 μL de fenol-clorofórmio, seguindo-se nova centrifugação a $15000g$ por 5 min. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 0,6 volumes de isopropanol, seguindo-se a centrifugação a $15000g$ por 20 min. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% e ressuspenso em 100 μL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram

comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc).

Análise da diversidade de fungos endofíticos

Para se examinar a diversidade de fungos endofíticos de folhas e exsudatos xilemáticos foram utilizadas a DGGE e a estratégia Nested-PCR. Para isso, em uma primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram utilizados para a primeira reação. Os fragmentos gerados foram utilizados como molde para uma segunda PCR, e a região V7-V8 foi amplificada utilizando-se os *primers* FF390 (VAINIO & HANTULA, 2000) e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000), contendo grampo GC incorporado à região *forward* desse oligonucleotídeo.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µM de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 µM do *primer* NS1, 0,16 µmol do *primer* EF3, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72° C e extensão final a 72°C durante 10 min. A segunda PCR foi realizada utilizando-se 1,0 µL da primeira reação como molde e substituição dos *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC. Nessa reação, as condições foram: desnaturação inicial a 94° C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50° C por 1 min, extensão por 1 min a 72° C e extensão final a 72°C durante 10 min.

Os *amplicons* resultantes foram submetidos a DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermophilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo, para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8% (p/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma), em gel com gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ de Tris–HCl, pH 8 e 20 mmol·L⁻¹ de ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ de EDTA,

pH 8,0), 0,09% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina) e 0,7% (p/v) de persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ de ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis foram registradas sob luz UV (300 nm) utilizando um equipamento Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise da comunidade fúngica endofítica, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, eluídas em tubos de polipropileno contendo 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos a 4°C *overnight*. Uma alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1 (sem o grampo GC). Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência foi realizada busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando-se o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença de uma banda correspondente a uma unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de diversidade foram realizadas utilizando-se o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software SigmaPlot 13.0.

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank* utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97% foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S obtidas no NCBI, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados

manualmente e o cálculo para análise filogenética baseada no alinhamento dessas sequências foi feito pelo Método de *Neighbor Joining*. A robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram determinados pela análise de *bootstrap* com 1000 réplicas, e os valores acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

O protocolo de extração de DNA e a amplificação do gene rRNA 18S resultaram em *amplicons* e migração distintos no perfil eletroforético, comprovando a eficiência para acessar a diversidade de fungos endofíticos por DGGE em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2).

O perfil eletroforético na DGGE mostrou bandas mais intensas na mesma posição relativa e número expressivo de UTOs detectadas nas folhas analisadas. A presença de UTOs de menor e maior intensidade é um indicativo de que a Nested-PCR propiciou a resolução necessária às análises de diversidade (Figuras 1 e 2). Os fragmentos de DNAs nas bandas excisadas em diferentes posições do gel da DGGE foram identificados como de membros pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota. Embora outros autores não tenham obtido resultados satisfatórios com a utilização da técnica de excisão de bandas (LIANG *et al.*, 2008), essa estratégia foi bem sucedida no acesso à diversidade de fungos endofíticos de eucalipto no presente trabalho (Figuras 1 e 2).

A análise dos fragmentos do gene rRNA 18S de fungos presentes em folhas e nos exsudatos xilemáticos revelou uma comunidade fúngica distinta, de acordo com as áreas de cultivo. O número e a densidade das bandas de fungos no gel dos exsudatos xilemáticos foram menores em relação aos das folhas, embora nas duas áreas avaliadas, a similaridade delas seja pouco mais de 30% e com o perfil distinto (Figuras 1, 2 e 3). A DGGE permitiu discriminar diferenças entre as comunidades endofíticas em eucalipto cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 2).

Nas folhas de eucalipto coletadas na região de Catas Altas, a análise por UPGMA gerou cinco grupos distintos, sendo o maior valor de similaridade (52,3%) o correspondente à coleta realizada no início do período chuvoso em folhas da parte inferior da copa da árvore (Figura 3A). A maior similaridade encontrada na região de Santa Bárbara foi 55,3%, em período seco, também na parte inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs (23 e 22) nas folhas de eucalipto independe do período de coleta. Outras UTOs exibem flutuações entre os períodos

de coleta, a exemplo da maior incidência de UTOs específicas no período chuvoso em Catas Altas, enquanto na localidade de Santa Bárbara esse fato se deu no período seco (Figura 4).

Os índices de diversidade de Shannon em Catas Altas variaram entre 2,56 a 3,02, e os de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3). Em Santa Bárbara, essa variação foi menor, com índices de diversidade entre 2,09 e 2,4, e de riqueza, entre 7,5 e 11,3 (Tabela 4). Já os índices de Shannon nos exsudatos xilêmáticos variaram entre 1,8 e 2,5, e os de riqueza, entre 6 e 16 (Figura 2).

A comunidade de fungos endofíticos em folhas de eucalipto na região de Catas Altas é distinta com relação à posição das folhas na copa da árvore e entre os períodos chuvoso e seco. Essa distinção indica que a colonização ou a permanência das espécies de fungos é influenciada pela posição das folhas e pela sazonalidade. Nessa área foram identificadas 14 espécies, sendo o maior número delas encontrado no início do período chuvoso (Tabela 5).

A comunidade endofítica das folhas de Santa Bárbara é composta por sete espécies (Tabela 6), que em sua maioria são as mesmas que as encontradas em Catas Altas (Tabela 6). Entretanto, *Anomoloma albolutescens*, *Rhodotarzetta rosea* e *Rizoctonia solani* foram exclusivas de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6).

A posição das folhas e a sazonalidade influenciaram mais a composição da comunidade de fungos endofíticos de Catas Altas que a de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6). Em Catas Altas, a maior prevalência de endofíticos foi encontrada no início do período chuvoso (Tabela 5), e em Santa Bárbara, no período chuvoso (Tabela 6). Nessa área, das espécies fúngicas identificadas por sequenciamento, apenas *Boletus rubropunctus* foi encontrada em mais de um terço da copa da árvore e em mais de uma época de coleta (Tabela 6). Em eucalipto, existem diferenças na colonização e na persistência de fungos endofíticos em relação à sazonalidade (Tabelas 5 e 6).

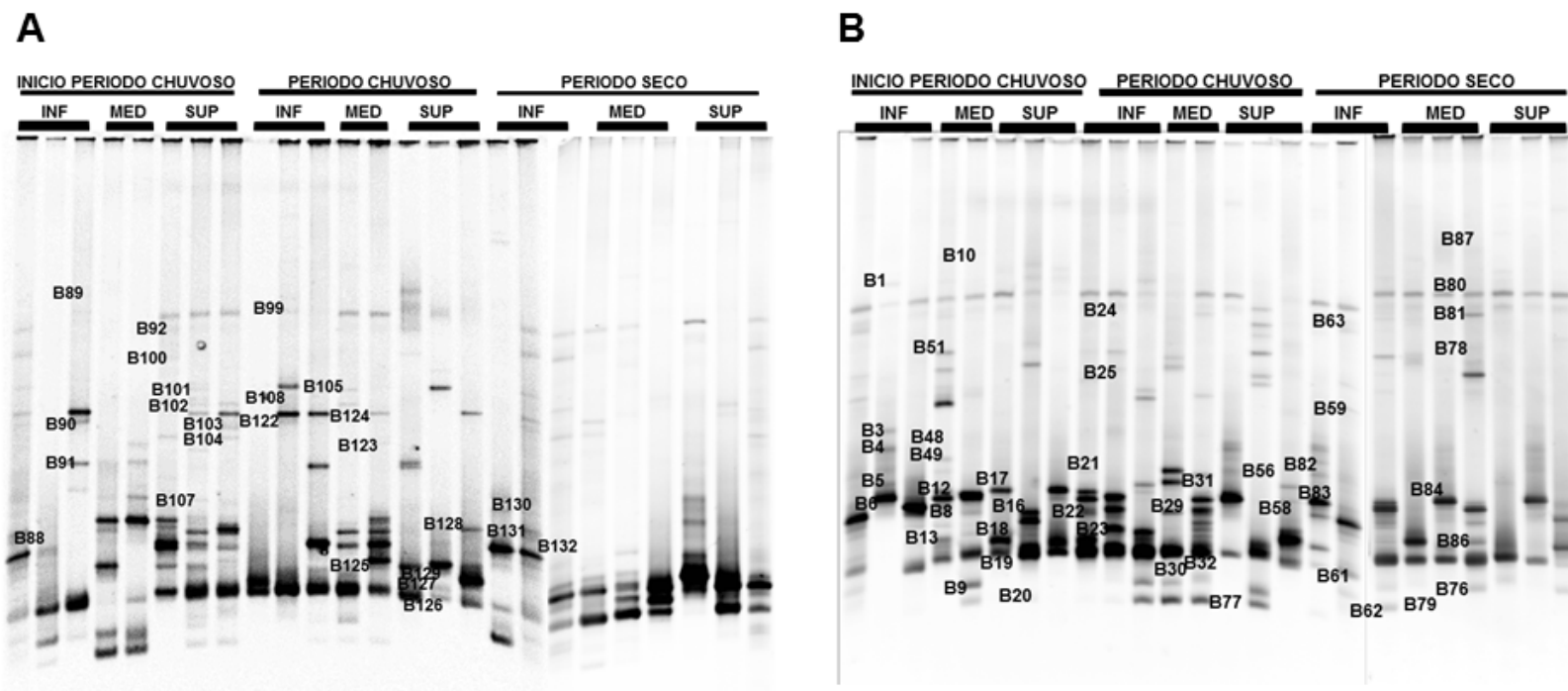


Figura 1: Perfis eletroforéticos de DGGE da comunidade de fungos endófitos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior (em triplicata) da copa das árvores de eucalipto cultivadas em áreas distintas: (A) - Árvores com 18 meses de idade cultivadas no município de Catas Altas, (B) – Árvores com 72 meses de idade cultivadas no município de Santa Bárbara. INF: folhas do terço inferior da copa da árvore; MED: folhas do terço médio da copa da árvore; SUP: folhas do terço superior da copa da árvore. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso; período chuvoso e período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas.

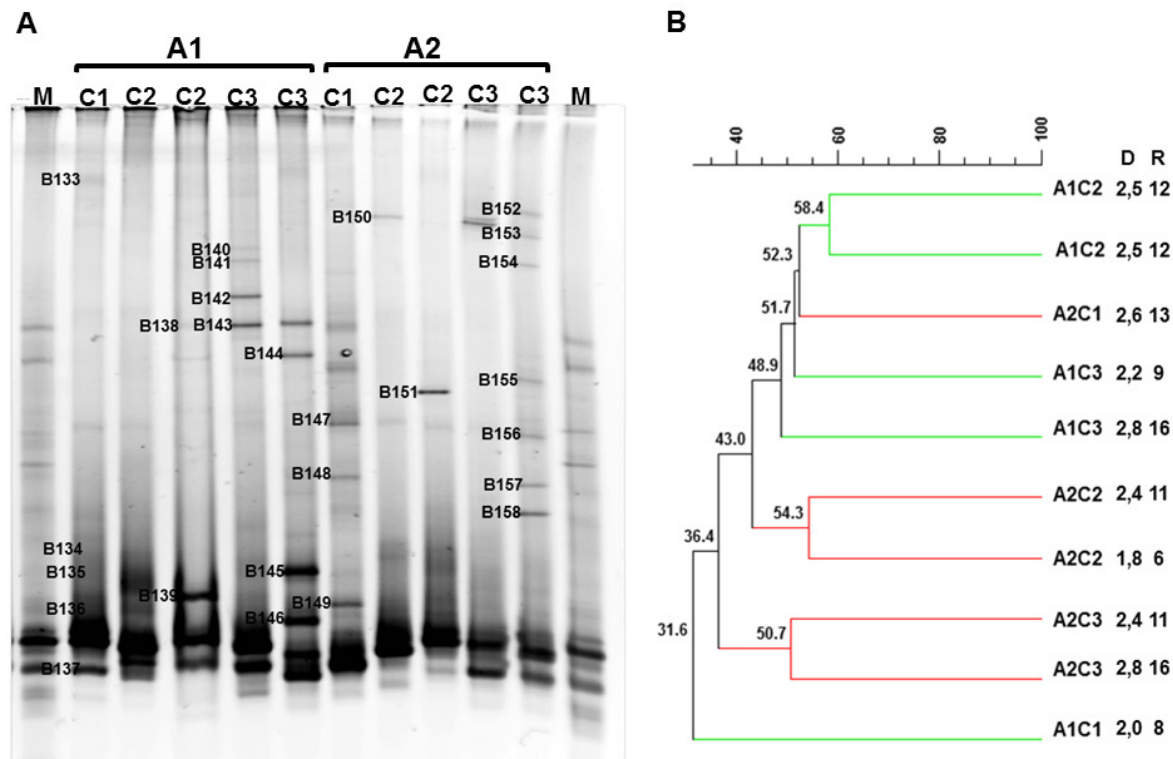


Figura 2: (A) - Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos extraídos dos exsudatos xilemáticos de eucalipto em áreas distintas. A1 - Árvores com 18 meses de idade, cultivadas no município de Catas Altas. A2 – Árvores com 72 meses de idade, cultivadas no município de Santa Bárbara. M: marcador; C1: coleta realizada no início do período chuvoso; C2: coleta realizada no período chuvoso; C3: coleta realizada no período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas. (B) Análise de agrupamento a partir do perfil eletroforético da DGGE e índices de diversidade de Shannon (D) e Riqueza (R) das amostras de exsudatos xilemáticos.

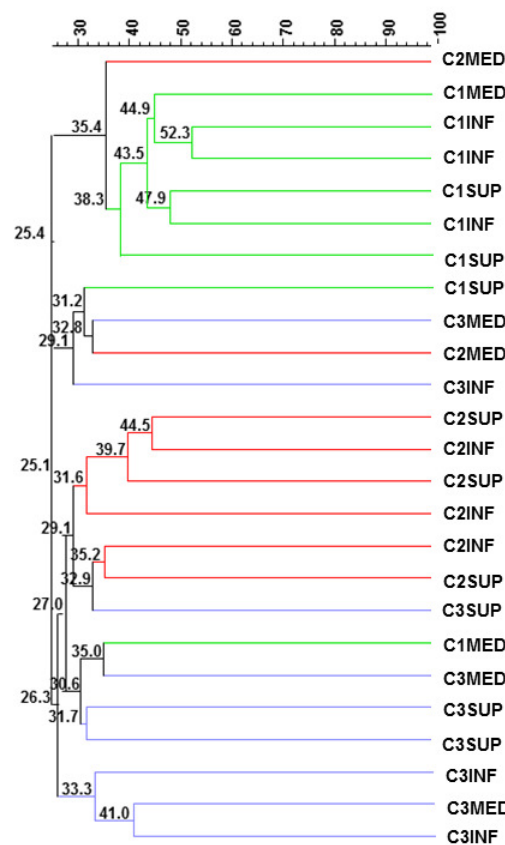
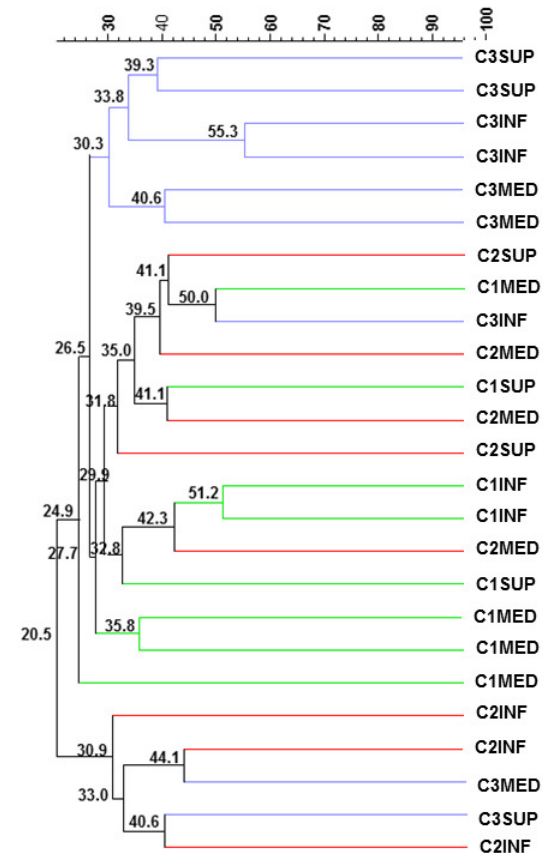
A**B**

Figura 3: Análise de agrupamento e índices de similaridades obtidos a partir do perfil eletroforético da DGGE das amostras de fungos endofíticos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto cultivadas em A - Catas Altas (árvores com 18 meses de idade) e em B - Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade). C1 – Coleta 1 (início do período chuvoso); C2 – Coleta 2 (período chuvoso); C3 – Coleta 3 (período seco). INF – parte inferior da copa; MED – parte média da copa; SUP – parte superior da copa.

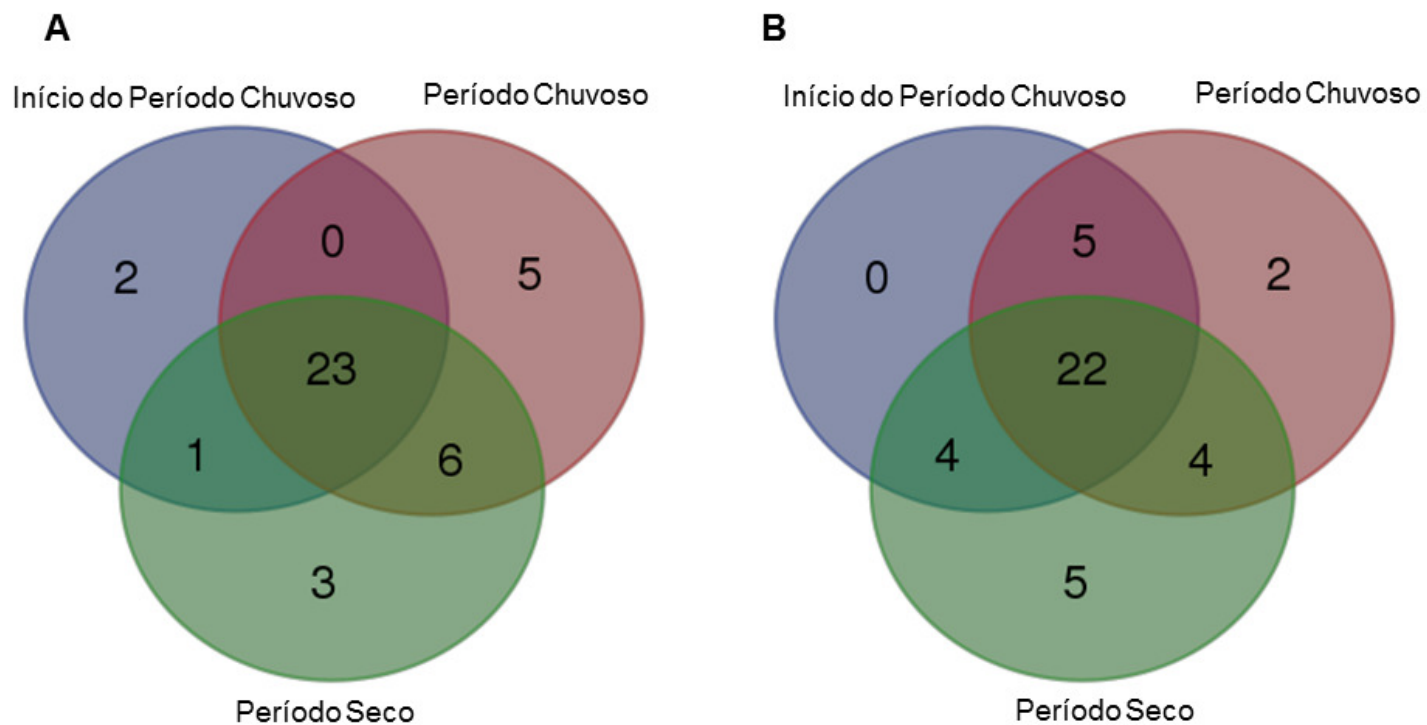


Figura 4: Distribuição de UTOs pelo diagrama de Venn em folhas de eucalipto no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Catas Altas (árvores com 18 meses de idade). B – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade).

O sequenciamento dos *amplicons* a partir das bandas excisadas dos exsudatos xilemáticos mostrou a presença de oito espécies de fungos endofíticos nesse habitat (Tabela 7), sendo que a maioria delas foi identificada em Santa Bárbara. Entre os fungos endofíticos encontrados, apenas um deles, *Fusarium solani*, foi encontrado em folhas provenientes da região de Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* em Santa Bárbara. Entre as espécies encontradas, cinco são exclusivas de Santa Bárbara, uma de Catas Altas e duas são comuns às duas áreas, indicando que a interação endofítica em exsudatos xilemáticos é moldada pela sazonalidade (Tabela 7). Basidiomycota é o filo de fungo que predomina em folhas e exsudatos de eucalipto (Tabelas 5, 6 e 7). Até o momento, esse é o primeiro relato da presença de fungos em exsudatos xilemáticos.

A análise filogenética das sequências revelou que todas pertencem aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 5). A maioria dos agrupamentos formados apresentou valores de *bootstrap* acima de 70, os quais são considerados entre moderados e fortes, o que confere robustez à análise. Em Catas Altas, as bandas 1 (B1), 4 (B4), B8 (B8), 25 (B25), 62 (B62) e 87 (B87) formaram os agrupamentos com maior sustentação filogenética, com *bootstraps* maiores que 80, a maioria deles entre 98 e 100. Esses *bootstraps* são considerados fortes e proporcionaram robustez à análise filogenética.

As UTOs provenientes dos *amplicons* extraídos das bandas excisadas dos géis referentes às folhas coletadas na região de Santa Bárbara formaram os agrupamentos com maiores *bootstraps* para as bandas 99 (B99) e 101 (B101), com *bootstraps* de 97 e 99, respectivamente. As UTOs agruparam com alta sustentação filogenética e formaram dois clados distintos, ambos pertencentes ao filo Ascomycota. A sustentação da árvore filogenética é garantida pelo valor 99 do nó mais externo a ela (Figura 5), embora alguns dos valores de *bootstrap* sejam considerados moderados e baixos.

A análise filogenética para as bandas excisadas a partir de amostras de exsudatos xilemáticos também demonstrou *bootstrap*, em sua maioria, entre moderados a fortes, sustentados filogeneticamente pelo alto valor do nó mais externo. Nos exsudatos, as bandas que apresentaram maiores *bootstraps* foram a 144 (B144) e a 151 (B151) (Figura 5).

Tabela 3: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços superior, médio e inferior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior
Riqueza	17,3	15,5	15,7	13	19,5	15,7	18,3	21	16
Diversidade	2.84	2.73	2.75	2.56	2.89	2.75	2.9	3.02	2.76

Tabela 4: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Média	Superior
Riqueza	11,3	7,5	11	10	9,5	8,7	9,3	9,7	8,3
Diversidade	2,35	2,2	2,4	2,3	2,2	2,15	2,22	2,24	2,09

Tabela 5: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terço inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-Value</i>	Acesso/ NCBI
Início do período chuvoso	Inferior	<i>Laetisaria fuciformis</i>	99	1 e ⁻¹⁵³	AY293139.1
		<i>Trametes versicolor</i>	99	1 e ⁻¹⁴³	KM222266.1
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	99	2 e ⁻¹⁵⁵	JQ698926.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	99	5 e ⁻¹⁴²	HQ832428.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	Médio	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832427.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Acidomyces acidothermus</i>	98	4 e ⁻¹³⁷	JQ172747.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Knufia petricola</i>	98	6 e ⁻¹³⁷	KC988739.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
Período Chuvoso	Inferior	<i>Aspergillus glaucus</i>	100	1 e ⁻¹⁵³	AY083218.1
	Médio	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Marasmius alliaceus</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	NG_013179.1
Período Seco	Inferior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Coniophora puteana</i>	95	48e ⁻¹¹⁵	GU187631.1
		<i>Sistotrema brinkmanni</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	KM232435.1
	Médio	<i>Coniophora puteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Microdochium nivale</i>	95	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Coniophora pauteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1

Tabela 6: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Início do período chuvoso	Médio	<i>Anomoloma albolutescens</i>	97	8e ⁻¹⁴⁵	GU187618.1
		<i>Malassezia restricta</i>	98	1e ⁻⁶⁰	AAYY01000016.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
Período Chuvoso		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
		<i>Rhodotarzetta rósea</i>	97	4e ⁻¹⁴⁷	DQ646550.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
	Superior	<i>Microdochium nivale</i>	97	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Rizoctonia solani</i>	97	1e ⁻¹⁴³	D85644.1
Período Seco	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1

Tabela 7: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S, nos exsudatos xilemáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente.

Coleta	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Catatas altas	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
Santa Bárbara	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Alloclavaria purpurea</i>	99	6e ⁻¹³¹	DQ437679.1
	<i>Wallemia sebi</i>	98	3e ⁻⁸⁰	KM582658.1
	<i>Coniophora puteana</i>	93	3e ⁻¹⁰⁸	GU187631.1
	<i>Boletus rubropunctus</i>	85	4e ⁻⁶²	FJ480426.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
	<i>Teratosphariacea sp.</i>	99	9e ⁻¹³⁴	GU250359.1

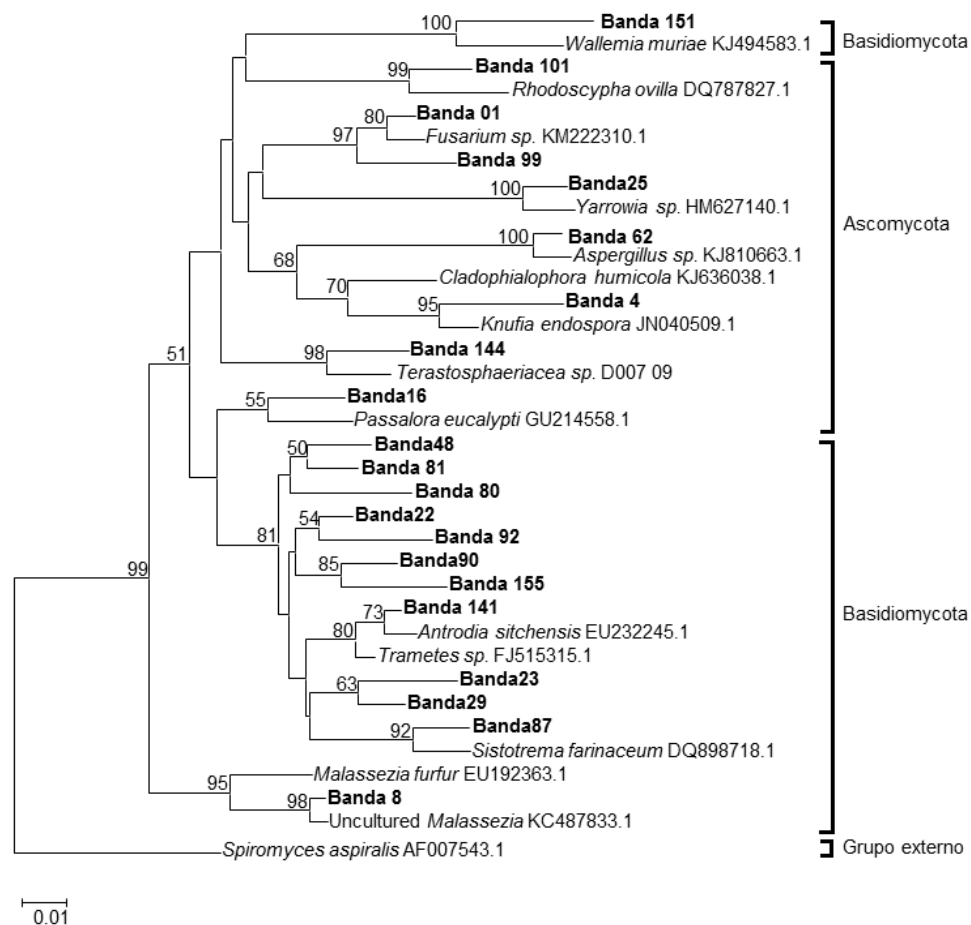


Figura 5: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos identificados em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto com 18 e 72 meses de idade cultivados em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos endofíticos na parte aérea de eucalipto determinada por Nested-PCR e DGGE, ao revelar número expressivo de UTOs, demonstrou ser apropriada para se avaliar a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2). Ressalte-se que esse método foi desenvolvido há mais de 20 anos (MUYZER *et al.*, 1993) e tem sido o de escolha em estudos de diversidade microbiana de vários ambientes, como no solo (BRESOLIN *et al.*, 2010), em plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e em animais (KITTELMANN *et al.*, 2012).

A abordagem Nested-PCR é a recomendada para facilitar a análise por DGGE de diferentes grupos microbianos em comunidades complexas, como, por exemplo, as de frutos de café (OLIVEIRA *et al.*, 2013), uma vez que também revela as populações menos abundantes.

A distribuição dos fungos endofíticos nos cinco grupos distintos gerados pela análise por UPGMA, em que o maior valor de similaridade (52,3%) foi o correspondente à coleta de folhas do terço inferior da copa da árvore no início do período chuvoso na região de Catas Altas. Tal fato indica a existência de mudança na composição da comunidade fúngica endofítica em função da sazonalidade e posição das folhas. Essa mudança é menos acentuada em folhas mais velhas da região de Santa Bárbara onde há menor número de clados distintos (Figura 3B). O maior valor de similaridade encontrado nessa área foi 55,3%, em período seco, no terço inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs nos três períodos de coleta das folhas de eucalipto (23 e 22) é similar; entretanto, existem UTOs específicas, as quais refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos endofíticos. Além disso, também exibem as flutuações dos períodos chuvoso e seco, a exemplo da maior incidência delas no período chuvoso em Catas Altas; ao contrário de Santa Bárbara, onde a maior incidência ocorreu no período seco (Figura 4).

As variações nos índices de diversidade de Shannon em Catas Altas, entre 2,56 a 3,02, e as de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3), e as de Santa Bárbara em que foram menores, com diversidade entre 2,09 a 2,4 e riqueza entre 7,5 a 11,3 (Tabela 4), foram interpretadas como indicativo de que os terços da copa da árvore e a sazonalidade são fatores que modificam a distribuição de UTOs (Figura 4). A diversidade de espécies é medida em termos de riqueza e uniformidade, e o índice mais comum e amplamente utilizado é o de Shannon-Wiener (H'); os valores usualmente encontrados estão entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Em

virtude disso, comunidades mais diversas tendem a apresentar maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2010), o que explica a discrepância encontrada nos índices de diversidade em folhas das localidades de Catas Altas e Santa Bárbara (Tabelas 3 e 4). Portanto, a sazonalidade molda a diversidade de fungos endofíticos em eucalipto, fato que pôde ser observado pela presença de UTOs comuns e específicas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 4 – Tabelas 3 e 4). A sazonalidade também pode de influenciar no ganho, na perda, na latência ou na manutenção de uma dada espécie microbiana na comunidade (Tabelas 3, 4 e 5). Embora o significado funcional dessas mudanças na estrutura da comunidade microbiana em função da sazonalidade não tenha sido demonstrado, alguns relatam que elas são influenciadas por fatores, como o antagonismo entre fungos, e por variáveis abióticas, que podem afetar a planta hospedeira e, assim, moldar a dinâmica da microbiota associada (GHIMIRE *et al.*, 2010).

A colonização endofítica é geralmente influenciada pela ontogenia das folhas (ARNOLD *et al.*, 2003). As variações na diversidade e na abundância observadas neste trabalho podem estar associadas com as propriedades nutricionais e de defesa em cada estágio de desenvolvimento desses órgãos (SANCHEZ-AZOFEIFA *et al.*, 2012). Entretanto, as diferenças na diversidade de fungos endofíticos entre as plantas de Catas Altas (mais juvenis) e as de Santa Bárbara (mais velhas), não podem ser atribuídas somente à idade das plantas. Outras variáveis, a exemplo dos ciclos de cultivo e rotação, dos teores de nutrientes e açúcares nas folhas e de outras características, podem, em conjunto, ter influenciado as diferenças entre os índices de diversidade nas duas áreas (Tabelas 5 e 6). Ciclos de cultivo e de rotação podem interferir na comunidade fúngica do solo (ELLOUZE *et al.*, 2014) e, conseqüentemente, na colonização endofítica, já que muitos dos micro-organismos endofíticos presentes em folhas são originários do solo (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009). Adicionalmente, outros fatores também podem contribuir para as diferenças das comunidades endofíticas, tais como mudanças na fisiologia das folhas e presença de substâncias químicas, a exemplo de compostos fenólicos que podem limitar a riqueza de espécies microbianas. Por serem esses compostos inibidores naturais da colonização fúngica, em especial de representantes do filo Ascomycota, como *Aspergillus* (BANSO & RAI, 2008) e *Fusarium* (KAUR *et al.*, 2011), esses compostos podem ter inibido a presença desses táxons nas plantas mais velhas de Santa Bárbara.

A presença de maior número de UTOs nos terços médio e inferior da copa de plantas da área de Santa Bárbara (Tabela 6) possivelmente resultou de condições abióticas mais favoráveis, como maior umidade e menor incidência de radiação ultravioleta. A quantidade e a qualidade da luz incidente nas folhas, pode ter contribuído para a menor frequência de fungos nos terços superiores da copa bem como para as diferenças observadas entre as árvores de Catas Altas e de Santa Bárbara. Na literatura, há relatos de que as condições de luminosidade podem diminuir a viabilidade de propágulos fúngicos ou causar efeitos deletérios em conídios, especialmente a radiação UV-B (ISAAC, 1995; ARNOLD & HERRE, 2003; POSADAS *et al.*, 2012).

As diferenças na distribuição de fungos endofíticos nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos (Tabelas 5, 6 e 7), pode indicar que a colonização endofítica seja dependente do local ou órgão da planta amostrado. As espécies *Pachylepyrium carbonicola* e *Malassezia restricta* (Tabela 5), presentes em Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* (Tabela 6), observado em Santa Bárbara, podem ocupar diferentes micro-habitats no corpo da planta, indicando comportamento mais generalista (Tabelas 5 e 6). É relatado na literatura que fatores como altitude, umidade, densidade da copa, entre outros fatores, podem influenciar o nível de infecção da planta (QI *et al.*, 2012). O fato de as folhas abrigarem mais espécies fúngicas endofíticas (Tabelas 5 e 6) do que os exsudatos xilemáticos (Tabela 7) pode ser atribuído às diferenças nas barreiras à infecção vigentes nesses dois locais, bem como a capacidade do xilema em selecionar os micro-organismos nesse ambiente (ARNOLD & LUTZONI, 2007).

Os principais colonizadores encontrados nesse estudo (Tabelas 5, 6 e 7) diferem dos encontrados em *Eucalyptus nitens* cultivados na Austrália e Inglaterra (FISHER *et al.*, 1993). Isso pode ser atribuído à espécie da planta e às condições ambientais distintas das do presente trabalho. Além disso, as diferenças encontradas na estrutura da comunidade fúngica endofítica em diferentes espécies de eucalipto podem estar relacionadas à estratégia metodológica utilizada, já que Fisher *et al.* (1993) utilizaram métodos dependente de cultivo. A diversidade de fungos endofíticos nos exsudatos xilemáticos de eucalipto é influenciada pelo local e pela sazonalidade (Tabela 7). Na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre diversidade de fungos em exsudatos xilemáticos de árvores de eucalipto de florestas plantadas. Os exsudatos xilemáticos apresentam compostos nitrogenados e ácidos orgânicos (PFAUTSCH *et al.*, 2009), além de açúcares como sacarose, frutose, glicose, galactose e arabinose em pequenas concentrações

(MATTIELLO *et al.*, 2009). Em razão dessa composição o xilema pode ser considerado como um habitat oligotrófico para o crescimento e desenvolvimento microbiano em várias plantas, incluindo eucalipto (YADETA & THOMMA, 2013).

Os fungos endofíticos mais frequentes observados em eucalipto cultivado em Catas Altas e Santa Bárbara foram *Fusarium solani*, *Malassezia restricta*, *Pachylepyrium carbonicola* e *Boletus rubropunctus* (Tabelas 5 e 6). A alta identidade das sequências obtidas com as do banco de dados do NCBI (Tabelas 5, 6 e 7) foi o critério utilizado para a confirmação dessas espécies como pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (Figura 5). Embora muitas delas sejam patogênicas para algumas plantas, no presente trabalho, mostraram-se como de natureza endofítica. Ressalte-se que a desinfestação da superfície de folhas saudáveis, sem sintomas de infecção, foi comprovada pela ausência de crescimento fúngico em R2A da última água de lavagem. A alta dominância de alguns grupos fúngicos (Tabelas 5, 6 e 7) é uma indicação de que eles possam ter papel relevante na fisiologia da planta. Espécies fúngicas podem produzir ampla variedade de reguladores de crescimento, como giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) e auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012) e também conferir tolerância a fatores bióticos e abióticos adversos (HUBBARD *et al.*, 2014).

Os fungos endofíticos presentes no xilema apresentaram altos *bootstraps* (Figura 5) e similaridade com aqueles que são geralmente encontrados no solo e nas folhas de eucalipto, fato que pode explicar a origem da colonização xilemática. Micro-organismos endofíticos podem colonizar a planta por meio de ferimentos, nos sítios de emergência de raízes laterais (HALLMAN *et al.*, 1997) ou pela liberação de enzimas hidrolíticas (ROBL *et al.*, 2013) que lhes permitem adentrar e colonizar a planta (HALLMAN *et al.*, 1997). Dentro da planta, os exsudatos xilemáticos podem funcionar como meio de transporte para a colonização endofítica, seguindo o fluxo ascendente da seiva do xilema. Tal fato pode explicar a ocorrência de *Fusarium solani* e *Marasmius alliaceus* em folhas e exsudatos xilemáticos de Catas Altas (Figuras 5 e 7) e *Boletus rubropunctus* em folhas e exsudatos de Santa Bárbara (Figuras 6 e 7).

As comunidades fúngicas nas folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto mostraram-se distintas uma da outra. Somente os fungos *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* estavam presentes nas duas comunidades (Tabelas 5, 6 e 7). As espécies de *Fusarium* são relatadas como as mais frequentemente isoladas como endofíticas em plantas tropicais (VEGA *et al.*, 2010). Fungos do gênero *Marasmius* são reconhecidos pela produção de

metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli* (ROSA *et al.*, 2003). Esse grupo já foi descrito como endofítico (NGIENG *et al.*, 2013). Entretanto, na literatura consultada, não foi encontrada relatos de endofitismo para a espécie *Marasmius alliaceus*. O gênero *Boletus* apresenta espécies descritas como endofítica em folhas de *Pinus* sp., (ARNOLD *et al.*, 2007). No entanto, a espécie *Boletus rubropunctus* é relatada aqui como endofítica pela primeira vez.

A presença de *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* nos exsudatos xilemáticos de eucalipto indica que esses micro-organismos podem ser transportados às folhas por meio do fluxo ascendente da seiva do xilema, após adentrarem a planta via raiz. A presença de fungos endofíticos em folhas e exsudatos aqui relatada amplia a compreensão da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de fungos endofíticos nessa importante espécie florestal é etapa importante para o acesso a esse patrimônio genético na busca de metabólitos e processos que possam contribuir para a melhoria no desenvolvimento da planta.

CONCLUSÕES

A DGGE foi eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade.

Os filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica endofítica em eucalipto.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilemáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W.; MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410. 1990.
- ARNOLD, A. E., HENK, D. A., EELLS, R. L., LUTZONI, F., & VILGALYS, R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v. 99, p. 185-206, 2007.

- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, 88, p. 541–549, 2007.
- BANSO, D. S & RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 81-88, 2008.
- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 391-403, 2010.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. (2014). Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- ELLOUZE, W., ESMAEILI TAHERI, A., BAINARD, L. D., YANG, C., BAZGHALEH, N., NAVARRO-BORRELL, A., HANSON, K & HAMEL, C. Soil fungal resources in annual cropping systems and their potential for management. **BioMed Research International**, 2014.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- FISHER, P. J., PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, p. 338-345, 1993.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 19-27, 2011.
- HALLMAN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** v. 4, p. 9, 2001.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUBRRARD, M., GERMIDA, J. J. & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 109-122, 2014.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- IGLESIAS-TRABADO, G & WILSTERMANN, D. *Eucalyptus universalis*. Global cultivated eucalypt forests map, 2008.
- ISAAC, S. Mycology Answers: Old papers, manuscripts and books often develop brown spots and patches; are these caused by fungi?. **Mycologist**, v. 9, n. 3, p. 138-139, 1995.
- KAUR, S., SINGH, H. P., BATISH, D. R & KOHLI, R. K. Chemical characterization and allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*. **Journal of Plant Interactions**. v. 6, p. 297-302, 2011.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) Suitable for Large-Scale Sequence-Based Community Structure Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LIANG, Z., DRIJBER, R. A., LEE, D. J., DWIEKAT, I. M., HARRIS, S. D & WEDIN, D. A. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 956-966, 2008.
- LINDOW, S. E & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875–1883, 2003.
- LUO, J., WALSH, E., NAIK, A., ZHUANG, W., ZHANG, K., CAI, L & ZHANG, N. Temperate pine barrens and tropical rain forests are both rich in undescribed fungi. **PloS One**, v. 9, p. e103753, 2013.
- MATTIELLO, E. M., RUIZ, H. A., SILVA, I. R. D., SARKIS, J. E. S., NEVES, J. C. L & PUCCI, M. M. Phloem mobility of boron in two eucalypt clones. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1695-1704, 2009.
- MAY, L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 829-841, 2001.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C & UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p.695–700, 1993.

- NGIENG, N. S., ZULKHARNAIN, A., ROSLAN, H. A., & HUSAINI, A. Decolourisation of synthetic dyes by endophytic fungal flora isolated from Senduduk plant (*Melastoma malabathricum*). **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PFAUTSCH, S., GESSLER, A., ADAMS, M. A & RENNENBERG, H. Using amino-nitrogen pools and fluxes to identify contributions of understory *Acacia* spp. overstory *Eucalyptus regnans* and stand nitrogen uptake in temperate Australia. **New Phytologist**, v. 183, p. 1097-1113, 2009.
- POSADAS J. B., MARICEL, A. L., MINI J. I & LECUONA R, E. Natural Tolerance to UV-B and Assessment of Photoprotectants in Conidia of Six Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Griv) Vuillemin. **World Applied Sciences Journal**, v. 20, p. 1024-1030, 2012.
- QI, F., JING, T & ZHAN, Y. Characterization of endophytic fungi from *Acer ginnala* Maxim. in an artificial plantation: media effect and tissue-dependent variation. **PLoS ONE**, v. 7, p. 46785-46785, 2012.
- REASONER, D. J & GELDREICH, E. E A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, p. 1-7, 1985.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C., VICENTE, V. A., PRADELLA, J. G. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v.13, p. 1-12, 2013.
- ROCKWOOD, D. L., RUDIE, A. W., RALPH, S. A., ZHU, J. Y & WINANDY, J. E. Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1361-1378, 2008.
- ROSA, L. H., MACHADO, K. M. G., JACOB, C. C., CAPELARI, M., ROSA, C. A., & ZANI, C. L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 967-974, 2003.
- SANCHEZ-AZOFEIFA, A., OKI, Y., FERNANDES, G. W., BALL, R. A & GAMON, J. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees**, v. 26, p. 291–299, 2012.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.

- TORSVIK, V & OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p. 240-245. 2002.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- VEGA, F. E., SIMPKINS, A., AIME, M. C., POSADA, F., PETERSON, S. W., REHNER, A., INFANTE, F., CASTILLO, A & ARNOLD, E. A. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, n. 3, p. 122–138, 2010.
- YADETA, K. A & THOMMA, B. P. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-12, 2013.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 3

FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS ENDOFÍTICOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As folhas do eucalipto sustentam diversidade variável de fungos filamentosos e de leveduras que podem exercer influência na sanidade e no desenvolvimento da planta. Endofíticos interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença. Fungos simbiossiontes podem utilizar açúcares solúveis simples, como glicose e frutose, os quais podem funcionar como principal fonte de carbono para esses micro-organismos. O eucalipto é cultivado em todo o mundo e é a espécie da família Myrtaceae mais amplamente distribuída e utilizada em plantios comerciais. Neste estudo, a diversidade e a distribuição de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos do híbrido eucalipto urograndis foram determinadas e relacionadas à concentração de açúcares em folhas provenientes de plantas em cinco fases de desenvolvimento, incluindo as mudas de viveiro e plantas em campo. O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Foram identificadas: 15 espécies e dois gêneros de fungos e duas espécies e sete gêneros de leveduras. As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a estrutura da comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em folhas. Muitas das espécies identificadas são específicas de determinada fase de desenvolvimento. Os fungos endofíticos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos de folhas de plantas da fase de jardim clonal; *Chaetomella acutisetula* e *Ascotricha chartarum* de folhas da fase de sombreamento; *Erratomyces patellii* e *Saxomyces* sp. de folhas da fase de saída do sombreamento; *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da fase de expedição, e *Mycosphaerella populicola*, das folhas de plantas do campo. As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* são específicas das folhas das fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento, respectivamente. Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar folhas de plantas provenientes de mais de uma fase de desenvolvimento. O fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem em plantas nas fases de expedição e de campo, e o gênero *Candida*, nas de jardim clonal, sombreamento e saída do sombreamento. Neste estudo é apresentada pela primeira vez a presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

Palavras-chave: diversidade, fungos, leveduras, endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

A parte aérea das plantas, especialmente as folhas, é considerada habitat de grande importância agrônômica e ecológica, por hospedar grande diversidade de micro-organismos endofíticos e epifíticos, incluindo fungos e leveduras. Os micro-organismos endofíticos, em particular, já foram encontrados em várias espécies de plantas, sendo importantes componentes da biodiversidade (ARNOLD *et al.*, 2000). *Eucalyptus* spp. são as plantas da família Myrtaceae mais amplamente distribuídas e utilizadas em plantios comerciais em muitos países (FAO, 2015), devido ao seu rápido crescimento, à sua adaptabilidade e ao valor comercial de sua madeira (BROOKER, 2000). A avaliação da diversidade e abundância de fungos filamentosos e de leveduras em eucalipto, com a utilização de metodologia independente de cultivo, reconhecidamente retrata, com maior fidelidade, a complexidade dessas comunidades e suas interações com a planta (KEMLER *et al.*, 2013). Assim, a complexidade da microbiota fúngica endofítica tem sido subestimada até o momento.

As leveduras compreendem o maior grupo de micro-organismos epifíticos em interação com plantas (WHIPPS *et al.*, 2008), enquanto fungos endofíticos são abundantes em folhas assintomáticas de várias árvores tropicais (ARNOLD, 2005). Esses micro-organismos apresentam grande influência sobre a planta, por afetarem a estrutura da comunidade e a diversidade de organismos a ela associados ou a adaptabilidade e evolução do hospedeiro (OMACINI *et al.*, 2001; BRUNDRETT, 2006). Além disso, são fontes de várias enzimas de interesse industrial, como celulasas, xilanases, lacases, pectina liase, hemicelulasas, entre outras, e, por isso, estão entre os micro-organismos de maior interesse para produção de biocompostos industriais (LUMYONG *et al.*, 2002; ROBL *et al.*, 2013).

Endofíticos são organismos que vivem interiormente nos tecidos da planta, não causando sintomas de doenças (ARNOLD *et al.*, 2007), e, em associação com árvores, podem reduzir danos às folhas e as perdas ocasionadas por patógenos (ARNOLD *et al.*, 2003). Apesar de o Brasil ter a maior área de plantio de eucalipto no mundo e da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de fungos nessa planta (CHEEWANGKON *et al.*, 2009; SÁNCHEZ MÁRQUEZ *et al.*, 2011), pouco se conhece sobre a dinâmica das comunidades microbianas endofíticas durante as fases de desenvolvimento da planta em viveiro e no campo. A compreensão do impacto das práticas de produção de mudas em viveiros sobre a estrutura das comunidades microbianas endofíticas é fundamental para a produção de mudas mais saudáveis e resistentes ao transplante para o campo.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de fungos filamentosos e de leveduras endofíticas associados às folhas de eucalipto em fases distintas do desenvolvimento da planta, em viveiros comerciais e em campo, e relacioná-la às concentrações de açúcares foliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Este estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP – etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e a campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato.

Fertilizantes	Doses* (kg/m³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira

(CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é 19° 24' 54", a longitude 42° 25' 56" e a altitude 318 m. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulinitico ou caulinitico-oxídico ou gibbsítico-oxídico, hipoférrico ou mesoférrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente; a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56, 39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Amostragem

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20 °C. Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato (0,05 mmol.L⁻¹), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi

repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspensionado e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspensionado *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Extração de açúcares

As amostras de folhas de eucalipto foram analisadas quanto ao conteúdo de glicose, frutose e sacarose (LISEC *et al.*, 2006) por metodologia adaptada. O extrato das amostras de folhas de cada uma das cinco fases de desenvolvimento

da planta foi preparado por maceração, em almofariz e pistilo, de cerca de 50 a 60 mg de tecido foliar, seguindo-se a transferência do macerado para tubo de polipropileno e adição de 1000 µL de metanol (100%). Essa mistura foi aquecida a 70°C sob agitação de 950 rpm durante 60 min, seguindo-se a centrifugação a 14000g por 10 min. Cerca de 600 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos contendo 500 µL de clorofórmico e 800 µL de água. Após centrifugação a 12000g por 15 min, a fase polar foi coletada (1000 µL), e os açúcares quantificados por ensaios enzimáticos acoplados, pelo aumento da densidade óptica a 340 nm da razão NADP/NADPH⁺H⁺ detectada (Multiscan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As enzimas utilizadas foram glicose 6-fosfato (0,2 mg/mL), hexoquinase (0,2 mg/mL), fosfoglicose isomerase (0,2 mg/mL) e invertase (1 mg/mL). Sucessivamente, essas enzimas foram adicionadas ao extrato de folhas e as concentrações de glicose, frutose e sacarose expressas em mmol/kg de massa seca. A concentração de sacarose foi estimada como correspondente à metade da concentração de hexose. As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise da diversidade de fungos e leveduras

A diversidade de fungos e de leveduras em folhas de eucalipto foi examinada por DGGE, e a estratégia Nested-PCR foi utilizada. Na primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos e dos domínios D1-D2 de rRNA 26S de leveduras. Os oligonucleotídeos iniciadores NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram os utilizados para amplificação de fungos, e o NL1 (COCOLIN *et al.* 2000) e NL4 (PRAKITCHAIWATTANA *et al.*, 2004), para leveduras. Os fragmentos específicos gerados foram utilizados como molde para segunda PCR, sendo a região V7-V8 amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000) para amplificação de fungos e NL1GC e LS2 (COCOLIN *et al.* 2000) para leveduras. Esses oligonucleotídeos continham grampo GC incorporado à região *forward*.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µmol de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mmol de cloreto de magnésio, 0,16 µmol dos *primers* NS1, EF3, NL1 e NL4, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações para fungos foram realizadas sob as seguintes

condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72°C e extensão final durante 10 min a 72°C. Para a amplificação dos *amplicons* das leveduras a temperatura inicial foi de 95°C e a de anelamento 52°C. A segunda PCR foi realizada com 1,0 µL da primeira como molde, e substituição do *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC e NL1 e NL4 por NL1GC e LS2. Os *amplicons* de fungos filamentosos foram amplificados em desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min, extensão por 1 min a 72°C e extensão final a 72°C durante 10 min. Com os *amplicons* de leveduras, a desnaturação inicial foi a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, 52°C e 72°C durante 2 min para anelamento e extensão, e, extensão final a 72°C por 7 min.

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após a Nested-PCR foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermo-lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização das bandas dos géis com utilização do software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (m/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09 % (v/v) TEMED (N,N,N=,N=tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% (fungos filamentosos) e 40%-60% (leveduras) ureia/formamida [(100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida)]. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis obtidos por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, os *amplicons* eluídos em 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos *over night* a 4°C. Uma

alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência dos fungos filamentosos e das leveduras foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos filamentosos e de leveduras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e a ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software Sigma plot (Systat Software, Inc. 2008). Foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificar a correlação entre os teores de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e os índices de riqueza e diversidade a 5% de probabilidade (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S ou 26S, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética foi baseado no alinhamento dessas sequências, utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram realizados por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a estrutura da comunidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em fases distintas de desenvolvimento das plantas foram examinadas por DGGE e sequenciamento do rRNA 18S e 26S. O protocolo de extração de DNA e a amplificação dos genes rRNA 18S e 26S foram eficientes para acessar a diversidade dessas comunidades endofíticas em folhas de eucalipto (Figura 1).

A análise por DGGE mostrou que o número de táxons representados pelas UTOs, é afetado pelas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2), indicando mudança na comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em interação com a planta. O padrão obtido pelos *primers* proporcionou a observação de bandas mais e menos intensas no perfil eletroforético (Figuras 1 e 2), permitindo a análise de populações de maior e menor abundância.

O perfil da comunidade de leveduras mostrou maior complexidade (Figura 2) e homogeneidade nas diferentes amostras em comparação ao perfil de fungos (Figura 1), evidente pelo maior número de UTOs e pela maior riqueza e diversidade (Figuras 4 e 5).

A análise de agrupamento hierárquico por UPGMA revelou que os padrões dos perfis entre as etapas de cultivo foram diferentes (Figura 1B e 2B). Os resultados da análise de agrupamento indicam a formação de grupos distintos que compartilham entre 25% (Figura 1) e 35% (Figura 2) de similaridade e subgrupos mais similares que tendem a agruparem juntos. As folhas das plantas oriundas do jardim clonal e das plantas recém-saídas do sombreamento apresentaram composição da comunidade fúngica similar, e as do sombreamento e expedição formaram pelo menos um clado com 43,9% e 64,2% de similaridade (Figura 1). À exceção do subgrupo das folhas em sombreamento, em todas as fases de desenvolvimento das plantas, a comunidade de leveduras foi similar, alcançando valores de mais de 87% de similaridade no jardim clonal (Figura 2).

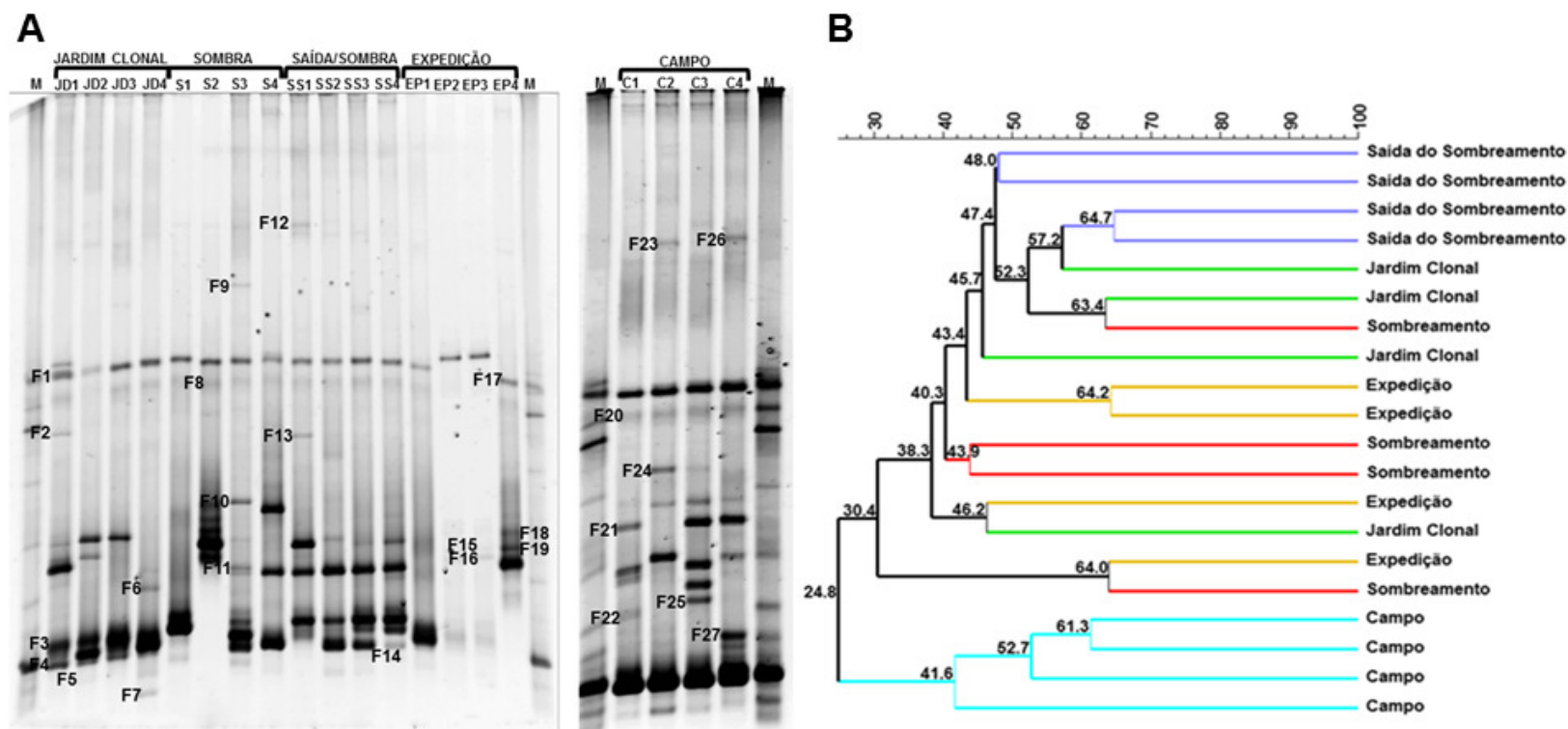


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos durante as fases de desenvolvimento do eucalypto. A – Gel a partir da DGGE. As letras F seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalypto em quatro repetições.

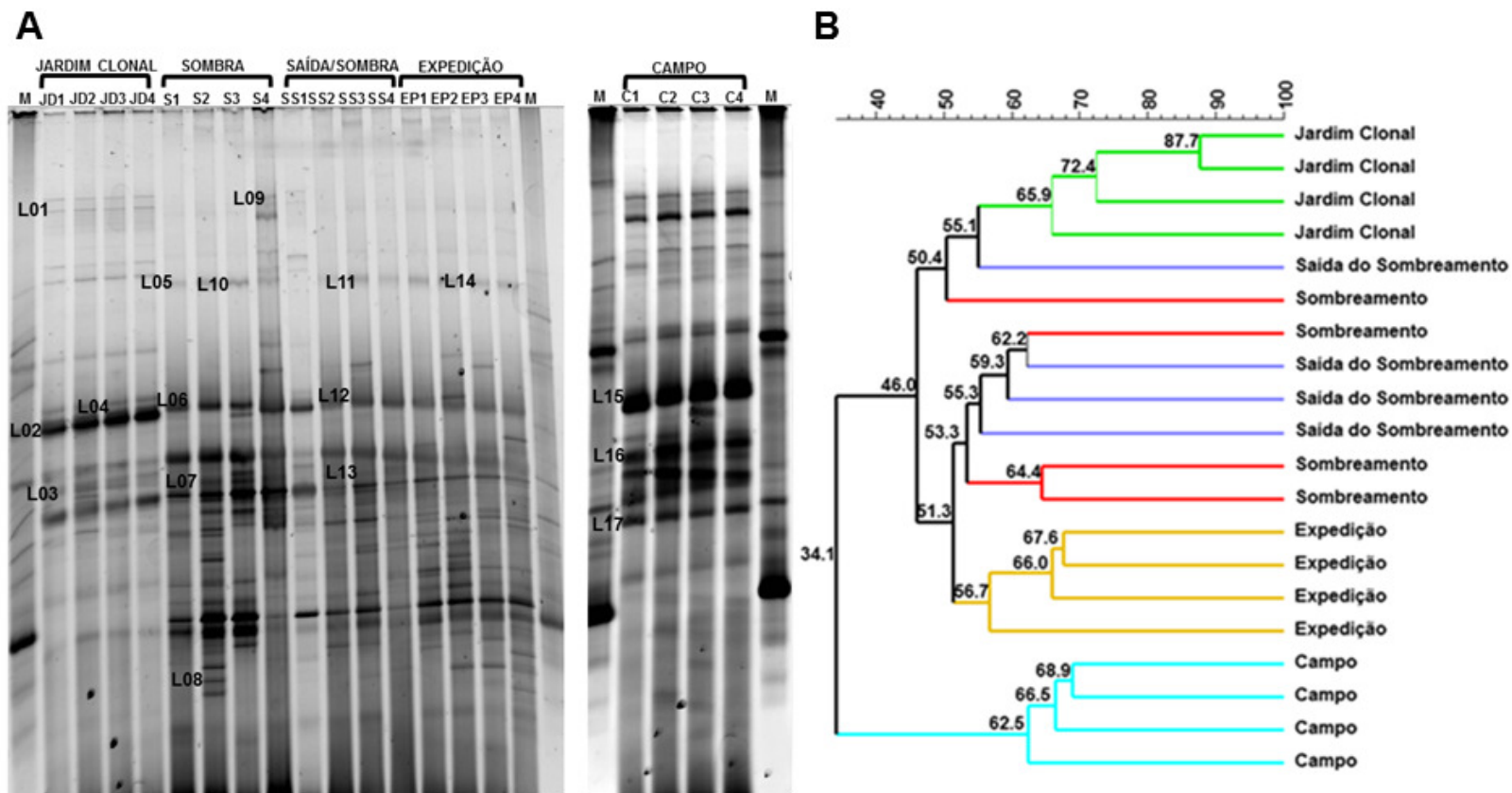


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de leveduras endofíticas durante as fases de desenvolvimento do eucalipto. A – Gel a partir da DGGE. As letras L seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalipto em quatro repetições.

Embora a maioria das UTOs (8 e 10) seja comum entre as fases de desenvolvimento das plantas, existem UTOs específicas para cada uma delas, refletindo diferenças na estrutura das comunidades de fungos filamentosos e leveduras. A maior incidência de UTOs específicas de fungos ocorreu nas folhas provenientes do campo, enquanto para leveduras isso ocorreu nas folhas da expedição e campo (Figura 3). Mesmo sendo pequenas, essas mudanças mostraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto modulam a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, fato mais evidente para as leveduras.

A diversidade e a riqueza de fungos endofíticos não foram influenciadas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 4), diferentemente do observado para as leveduras que apresentaram maiores médias desses índices nas amostras das plantas em expedição (Figura 5). As folhas do jardim clonal foram as que mostraram os menores índices de diversidade e de riqueza de leveduras (Figura 5).

A concentração de glicose e frutose variou em relação às folhas provenientes das fases de desenvolvimento das mudas e no campo, enquanto os teores de sacarose foram mais próximos. As maiores concentrações de glicose e frutose foram encontradas nas folhas das plantas em expedição e no campo, enquanto as de sacarose somente em campo ($p\text{-valor} < 0,05$) (Figura 6). Entretanto, as correlações entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de riqueza e diversidade de Shannon foram moderadamente negativas ($-0,8 < r \leq -0,5$) ($p\text{-valor} > 0,05$).

A identificação das UTOs foi realizada pela excisão das bandas do gel da DGGE, sequenciamento do rRNA 18S e 26S e comparação das sequências obtidas pelo algoritmo BLASTn (NCBI). O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Dentro desses filos, foram identificadas 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos (Figura 7) e duas espécies e sete gêneros de leveduras (Figura 8), em plantas de diferentes idades, em viveiro e em campo.

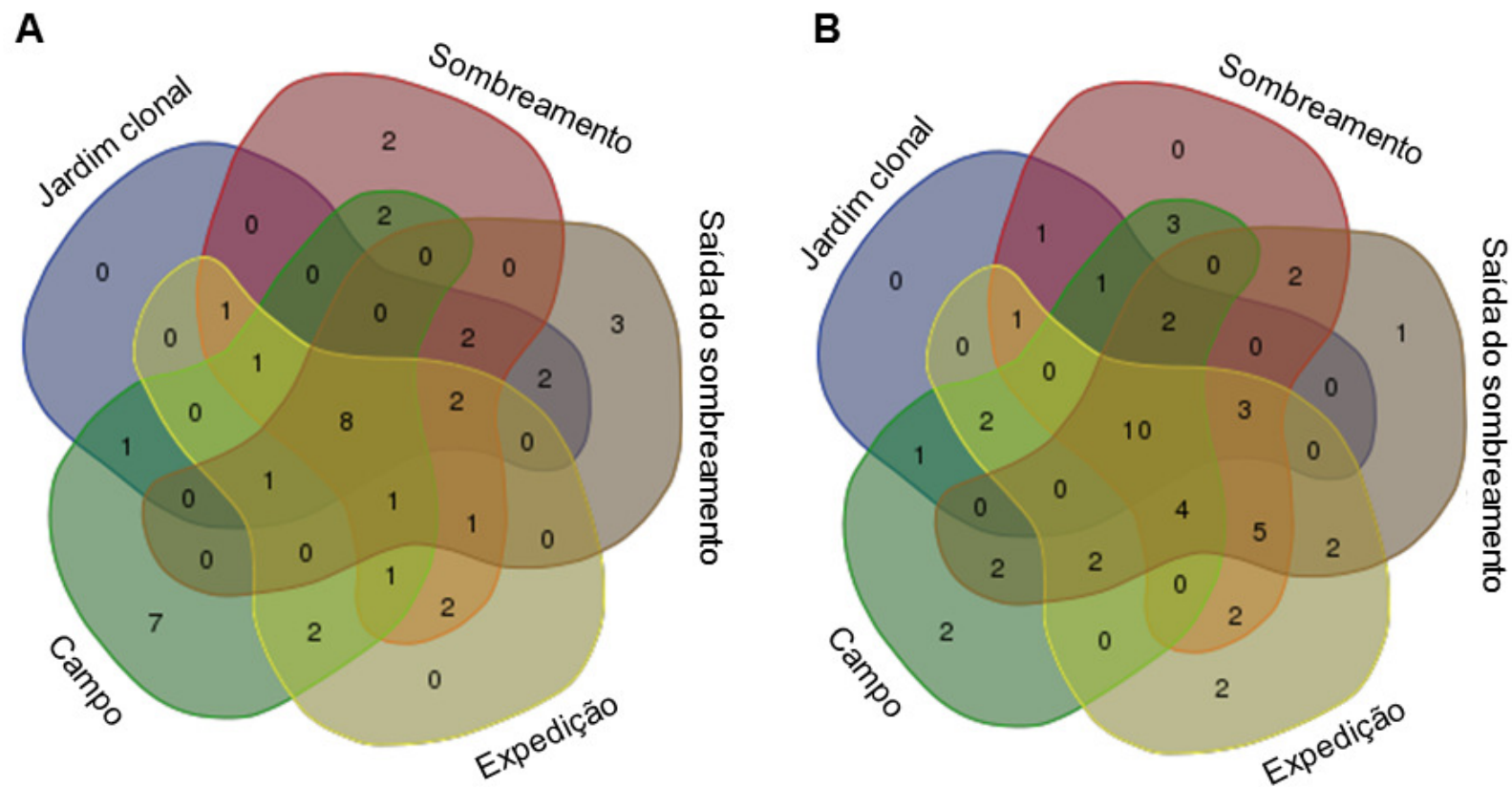


Figura 3: Distribuição de UTOs de fungos (A) e de leveduras (B) pelo diagrama de venn em diferentes etapas de desenvolvimento das folhas de eucalipto: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo.

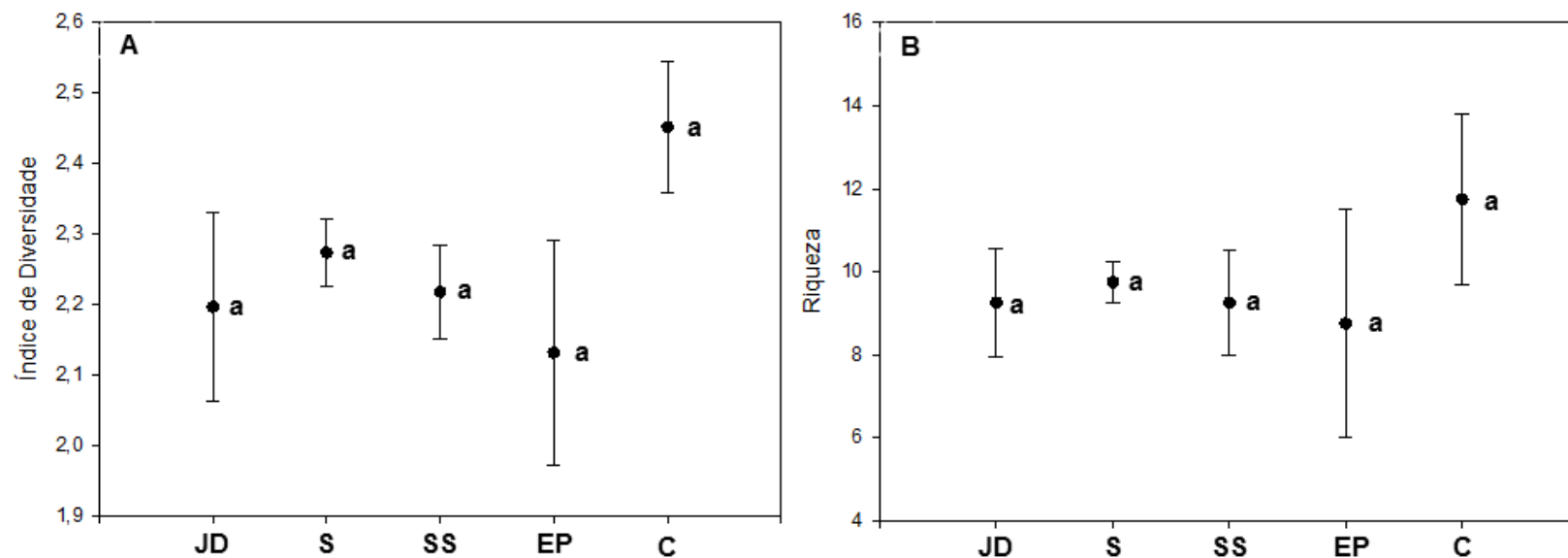


Figura 4: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de fungos endofíticos em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

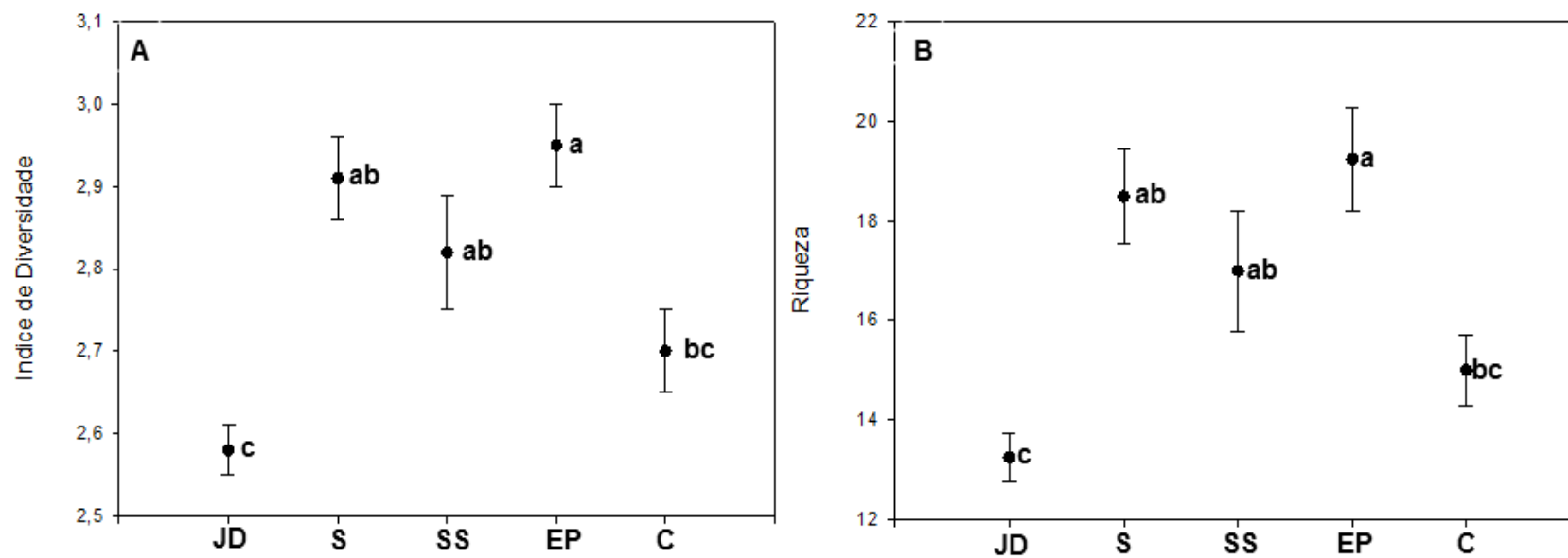


Figura 5: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de leveduras endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

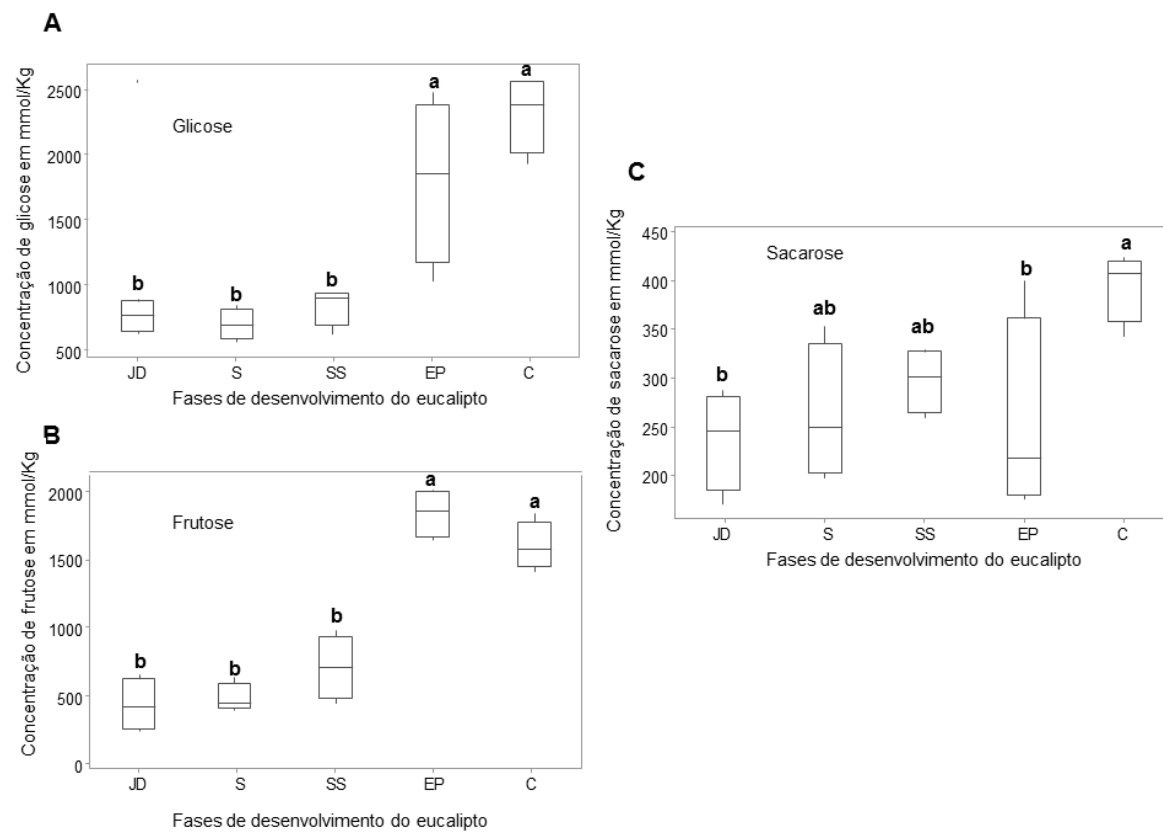


Figura 6: Boxplots mostrando as concentrações de açúcares (glicose, frutose e sacarose) em mmol/kg de folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. (A): glicose (B): frutose e (C): sacarose. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação entre fungos endofíticos e eucalipto é dependente das fases de desenvolvimento da planta, pois a maioria das espécies é fase-específica (Tabela 2). Entretanto, *Cladosporium* sp. e *Teratosphaeria acidotherma*, se mostraram presentes em mais de uma etapa (Tabela 2). Essas diferenças na colonização endofítica em folhas de eucalipto podem indicar a presença de condições mais favoráveis ao estabelecimento de determinadas espécies em dado momento. O menor número de fungos endofíticos identificados pelo sequenciamento do rRNA 18S foram provenientes das plantas sombreadas, todas elas específicas dessa fase de desenvolvimento (Tabela 2).

A comunidade de leveduras em interação com o eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento das plantas foi acessada pela primeira vez em eucalipto e, à semelhança do que ocorre em *Coffea arabica* (MASOUD *et al.*, 2004), é composta por muitos representantes de poucas espécies ou gêneros, distribuídas nos filos Ascomycota e Basidiomycota. A maioria das UTOs sequenciadas foi identificada em nível de gênero por apresentarem identidades abaixo de 97% com as sequências do banco de dados NCBI (Tabela 3). Entretanto, os representantes do filo Basidiomycota *Rhodospodium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* apresentaram identidades de 99 e 98%, respectivamente, valores esses que possibilitaram a identificação em nível de espécie. Essas leveduras são específicas das fases de expedição e campo (Tabela 3). Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em folhas de eucalipto. As leveduras endofíticas identificadas em interação com eucalipto mostraram ser dependentes da fase de desenvolvimento em associação com a planta. Tanto fungos quanto leveduras não são persistentes durante o desenvolvimento do eucalipto.

A análise filogenética das sequências de rRNA 18S revelou que a comunidade de fungos endofíticos presente nas folhas de eucalipto pertence aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), valores que suportam a análise (Figura 7).

Tabela 2: Distribuição das espécies/gêneros de fungos endofíticos identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade	Acesso/NCBI	Banda	Filo
			(%)			
Jardim Clonal (JD)	<i>Diplomitoporus crustulinus</i>	9 e ⁻¹³⁸	99	AY336770.1	B10	Basidiomycota
	<i>Podosphaera tridactyla</i>	5 e ⁻¹³⁵	99	AB022392.1	B07	Ascomycota
	<i>Aspergillus restrictus</i>	2 e ⁻¹³⁸	99	AB008407.1	B11	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Ascotricha chartarum</i>	6 e ⁻¹⁵⁵	99	AB048283.1	B12	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	3 e ⁻¹³³	99	AY544728.1	B13	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹³⁰	98	AB537894.1	B14	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	7 e ⁻⁹⁹	91	AY544728.1	B15	Ascomycota
Saída do Sombreamento (SS)	<i>Erratomyces patelii</i>	2 e ⁻¹⁰⁸	96	DQ663693.1	B17	Basidiomycota
	<i>Saxomyces</i> sp.	1 e ⁻¹¹⁶	98	KC315864.1	B20	Ascomycota
Expedição (EP)	<i>Lepidostroma</i> sp.	6 e ⁻⁴⁰	99	AB767250.1	B21	Basidiomycota
	<i>Schizophyllum radiatum</i>	5 e ⁻¹¹¹	95	AY705952.1	B22	Basidiomycota
	<i>Mycosphaerella lateralis</i>	7 e ⁻¹³⁹	99	GU214531.1	B25	Ascomycota
	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B26	Ascomycota
Campo (C)	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B27	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹⁰¹	92	AB537895.1	B29	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	3 e ⁻¹³²	99	AB537895.1	B30	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	98	GU214618.1	B33	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	99	GU214618.1	B34	Ascomycota
	<i>Mycosphaerella populicola</i>	8 e ⁻⁹³	92	EU167578.1	B39	Ascomycota

Tabela 3: Distribuição das espécies/gêneros de leveduras endofíticas identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade (%)	Acesso/NCBI	Banda	Filo
Jardim Clonal (JD)	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L01	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	80	EU585764.1	L02	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L03	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	90	EU585764.1	L04	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L05	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L06	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L07	Ascomycota
	<i>Saturnispora</i> sp.	4e ⁻⁰⁹	95	KC832478.1	L08	Ascomycota
	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L09	Ascomycota
	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L10	Ascomycota
Saída da Sombreamento (SS)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L11	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L12	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L13	Ascomycota
	<i>Malassezia obtusa</i>	6e ⁻⁹⁶	91	EU192365.1	B18	Basidiomycota
	<i>Bensingtonia ingoldii</i>	2e ⁻¹⁰⁶	93	D38234.1	B19	Basidiomycota
Expedição (EP)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L14	Ascomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B23	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B24	Basidiomycota
Campo (C)	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L15	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L16	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L17	Ascomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B28	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B31	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	8e ⁻¹³⁸	99	AB073272.1	B32	Basidiomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B37	Basidiomycota

Entre os Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Pedospaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. A UTO B10 agrupou com os dois fungos do gênero *Diplomitoporus*, a B17 agrupou com as espécies *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com *Cortinarius*, todos confirmados como Basidiomycota com altos *bootstraps* (Figura 7).

A amplificação e análise de sequências do gene rRNA 18S e 26S revelou que as UTOs estão relacionadas a leveduras pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota, com agrupamentos de alta sustentação filogenética (Figura 8). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram altos *bootstraps* com valores de 99 e 100. Os melhores agrupamentos formados entre os Basidiomycota foram os das bandas 23 e 28, com as espécies *Rhodosporidium toruloides* e *Rhodotorula glutinis* e as do gênero *Aureobasidium* (Figura 8). As leveduras ascomicéticas, por sua vez, mostraram agrupamentos fortes entre si, com os altos *bootstraps* dos nós mais externos, confirmando a proximidade filogenética entre elas e as do banco de dados NCBI (Figura 8).

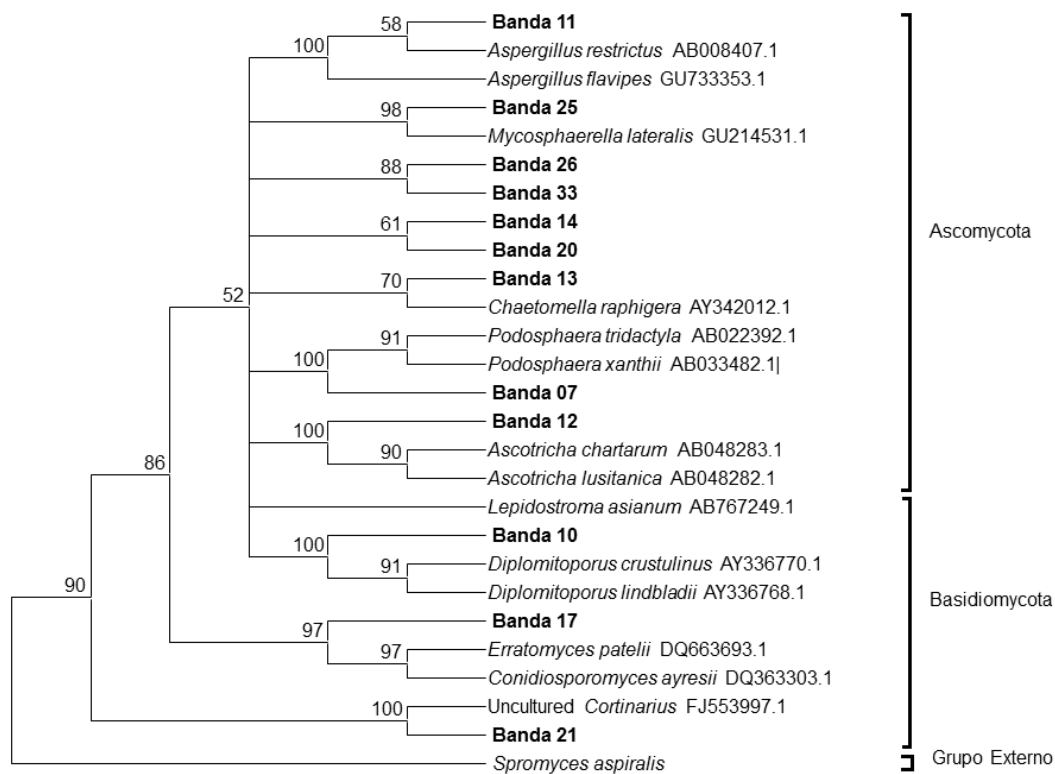


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces aspiralis* foi utilizado como grupo externo.

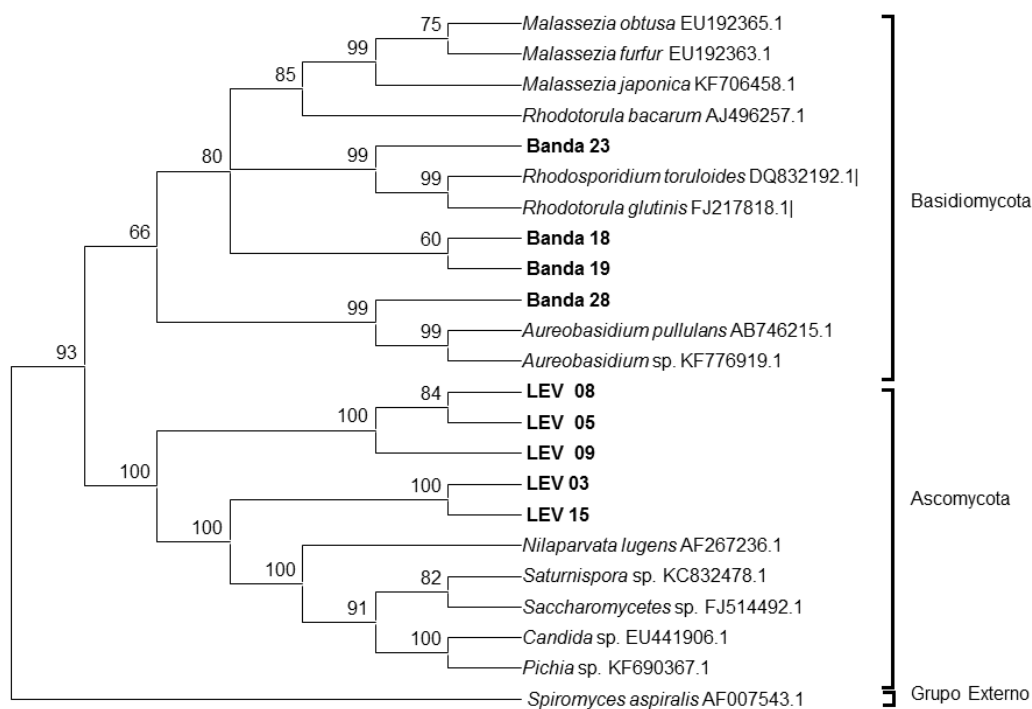


Figura 8: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências dos genes rRNA 18S e 26S de leveduras encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces spiralis* foi utilizado como grupo externo.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos e de leveduras endofíticos acessada por DGGE mostrou a presença de UTOs mais e menos intensas no gel, representando populações com abundância distinta (Figuras 1 e 2). Essa técnica é a escolha para avaliação da diversidade microbiana em vários ambientes (BRESOLIN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; KITTELMANN *et al.*, 2012), o que inclui as folhas de eucalipto (Figura 1 e 2). Essa análise mostrou-se mais robusta quando realizada em conjunto com a abordagem Nested-PCR (Figuras 1 e 2) e permite a análise de comunidades microbianas complexas (OLIVEIRA *et al.*, 2013), proporcionando boa resolução de populações menos abundantes.

Nested-PCR-DGGE mostrou ser eficiente em diferenciar a estrutura das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2). As mudanças foram mais acentuadas na composição da comunidade de leveduras pela formação de clados mais distintos, com UTOs mais similares em um mesmo agrupamento (Figuras 1 e 2). Essas UTOs, em sua maioria, são compartilhadas entre todas as fases de desenvolvimento (8 e 10). Entretanto, mesmo sendo poucas, as UTOs específicas refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos e de leveduras (Figura 3) e demonstram que essas comunidades são modeladas pelo desenvolvimento da planta, fato mais acentuado em leveduras (Figura 3).

Enquanto a comunidade de fungos endofíticos não apresenta diferenças significativas na diversidade e na riqueza (Figura 4), a de leveduras mostrou as melhores médias desses índices nas plantas em expedição (Figura 5). Leveduras apresentam sistema de transporte de glicose altamente regulado, podendo absorver eficazmente a glicose em várias concentrações, pela presença de transportadores de alta e baixa afinidade (BARNETT, 2008). Tal fato pode explicar os maiores índices de diversidade e riqueza encontrados (Figura 5). Os valores de riqueza e de diversidade encontrados nesse estudo estão entre aqueles mais comumente encontrados na literatura, entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Mesmo não existindo diferenças significativas nos índices de diversidade e riqueza de espécies de fungos (Figura 4), observou-se a existência de padrões distintos de colonização desses micro-organismos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 3 e Tabela 2).

A Comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é composta por vários gêneros ao longo das etapas estudadas (Tabela 2), e a de leveduras, por menor quantidade de gêneros e espécies (Tabela 3). Portanto, as folhas dessa planta são

habitat que suportam maior comunidade de fungos em relação à de leveduras. Entretanto, ambas sofrem alterações significativas ao longo do desenvolvimento da planta. Representantes da família Myrtaceae são considerados fonte importante de biodiversidade de fungos, sendo que a maior parte desses fungos está associado às folhas de *Corymbia*, *Eucalyptus* e *Syzygium* spp. (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). As espécies fúngicas em associação com eucalipto relatadas no presente trabalho (Tabela 2) são distintas daquelas descritas na Austrália, Nova Zelândia, Madagáscar e Tailândia (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). Isso indica que essa interação planta-micro-organismo é dependente da espécie de planta em associação, da área de cultivo e da idade da planta associada.

A interação fungo endofítico-planta foi também relatada em outras famílias de plantas como Malvaceae, Cecropiaceae, Lauraceae, Fabaceae, Lecythidaceae e Celastraceae (CANNON & SIMMONS, 2002). Especificamente, no caso de eucalipto, a maioria dos trabalhos publicados até o momento priorizaram os métodos dependentes de cultivo (LUPO *et al.*, 2001; CHEEWANGKOON *et al.*, 2009; KHARWAR *et al.*, 2010), os quais subestimam a diversidade e abundância desses micro-organismos. Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

O grande número de UTOs obtidas pelas sequências analisadas por sequenciamento do rRNA 18S e 26S pode ser considerado como indicativo de alto nível de riqueza e diversidade microbiana, considerando-se que o estudo foi realizado com uma única espécie de planta. As fases em expedição e a campo foram as que apresentaram o maior número de fungos e de leveduras distintos (Tabelas 2 e 3). Açúcares solúveis simples, como a glicose e a frutose, podem funcionar como fonte principal de carbono para fungos simbiotes de plantas (BAGO *et al.*, 2000; CHAMBERGO *et al.*, 2002). Além disso, os micro-organismos associados às plantas podem apresentar via metabólica que facilita a absorção e a quebra da sacarose, sendo essa característica vantagem evolutiva e competitiva. A presença de invertases foi descrita em diversos filos fúngicos. As espécies endofíticas apresentam, em geral, diferentes estratégias nutricionais visando à degradação da sacarose (DOIDY *et al.*, 2012).

A maior predominância de algumas espécies de fungos e de leveduras endofíticas na expedição e no campo (Tabelas 2 e 3) pode ser atribuída ao fato de que, nessas etapas, em plantas tropicais, as folhas apresentam concentrações menores de substâncias químicas de defesa, fato que pode permitir maior crescimento desses micro-organismos (ARNOLD *et al.*, 2003).

Outro fator que afeta o crescimento de fungos e contribui para diferenças na densidade e, conseqüentemente, na diversidade microbiana avaliada (Figuras 4 e 5) é a umidade, uma vez que o conteúdo de água próximo à saturação pode afetar a entrada e o crescimento fúngico na planta (RAYNER & BODDY, 1986). As folhas provenientes do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento foram irrigadas diariamente, de acordo com os padrões de umidade apresentados na região, diferente do que ocorreram com as plantas em expedição e a campo, dependentes da precipitação pluviométrica. Esse fato também pode explicar as diferenças na prevalência e frequência de fungos e leveduras nas fases de desenvolvimento do eucalipto.

Ascomycota foi o filo predominante entre as espécies de fungos e leveduras em eucalipto (Tabelas 2 e 3). Entre os fungos endofíticos, *Teratosphaeria acidotherma* e *Cladosporium sp.* e as leveduras do gênero *Candida* e *Nilaparvata* (Figura 9) foram encontrados em mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto (Tabela 2). O predomínio de leveduras do filo Ascomycota pode ser reflexo da adaptação desses micro-organismos às folhas como micro-habitat que favorece o crescimento de espécies fermentativas (POZO et al 2011). Fungos do gênero *Teratosphaeria* foram encontrados em folhas com sintomas de MLD (doença das manchas da folha) em eucalipto na Austrália (ANDJIC et al., 2010). Entretanto, neste estudo, *Teratosphaeria acidotherma* e *Teratosphaeria toledana* (Tabela 2) foram extraídas de folhas saudáveis de eucalipto. Essa observação evidencia que certos micro-organismos podem ser endofíticos em uma planta e patógenos em outras (SAIKKONEN et al. 2004). A diferença entre o estágio endofítico e patogênico pode ser devido a fatores abióticos ou à idade da planta (SAIKKONEN et al., 2004; PORRAS-ALFARO et al., 2011).

Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* estavam presentes em folhas de plantas provenientes de mais de uma etapa de produção de mudas (Tabelas 2 e 3). Esse comportamento mais generalista indica capacidade de adaptação a condições nutricionais e ambientais distintas. O fungo *Cladosporium sp.* e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem na folhas nas etapas de expedição e campo; já o gênero *Candida* está presente em folhas de plantas do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento. Esse comportamento indica que elas possuem informações genéticas para colonizar e persistir em folhas de eucalipto em mais de uma etapa de desenvolvimento dessa planta, sugerindo que sejam micro-organismos endofíticos competentes (HARDOIM et al., 2008), com

papéis relevantes na fisiologia da planta.

Os fungos e as leveduras podem beneficiar as plantas, aumentando a tolerância das mesmas a fatores bióticos e abióticos, melhorando o crescimento e a sobrevivência em condições adversas, competindo com patógenos (HUBBARD *et al.*, 2014) e produzindo ampla variedade de reguladores de crescimento, a exemplo das giberelinas (GAs), do ácido abscísico (ABA) e das auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012). *Candida tropicalis* já foi relatada como tendo capacidade de promoção de crescimento em arroz por meio de alta atividade da ACC deaminase, da produção de ácido indol acético (AIA) e de poliaminas (AMPRAYN *et al.*, 2012). Plantas em estresse produzem altas concentrações de etileno, inibindo o crescimento (GLICK *et al.*, 2007). A ACC deaminase é a enzima responsável pela quebra do precursor do etileno, o aminociclopropano-1-carboxilato – ACC, em amônia e alfa-cetoglutarato. Micro-organismos produtores de ACC-deaminase diminuem os níveis de etileno pelo consumo dos subprodutos da quebra do precursor, ACC, promovendo, ainda, o crescimento vegetal pela síntese de AIA (GLICK, 2014).

Muitas das espécies de fungos filamentosos e leveduras são específicas de algumas fases de desenvolvimento do eucalipto. Os fungos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos do jardim clonal, *Chaetomella acutiseta* e *Ascotricha chartarum* do sombreamento, *Erratomyces patelii* e *Saxomyces* sp. das planta recém-saídas do sombreamento, *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da expedição e *M. populicola* do campo (Tabela 2). As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* estavam presentes apenas nas plantas em sombreamento e nas recém-saídas do sombreamento, respectivamente.

A análise filogenética das sequências de 18 e 26S rDNA confirmou que a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, presente nas folhas de eucalipto em diferentes etapas de desenvolvimento, está incluída nos filos Basidiomycota e Ascomycota, pela formação de clados distintos, com altos *bootstraps* (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), os quais sustentam a análise filogenética (Figura 7).

Entre os fungos pertencentes à Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Podosphaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. Já entre

os Basidiomycota, os melhores agrupamentos foram o da UTO B10 com dois fungos pertencentes ao gênero *Diplomitoporus*, a B17 com *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com o gênero *Cortinarius*, todos com altos *bootstraps* (Figura 7).

Fungos do gênero *Mycosphaerella* são frequentemente relatados como habitantes da parte aérea das plantas, com algumas de suas espécies hospedeiro-específicas (MAXWELL *et al.*, 2005). *Mycosphaerella lateralis* já foi demonstrada em interação patogênica com eucalipto na Austrália, formando lesões necróticas nas folhas (MAXWELL *et al.*, 2000). No presente estudo, entretanto, esse fungo foi identificado em folhas assintomáticas. Tal fato pode indicar que a interação seja dependente da espécie de planta, da área de cultivo, da idade da planta ou de mecanismos de reconhecimento planta-hospedeiro que podem determinar o comportamento fúngico como patogênico ou endofítico (SAIKKONEN *et al.*, 2004; PORRAS-ALFARO *et al.*, 2011).

A levedura cosmoploita *Aureobasidium pullulans* já foi identificada em várias plantas, sendo considerada como potencial agente de controle biológico de patógenos (ANDREWS *et al.*, 1994). Neste estudo, essa levedura é relatada como endofítica de eucalipto (Figura 8) em plantas de 18 meses de idade, mas não nas demais fases de desenvolvimento (Tabela 3).

Ampla variedade de fungos e leveduras endofíticos foi encontrada em eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento da planta durante a produção de mudas em viveiro. A diversidade microbiana levantada neste trabalho sugere significativa importância dos micro-organismos endofíticos nos sistemas de produção de mudas em escala comercial, abrindo novas avenidas para a elucidação do papel de micro-organismos associativos e simbióticos na nutrição vegetal e na adaptação da planta ao meio.

CONCLUSÕES

A excisão, eluição e sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostrou ser boa técnica para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto.

Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto. Essa comunidade é representada por 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos e duas espécies e sete gêneros de leveduras, em plantas de diferentes fases de desenvolvimento.

A relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a levedura e eucalipto, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto. Entretanto, os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto. Já o fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodospiridium fluviale* são persistentes nas etapas de expedição e campo, e o gênero *Candida*, no jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.
- AMPRAYN, K. O., ROSE, M. T., KECSKÉS, M., PEREG, L., NGUYEN, H. T & KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis*) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.
- ANDJIC, V., WHYTE, G., HARDY, G & BURGESS, T. New *Teratosphaeria* species occurring on eucalypts in Australia. **Fungal Diversity**, v. 43, p. 27-38, 2010.
- ANDREWS, J. H., HARRIS, R. F., SPEAR, R. N., LAU, G. W & NORDHEIM, E. V. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 40, p. 6-17, 1994.
- ARNOLD, A. E. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. **Current Trends in Mycological Research** (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68, 2005.
- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, p. 541-549, 2007.
- ARNOLD, A. E., MAYNARD, Z., GILBERT, G. S., COLEY, P. D & KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.
- BAGO, B., PFEFFER, P. E & SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.124, p. 949-958, 2000.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. **Yeast**, v. 25, p. 689-731, 2008.

- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 391-403, 2010.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**. v. 13, p. 79-148, 2000.
- BRUNDRETT, M. C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editors. **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. 281–293, 2006.
- CANNON, P. F & SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**. v. 94, p. 210-220, 2002.
- CHAMBERGO, F. S., BONACCORSI, E. D., FERREIRA, A. J., RAMOS, A. S., FERREIRA, J. R., ABRAHAO-NETO, J., FARAH, J. P & DORRY, EL- H. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 13983-13988, 2002.
- CHEEWANGKOON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C., & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**, v. 23, p. 55-85, 2009.
- COCOLIN, L., BISSON, L & MILLS, D. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 81–87, 2000.
- DOIDY, J., GRACE, E., KÜHN, C., SIMON-PLAS, F., CASIERI, L & WIPF, D. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. **Trends in Plant Science**. v. 17, p. 413-422, 2012.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, p. 30-39, 2014.
- GLICK, B. R., CHENG, Z., CZARNY, J & DUAN, J. **Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria**. In New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research (pp. 329-339). Springer Netherlands, 2007.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T & RYAN, P.D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.

- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HUBBARD, M., GERMIDA, J. J & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology*, v. 116, n.1, p. 109-122, 2014.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHARWAR, R. N., GOND, S. K., KUMAR, A & MISHRA, A. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A proposed taxonomy of anaerobic fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LISEC, J., SCHAUER, N., KOPKA, J., WILLMITZER, L & FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387–396, 2006.
- LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E. H & HYDE, K. D: Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. **Canadian Journal Microbiol**, v. 48, p. 1109-1112, 2002.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.
- MASOUD, W., BJØRG CESAR, L., JESPERSEN, L & JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East África determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**. v. 21, p. 549-556, 2004.
- MAXWELL, A., HARDY, G. E. STJ., WINGFIELD, M. J. & DELL, B. First record of *Mycosphaerella lateralis* on *Eucalyptus* in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 29, p. 279, 2000.
- MAXWELL, A., JACKSON, S. L., DELL, B., & HARDY, G. E. S. J. PCR-identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. **Mycological Research**, v. 109, p. 992-1004, 2005.

- MAY L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 829-841, 2001.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594, 2013.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, 78–81, 2001.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- POZO, M. I., HERRERA, C. M & BAZAGA, P. Species richness of yeast communities in floral nectar of southern Spanish plants. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 82-91, 2011.
- PRAKITCHAIWATTANA, C. J., FLEET, G. H & HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, v.4, p. 865–877, 2004.
- RAYNER, A. D. M & BODDY, L. Population structure and the infection biology of wood-decay fungi in living trees. **Advance Plant Pathology**, v. 5, p. 119–160, 1986.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- SAIKKONEN, K., WALI, P., HELANDER, M & TAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 275-280, 2004.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.

- SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S., BILLS, G. F & ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal species diversity in juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus* from plantations affected by *Mycosphaerella* leaf disease. **Annals of Applied Biology**, v. 158, p. 177-187, 2011.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- WHIPPS, J. M., HAND, P., PINK, D & BENDING, G. D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 1744-1755, 2008.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 4

DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As associações de plantas com bactérias endofíticas contribuem significativamente para a fitossanidade e produtividade das culturas. Bactérias endofíticas adaptaram-se à vida no interior dos tecidos vegetais, podendo contribuir positivamente para processos-chave para nutrição das culturas, a exemplo da fixação biológica de nitrogênio. O *Eucalyptus* é um dos gêneros de plantas mais cultivados e valorizados economicamente no mundo. A caracterização da comunidade microbiana associada às espécies deste gênero pode proporcionar novas ferramentas biotecnológicas para o cultivo sustentável e mais econômico dessas plantas. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, incluindo os grupos com potencial para fixação de N associados às folhas dessa planta. A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica foi acessada por PCR-DGGE, isolamento e sequenciamento do gene rRNA 16S. Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma-) e Actinobacteria foram identificados na comunidade investigada. Nessa comunidade, esse é o primeiro relato das espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* como endofíticas. A diversidade variou entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, sendo Proteobacteria o filo mais representativo em folhas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento, e Firmicutes no campo. A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento em estudo, com muitas espécies encontradas apresentando potencial para fixação de nitrogênio.

Palavras-chave: diversidade, bactérias endofíticas, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

Eucalyptus é um dos gêneros de planta mais cultivados em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, pelo rápido crescimento, adaptabilidade e valor comercial da madeira produzida (BROOKER, 2000). O rápido crescimento do eucalipto demanda alta disponibilidade de nutrientes, especialmente nitrogênio (SMETHURST *et al.*, 2004). Esse elemento pode ser obtido pela fixação biológica, realizada por bactérias de vida livre e por endofíticas (SUMMAN *et al.*, 2005; REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo da comunidade microbiana do eucalipto pode proporcionar melhor panorama das interações planta-micro-organismo, permitindo ampliar o entendimento da contribuição da microbiota associada para a nutrição florestal.

A parte aérea de várias plantas abriga ampla diversidade de micro-organismos, especialmente bactérias e fungos, com grande importância ecológica (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Essa diversidade tem sido alvo de vários estudos que revelam a presença de bactérias em diferentes órgãos do hospedeiro, influenciando sua sanidade e desenvolvimento (BRADER *et al.*, 2015). Micro-organismos endofíticos adaptam-se a ambientes específicos do corpo da planta e, ao colonizá-los (BULGARELLI *et al.*, 2013), podem estimular o crescimento vegetal por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de auxinas e seus análogos e pela síntese de giberelinas (WAQAS *et al.*, 2012). A interação eucalipto-bactérias endofíticas é pobremente documentada, sendo a maioria das pesquisas focada nos micro-organismos associados às raízes (BONITO *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2014).

A diversidade microbiana tem sido acessada em diversas plantas agronomicamente importantes pela utilização da análise molecular das comunidades microbianas por meio de métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) e independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Apesar da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de bactérias em *Eucalyptus* spp. (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), da importância das endofíticas como parte da comunidade microbiana dessas plantas (BRADER *et al.*, 2015) e do Brasil ser o maior produtor mundial dessa essência florestal, pouco se conhece sobre a microbiota endofítica associada ao eucalipto. Variações na estrutura dessa comunidade em função da idade da planta e das fases de desenvolvimento em viveiros comerciais são totalmente desconhecidas. Da mesma forma, a diversidade de bactérias com potencial de fixação de nitrogênio

sob essas mesmas condições necessita ainda ser caracterizada.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas, incluindo aquelas com potencial de fixação de nitrogênio, em associação com folhas de plantas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento em viveiros comerciais e em campo, combinando métodos dependentes e independentes de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Esse estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP - etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato

Fertilizantes	Doses* (kg/m³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é 19° 24' 54”, a longitude 42° 25' 56” e a altitude 318 metros. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulínítico ou caulínítico-oxídico ou gibbsítico-oxídico, hipoférrico ou mesoférrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente, a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56,39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20 °C. Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato (0,05 mmol.L⁻¹), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de

sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspensionado e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspensionado *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Análise da Diversidade de bactérias totais e diazotróficas

A estratégia Nested-PCR foi utilizada para acessar a diversidade de bactérias totais em folhas de eucalipto por DGGE. O DNA total, na primeira PCR, foi utilizado como molde para amplificação do gene rRNA 16S, e, juntamente com primers P027/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005), produziram *amplicons* específicos que serviram de molde para a segunda PCR, com os primers 984GC/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005).

As PCRs foram realizadas em volume final de 25 µL, sendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µM de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 µM dos primers, 20 ng de molde e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 47 °C por 1 min, extensão por 2 min a 72 °C e extensão final durante 10 min a 72 °C.

O acesso à diversidade de bactérias potencialmente fixadoras de N em folhas de eucalipto foi obtido por PCR em duas reações: uma utilizando os primers polF/polR (POLY *et al.*, 2001) e outra substituindo polF por polFGC. As reações foram realizadas em volume de 50 µL contendo tampão 1X, 1.5mM MgCl₂, 0.12mM of dNTPs, 0.3 µM de cada *primer*, 1U Taq polymerase e 10 ng molde, submetidos a desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 0,5 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min e extensão final de 72 °C por 10 min. (MAPELLI *et al.*, 2013).

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após as PCRs foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermo- lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (37.5:1, acrilamida – N,N=–metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris–HCl, pH 8.0, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09% (v/v) TEMED (N,N,N=,N=–tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 40%–60% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em

tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e as imagens dos géis obtidas por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de bactérias totais e fixadoras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessas comunidades foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software sigmaplot (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Isolamento de bactérias endofíticas

As folhas desinfestadas de cada uma das fases de desenvolvimento do eucalipto foram utilizadas para estabelecer a densidade de bactérias cultiváveis por folha ([UFC] folha⁻¹). As folhas foram individualmente trituradas em homogeneizador em tubos contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7). A suspensão foi, então, filtrada em gaze esterilizada, e o filtrado diluído seriadamente em tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7.0). Alíquotas de 100 µL foram espalhadas em meio sólido R2A e incubadas a 28°C por 72 horas.

Extração de DNA de culturas puras

O DNA total das culturas puras crescidas em meio R2A líquido foi extraído utilizando o Kit de purificação de DNA (Promega™, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. A integridade e a quantidade de DNA extraído foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corados com Gel Red® 1000X, e as imagens obtidas utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

BOX-PCR

BOX-PCR foi realizado utilizando o primer BOX-A1R (VERSALOVIC *et al.*, 1994) para analisar a diversidade genômica em nível de isolado. A PCR foi preparada em volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão, 3,75 µL de MgCl₂ 25mmol, 0,5 µL de dNTPs 10 mmol, 1,25 µL de DMSO, 1,25 µL de BSA (soro albumina bovina), 0,5 µL oligonucleotídeos iniciadores BOX-A1R (10mM) e 0,25 µL de Taq DNA polymerase (BONIEK *et al.*, 2010), 1 µL de DNA e 15,25 µL de água mili-Q autoclavada. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94° C por 7 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min, extensão por 8 min a 65°C e extensão final durante 16 min a 65°C (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Os *amplicons* obtidos pela PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) a 100V durante 6 horas e corados com Gel Red® 1000X. As imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil). Para determinar a similaridade entre os isolados o gel de agarose contendo os produtos BOX-PCR foi analisado por UPGMA (agrupamento médio entre grupos) software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). O dendrograma resultante foi avaliado com base no coeficiente de Jaccard, o qual analisa a similaridade e a distância com base nas bandas obtidas. Isolados com valores de similaridade acima de 90% foram considerados iguais.

Amplificação e sequenciamento do rRNA 16S

Os *primers* universais P27F/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005) foram utilizados para amplificar o gene rRNA 16S dos isolados bacterianos diferenciados por BOX-PCR. A reação foi realizada contendo aproximadamente 20 ng de DNA, tampão (Promega), 2,25 mmol of MgCl₂, 210 mmol de cada *primer*, 250 µM of deoxinucleotídeos (dNTPs), e 0,02 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega). A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf-Germany) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 min, e extensão a 72°C por 1,5 min, com extensão final de 7 min a 72°C. Os *amplicons* foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) e o gel corado com Gel Red® 1000X. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank*

(NCBI). Para cada sequência bacteriana foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97%, identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências do gene rRNA 16S utilizando ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética baseado no alinhamento dessas sequências foi feito utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram obtidos por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica em folhas de plantas de eucalipto provenientes das fases do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e a campo foram examinadas por DGGE, cultivo em placa e sequenciamento do rRNA 16S. A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e potenciais fixadoras de nitrogênio. Essa abordagem permitiu a identificação de comunidades mais e menos abundantes pela presença de bandas mais e menos intensas nos géis (Figuras 1 e 2). A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes fases de desenvolvimento dessa planta (Figura 2).

O perfil de bandas e a análise de agrupamento mostraram que a comunidade bacteriana endofítica em folhas de eucalipto foi homogênea, com alta similaridade, e as populações mais distintas estão presentes no jardim clonal e no campo. Essas duas fases mostraram a formação de dois grupos distintos, com menor similaridade que os demais (Figura 1). Portanto, a comunidade bacteriana endofítica de eucalipto variou em relação às fases de desenvolvimento dessa

planta.

Em comparação com a comunidade de bactérias endofíticas totais, a de diazotróficos revelou-se mais heterogênea entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, pelo menor número de agrupamentos distintos. A comunidade de endofíticas diazotróficas no campo é distinta das outras etapas de desenvolvimento, com valores de similaridade inferiores a 58,3% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelas diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). A DGGE mostrou sensibilidade em detectar diferenças na comunidade endofítica diazotrófica em folhas de eucalipto, sendo o gene *nifH* marcador molecular eficiente para verificar diferenças de forma rápida na diversidade e distribuição de diazotróficas endofíticas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas.

A distribuição de bandas revelou poucas alterações na estrutura da comunidade de bactérias endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto, sendo que a maior parte delas foi ocasionada pelas bactérias diazotróficas (Figura 3). A maioria das UTOs é compartilhada entre as fases de desenvolvimento das plantas para ambas as comunidades. Entretanto, a presença de UTOs específicas é evidente, o que reflete as diferenças na estrutura da comunidade nas folhas provenientes do campo (Figura 3). Essas mudanças demonstraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a comunidade de bactérias endofíticas nas condições avaliadas, fato mais evidenciado entre as bactérias diazotróficas.

Os índices de diversidade de Shannon e de riqueza foram calculados para as comunidades de bactérias endofíticas em interação com as folhas de eucalipto. A diversidade e a riqueza de bactérias endofíticas totais foram maiores nas folhas provenientes do campo (Figura 4). De forma distinta, para as bactérias diazotróficas, as maiores médias desses índices foram obtidas para as amostras de folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo (Figura 5). Esses resultados indicam que as fases de desenvolvimento de eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias diazotróficas endofíticas do que a de bactérias totais. As folhas provenientes do jardim clonal e da expedição foram as que mostraram as menores médias de diversidade e de riqueza de bactérias endofíticas diazotróficas (Figura 5).

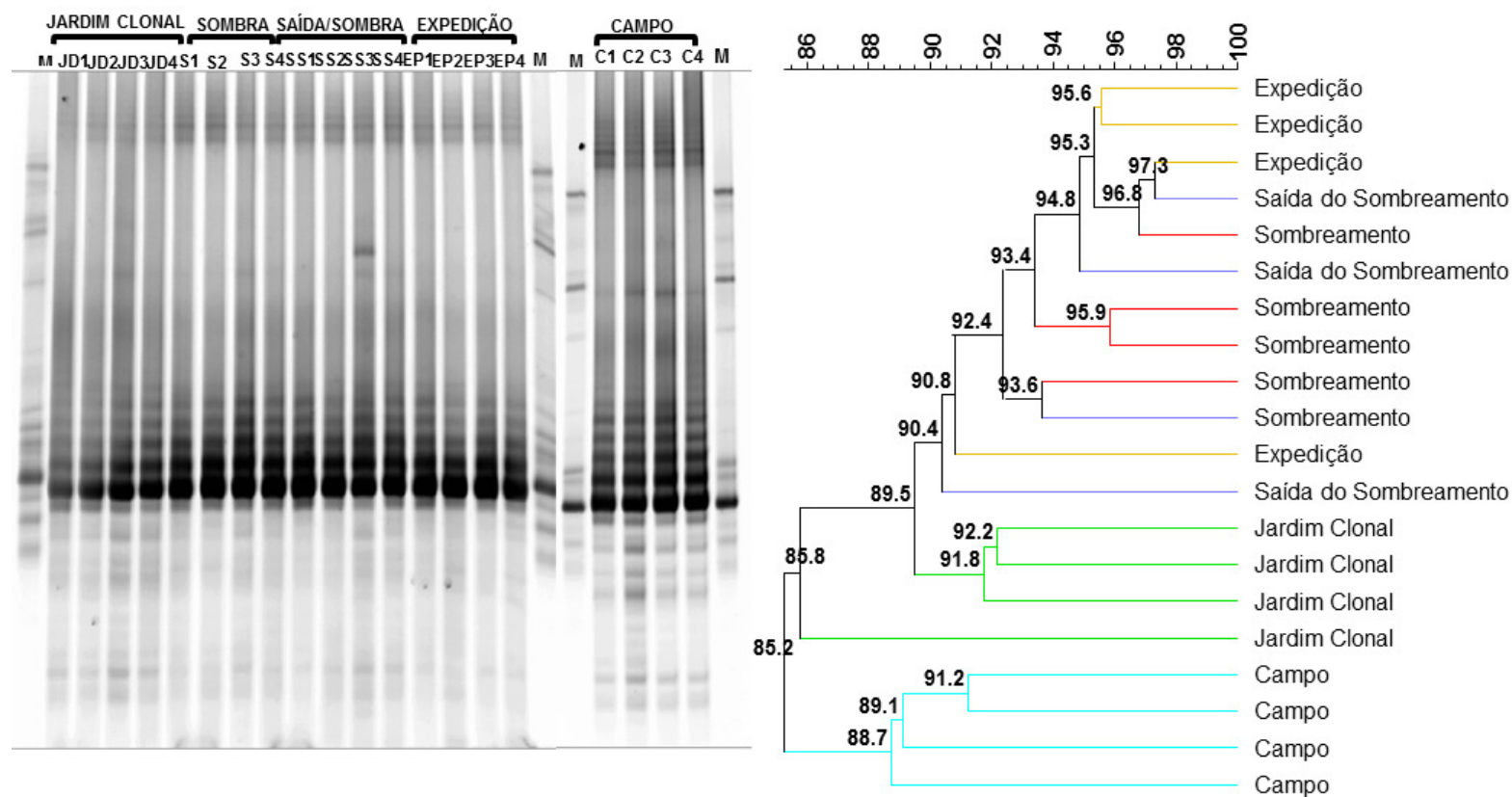


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes rRNA 16S. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene rRNA 16S das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

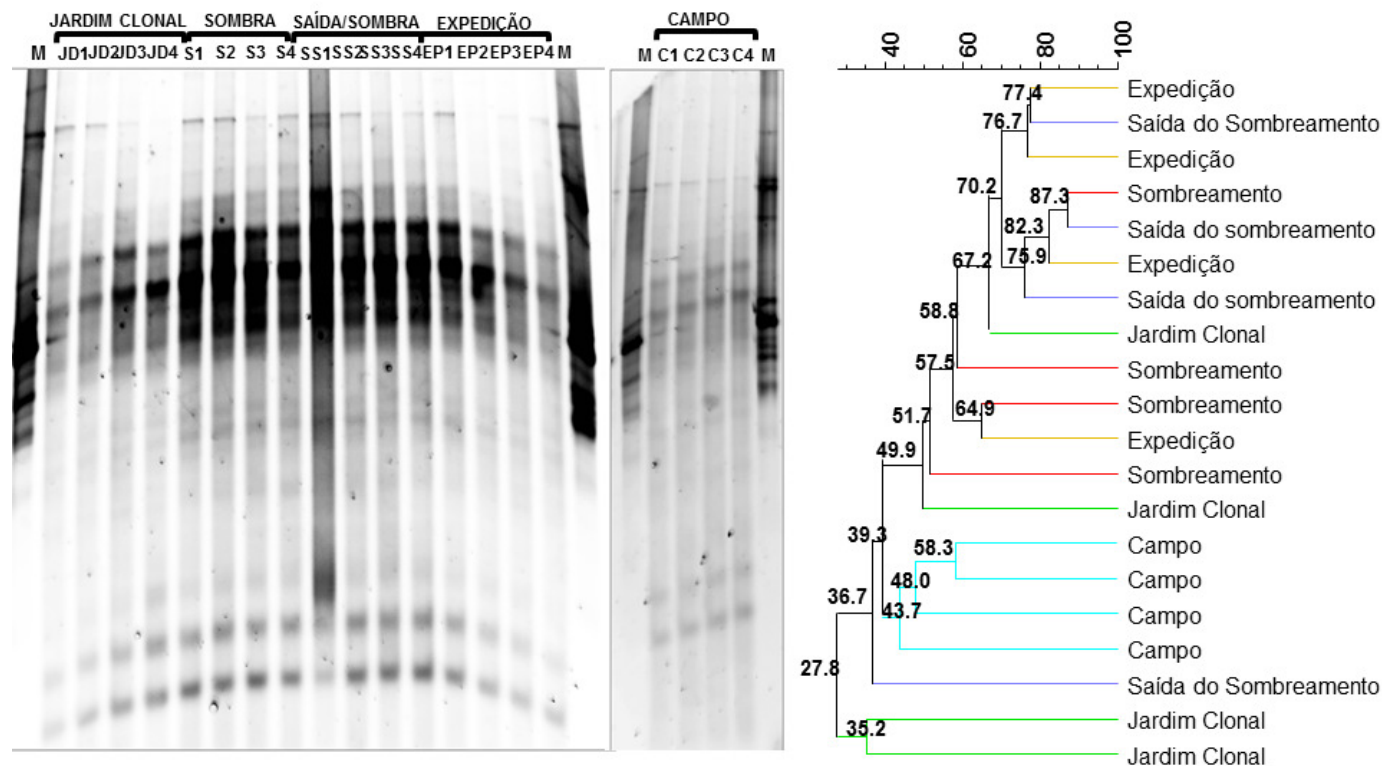


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes *nifH*. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém- saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene *nifH* das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

Os isolados com perfil genômico distinto, segundo a técnica de BOX-PCR, e com índices de similaridade inferiores a 90% (dados não publicados) foram identificados por sequenciamento do rRNA 16S e comparados com sequências obtidas pelo algoritmo BLAST (NCBI). O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria (Figura 6). Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, seja no viveiro ou em campo. As sequências de rRNA 16S obtidas de 32 isolados apresentaram alta identidade com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Entre essas sequências, somente duas, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores de identidade inferiores a 97%. Esses isolados foram identificados apenas em nível de gênero, e os demais, em nível de espécie (Figura 6).

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento das plantas, já que apenas 27% das espécies identificadas foram isoladas em mais de uma etapa, como *Bacillus flexus*, presente desde as folhas do jardim clonal até as do campo (Figura 6). A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S (44%) foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento (35%). A colonização endofítica pelo gênero *Bacillus* em folhas de eucalipto inicia-se no jardim clonal e se estende em etapas subsequentes em que são encontradas as espécies *B. flexus*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Figura 6).

A análise filogenética das sequências de rDNA 16S com identidades acima de 97% confirmou que a comunidade de bactérias endofíticas em folhas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto pertencem aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, pela formação de clados distintos com altos *bootstraps* (Figuras 7). Os *bootstraps* apresentados pela maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007) (Figura 7).

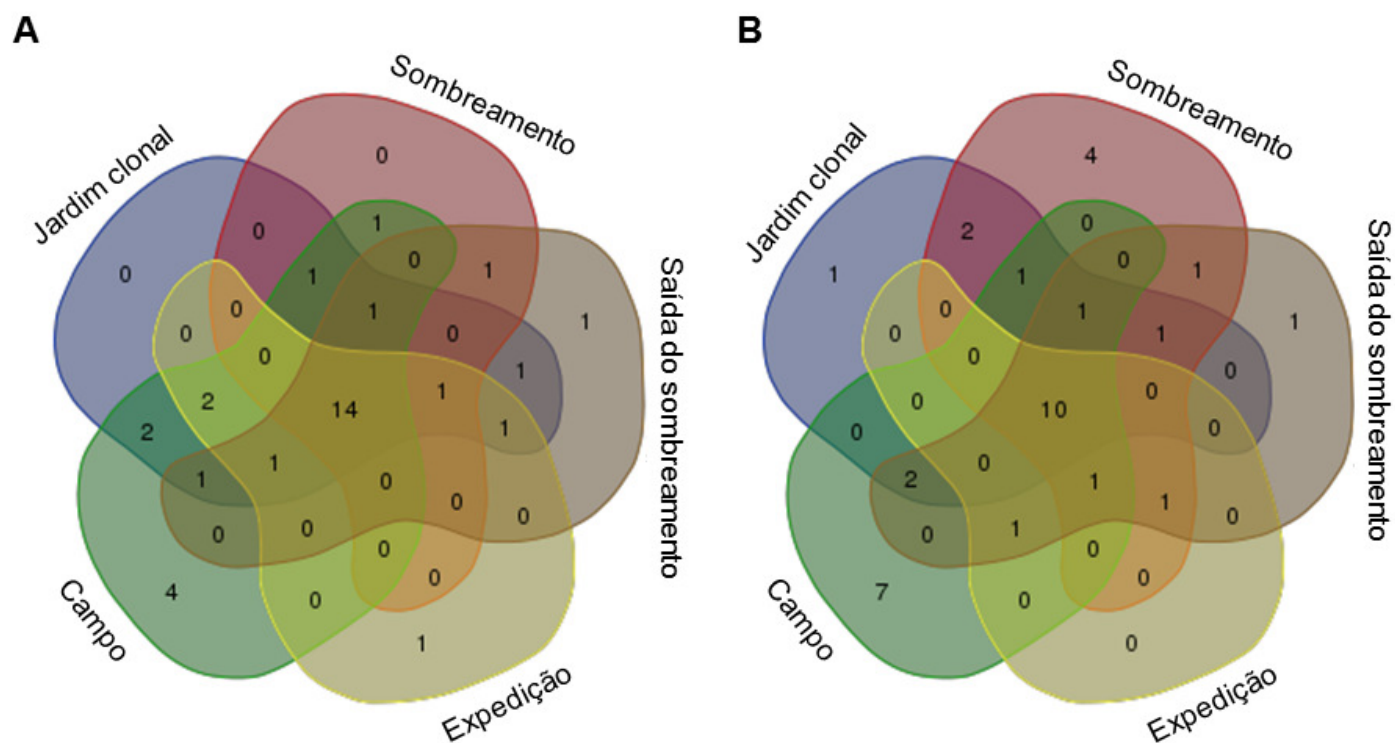


Figura 3: Distribuição de UTOs de bactérias endofíticas totais (A) e potencialmente diazotróficas (B) pelo diagrama de venn em diferentes etapas de desenvolvimento das folhas de eucalipto: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo.

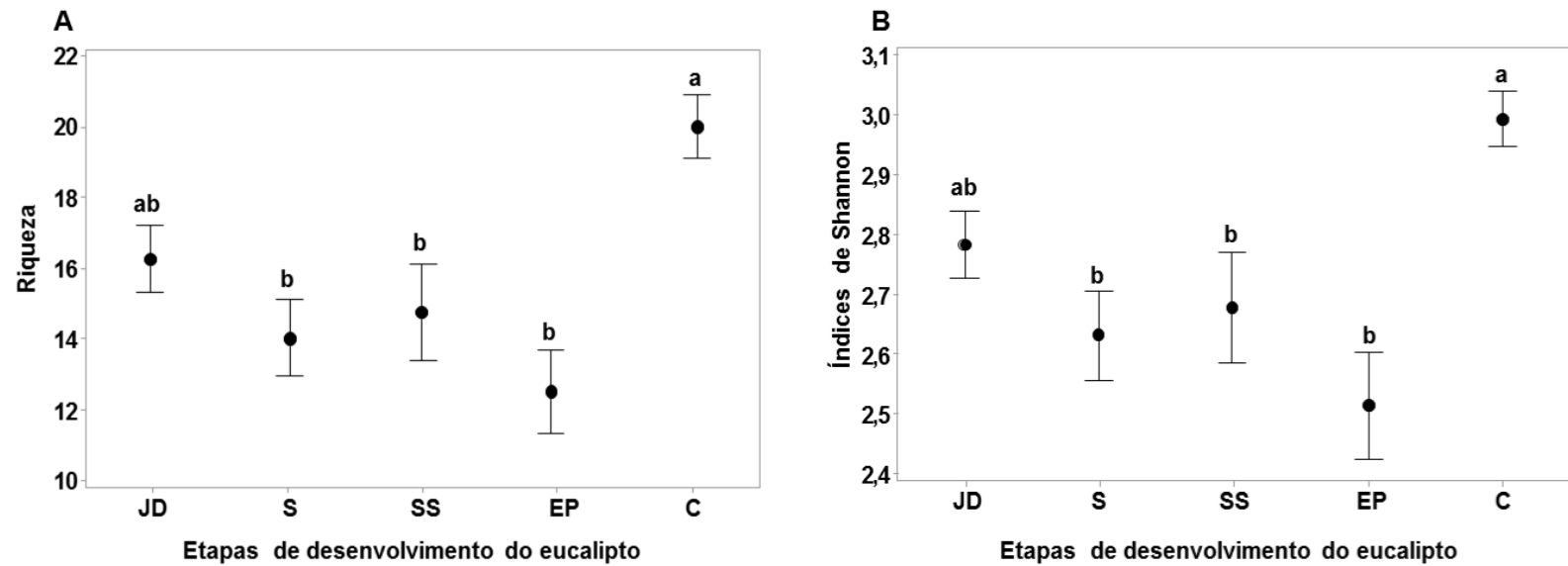


Figura 4: Perfil de Riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas totais provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

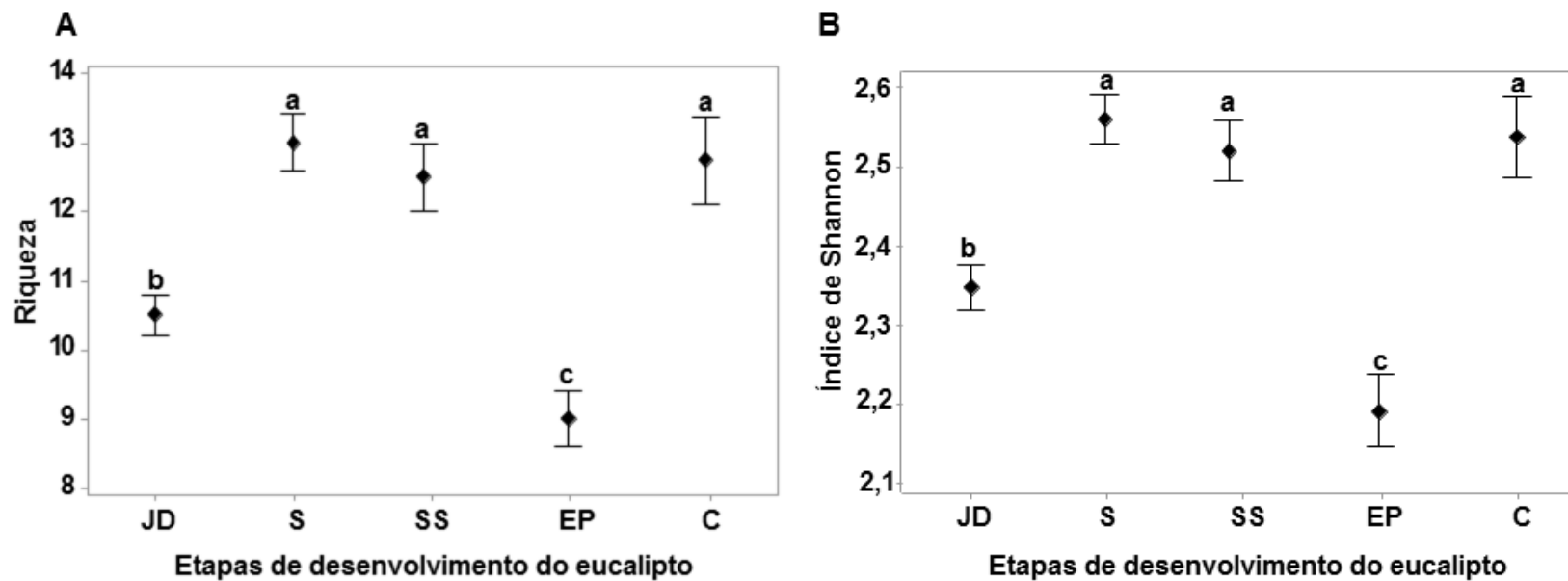


Figura 5: Perfil de riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise filogenética das sequências revelou que a maioria delas pertence ao filo Gammaproteobacteria, em que se destacam os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Firmicutes e Alphaproteobacteria são os filos que apresentaram o maior número de gêneros distintos. Betaproteobacteria foi o filo menos representativo entre os encontrados, sendo o isolado BAC 06 identificado como *Massilia timonae* e próximo filogeneticamente a *Massilia timonae* (Figura 7). Entre os Firmicutes, *Bacillus* foi gênero predominante (Figura 6) com *bootstrap* 99 (Figura 7). *Paenibacillus terrigena* (BAC 33) e *Paenibacillus darwinianus* (BAC 29), colonizadoras exclusivas da expedição e do campo, respectivamente, ainda não foram documentadas em interação endofítica com plantas. *Terrabacter lapilli* (BAC 32) é a única actinobacteria isolada de folhas de eucalipto que ainda não foi registrada como endofítica. Alphaproteobacteria contribui com a presença de muitas bactérias diazotróficas, o que inclui *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium grahamii* e *Rhizobium pusense* (Figuras 6 e 7). O isolado BAC 16, identificado como *Rhizobium pusense* (Figura 6), agrupou com alta sustentação filogenética com *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium pusense* (Figura 7). Nesse filo, *Rhizobium grahami* (BAC 25) e *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) foram pela primeira vez identificadas como endofíticas (Figura 6). Essas duas espécies foram isoladas de mudas de eucalipto recém-saídas do sombreamento, não persistindo as demais fases de desenvolvimento da planta. *Novosphingobium barchamii* apresentou proximidade filogenética com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7). Para a maioria dos isolados essa análise (Figura 7) confirmou a identificação realizada pela comparação com as sequências encontradas no BLAST (Figura 6). Outra espécie acrescida ao universo das endofíticas é a Gammaproteobacteria *Stenotrophomonas panacihumi* (Figuras 6 e 7), isolada de mudas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento (Figura 6). Portanto, as folhas de eucalipto sustentam uma comunidade de bactérias endofíticas diversa e dependente das fases de desenvolvimento dessa planta.

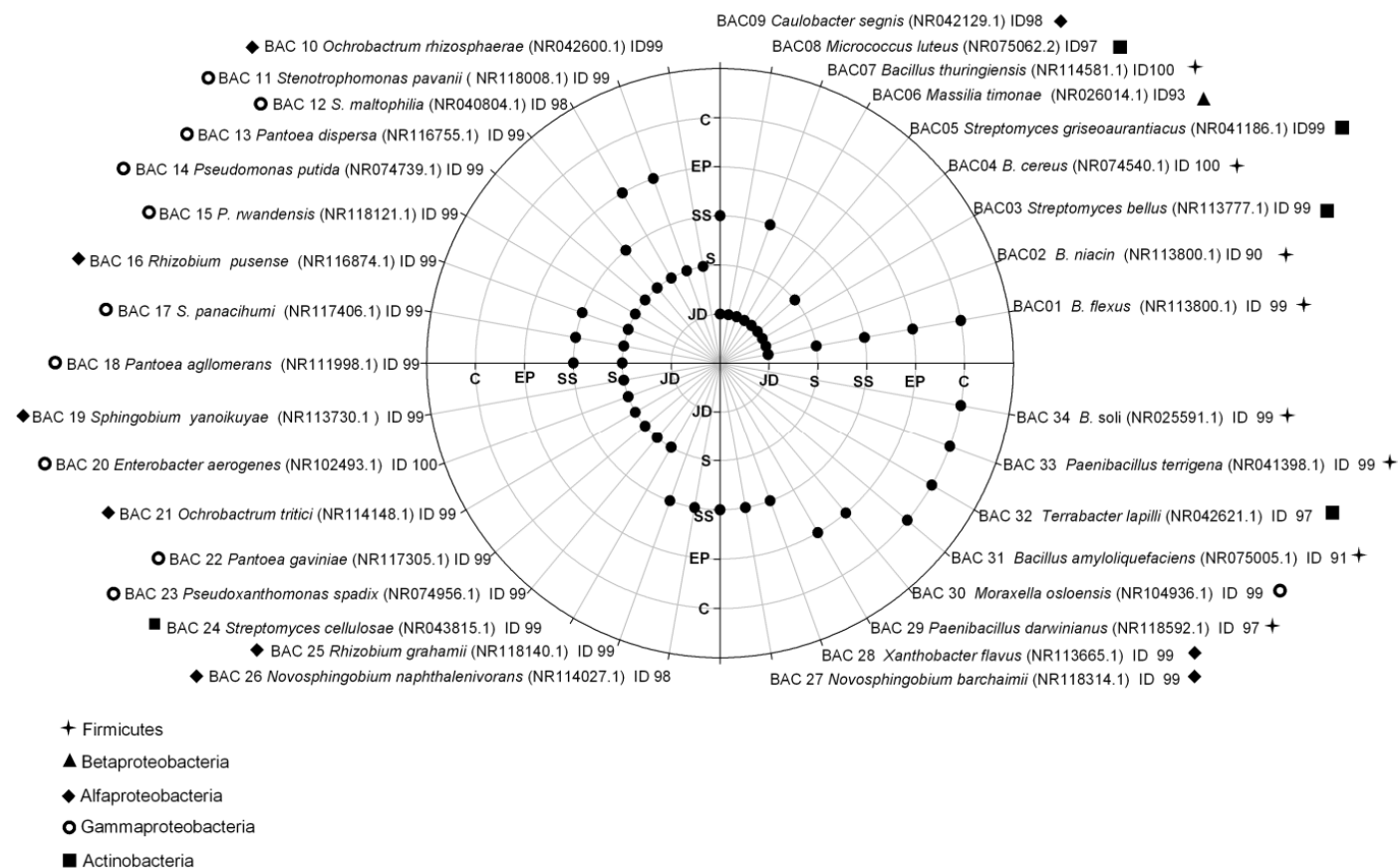


Figura 6: Distribuição das espécies de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; 1, 2, 3 e 4: Repetições. As espécies estão acompanhadas do número de acesso do *GenBank* (NCBI) e dos valores de identidades (ID) em porcentagem.

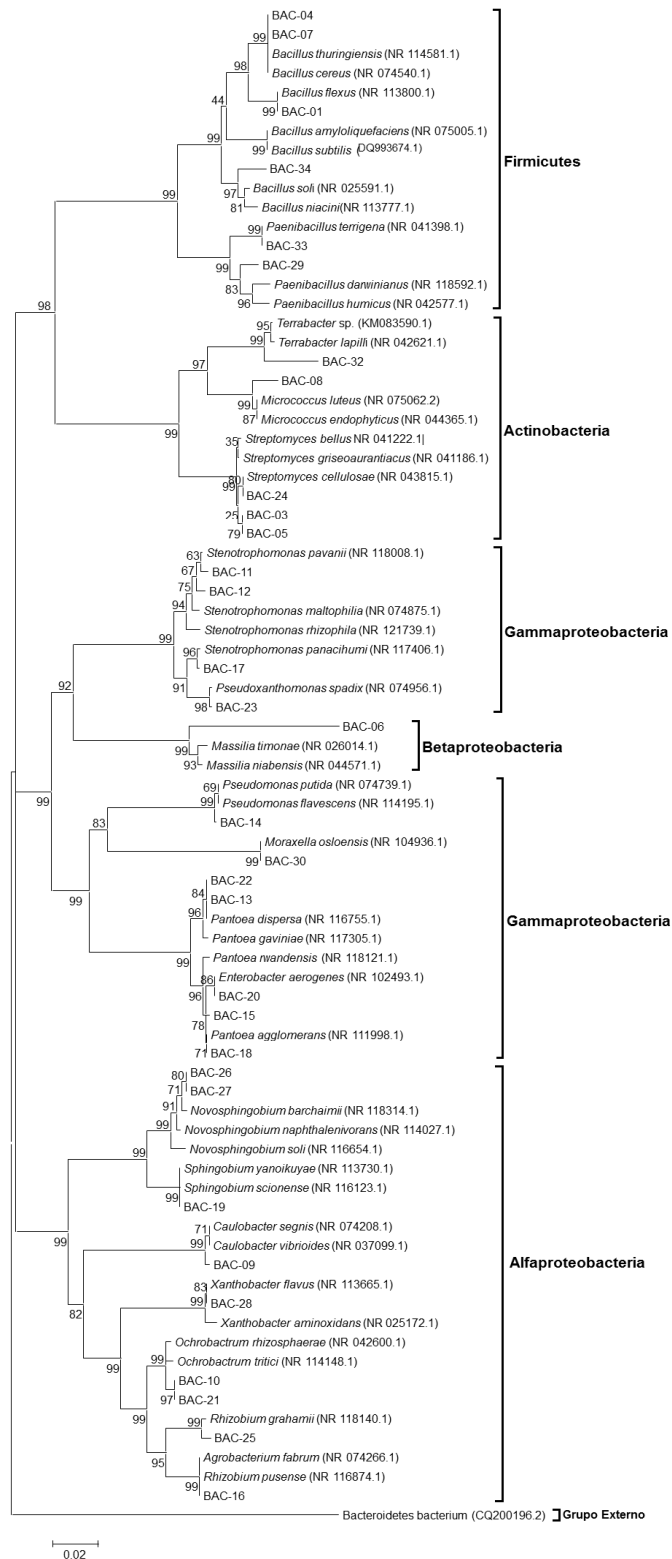


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 16S de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A amplificação do gene rDNA 16S e a separação dos *amplicons* por DGGE mostrou eficiência no acesso à diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto. Através do sequenciamento dos isolados e identificação por busca no NCBI, mais informações sobre essa comunidade foram obtidas. Com essas informações, as sequências e a filogenia foram conhecidas. DGGE é boa escolha para avaliação da diversidade das interações planta-micro-organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2013), sendo o método semiquantativo rápido para descrição de comunidades microbianas complexas (PETERSEN & DAHLLOF, 2005). O estudo dessas interações é importante, uma vez que o interior das plantas é habitat de grande diversidade de micro-organismos endofíticos que desempenham papéis relevantes na sanidade e no desenvolvimento das plantas (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Ao adaptarem-se a esse ambiente e colonizá-lo, os micro-organismos endofíticos expressam potencial metabólico diferenciado dos micro-organismos de vida livre (BRADER *et al.*, 2014).

A análise de agrupamento das bandas de DGGE de fragmentos rRNA 16S exibiu separação eletroforética clara e a formação de grupos distintos. Esses agrupamentos foram menos evidentes na comunidade de bactérias diazotróficas comparada com a de bactérias totais com valores de similaridade inferiores a 30% entre as fases de desenvolvimento do eucalipto. Essas pequenas porcentagens de similaridade (Figura 1) indicam alta variação entre os grupos bacterianos (ALTIMIRA *et al.*, 2012) nas folhas de eucalipto. Entretanto, a comunidade de endofíticas diazotróficas no campo parece recrutar uma microbiota própria, a qual é distinta das outras etapas de desenvolvimento da planta, com similaridade entre 43 e 58% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelos potencialmente diazotróficos presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). O gene *nifH* utilizado na DGGE mostrou ser marcador molecular eficiente em verificar diferenças na diversidade e distribuição da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas em folhas de eucalipto. Essa abordagem consistente proporciona a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes nessa comunidade (Figura 2). Esses resultados mostraram que essas fases modulam a comunidade de bactérias endofíticas, sendo que muitas delas têm potencial para estimular o crescimento vegetal por fixação de nitrogênio. Essa capacidade possibilitaria condições para a melhoria da nutrição das plantas pela presença da enzima nitrogenase (OLDROYD & DIXON, 2014). Este estudo pode,

então, fornecer contribuições para a busca de soluções biotecnológicas para resolver o problema do nitrogênio em plantas.

A diversidade de bactérias endofíticas em árvores é estudada com menor frequência quando comparada a outras plantas (EL-DEEB *et al.*, 2013; KUKLA *et al.*, 2014; MIGUEL *et al.*, 2013). Em *Eucalyptus*, pouco se conhece sobre as interação planta-bactéria, e os estudos existentes enfatizam o solo (DA SILVA *et al.*, 2014), a rizosfera e as raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010), os caules (PROCÓPIO *et al.*, 2009) e as sementes (FERREIRA *et al.*, 2008).

A modulação da composição das comunidades de bactérias endofíticas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto é evidenciada pelos maiores índices de riqueza e diversidade nas folhas provenientes do campo (Figura 4). Embora o perfil de diversidade da comunidade endofítica diazotrófica seja distinto, pois as maiores médias dos índices foram obtidas em folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo, as etapas de desenvolvimento da planta também modulam essa comunidade (Figura 5). As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas do que as de bactérias totais.

Índices de diversidade são essenciais nesse tipo de abordagem entre comunidades (MOHAMMAD & RAWASHDEH, 2015), e as mais diversas apresentam maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2011). Os índices encontrados neste estudo estão entre aqueles comumente citados na literatura (Figura 4), que mostram valores variando entre 1,5 e 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). As diferenças na diversidade de bactérias endofíticas podem ser atribuídas às concentrações distintas de açúcares encontradas nesse ambiente, aliada às variações catabólicas encontradas na maioria das bactérias heterotróficas filogeneticamente próximas (RODIONOV *et al.*, 2010). A fixação de nitrogênio requer a utilização de fontes de carbono e energia, e os gêneros que apresentam essa capacidade podem ser distintos em tempo de geração, taxa de crescimento e quantidade consumida de carboidratos (NAHER *et al.*, 2008). Em cianobactérias a clivagem da sacarose é essencial no metabolismo do carbono e fixação do nitrogênio (FIGUEROA *et al.*, 2013). Assim, em etapas com concentrações superiores de sacarose pode haver predomínio de bactérias diazotróficas que, à semelhança de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, utilizariam sacarose como fonte de energia (VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto é composta pelos filos Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta-, e Gamma) e Actinobacteria. As

bactérias endofíticas isoladas e identificadas por sequenciamento do rRNA 16S, em sua maioria, mostraram identidades superiores a 97% com as sequências depositadas NCBI, e somente dois isolados, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores inferiores a esse (Figura 6). Em geral, identidades acima de 97% são adotadas em estudos de filogenia como padrão para conceituação de organismos da mesma espécie (AL-BATAYNEH *et al.*, 2011), embora autores reconheçam que valores entre 98,5 e 99% são mais desejáveis e consistentes (STACKEBRANDT & EBERS, 2006). A confiabilidade dos alinhamentos foi confirmada utilizando-se o *e-value* (dados não mostrados), o qual indica a probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de bases, outro alinhamento com escore igual ou superior (KERFELD & SCOTT, 2011). Os isolados com identidades inferiores a 97% foram classificados em nível de gênero, após alinhamentos das sequências obtidas por sequenciamento do rDNA 16S com sequências correspondentes do NCBI (Figura 6).

O principal filo encontrado em plantas sombreadas e recém-saídas do sombreamento foi Proteobacteria, classes Alfa-, Beta- e Gamma (Figura 6). Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria apresentam habilidade em catabolizar carboidratos simples e complexos (LI *et al.*, 2014), o que facilita a adaptação ao habitat endofítico. A análise da diversidade da comunidade de folhas por meio das sequências de rRNA 16S, em abordagens dependentes e independentes de cultivo tem mostrado a dominância de Proteobacteria (BULGARELLI *et al.*, 2013). Entre os micro-organismos encontrados, muitos são potencialmente diazotróficos (Figura 6) (KÖBERL *et al.*, 2013), com a presença do gene *nifH*, o qual está relacionado à fixação de nitrogênio (WEBER *et al.*, 2013). Bactérias pertencentes à Firmicutes geralmente predominam na rizosfera (BODENHAUSEN *et al.*, 2013); porém, muitas de suas espécies apresentam boa adaptação ao estilo de vida endofítico (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa colonização frequentemente tem origem na infecção de bactérias do solo nas junções das raízes laterais e na rápida disseminação pelos espaços intercelulares do sistema radicular (CHEN & ZHU, 2015). Entretanto, a maioria das bactérias endofíticas isoladas das diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto demonstrou interação etapa-específica, com poucas delas colonizando mais de uma etapa (Figura 6).

A presença de espécies específicas em cada etapa na comunidade endofítica indica que parte dela pode não ser originária do solo, e sim alcançar o interior da folha pelos estômatos, ferimentos, ou outras portas de entrada (ROMERO *et al.*, 2014). Nesse novo habitat, Proteobacteria pode ter crescido e

proliferado mais rapidamente em fontes de carbono mais prontamente disponíveis (LEFF *et al.*, 2014) no sombreamento e na saída do sombreamento (capítulo 2). Assim, a comunidade de endofíticas pode ser influenciada pela composição e concentração de açúcares e aminoácidos. Plantas mais jovens e em sombreamento apresentam maiores conteúdos de aminoácidos (CHEN & POLAND, 2009; STEINBAUER *et al.*, 2013). Muitos gêneros de Proteobacteria utilizam preferencialmente ácidos orgânicos ao invés de açúcares (PORTAIS & DELORT, 2002), o que também pode ter contribuído para a predominância de Proteobacteria nessas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figura 6).

O predomínio de Firmicutes nas folhas oriundas do campo (Figura 6) pode ser atribuído às maiores concentrações de açúcares (capítulo 2) acompanhadas dos menores teores de aminoácidos (STEINBAUER, 2013). Entretanto, *Bacillus flexus* mostrou-se abundante em todas as fases de desenvolvimento (Figura 6), podendo o início da colonização desse gênero ocorrer no jardim clonal, evidenciado pela ocorrência de algumas de suas espécies em mais de uma fase de desenvolvimento das mudas (Figura 6). A colonização e permanência de *Bacillus flexus* indica a existência de maquinaria genética específica para colonização e persistência em folhas de eucalipto, sendo um endofítico competente (HARDOIM *et al.*, 2008), generalista e com maior capacidade competitiva. Folhas são um habitat mais dinâmico em comparação com a rizosfera e a comunidade microbiana em interação com ela está mais sujeita a variações de temperatura, umidade e radiação durante o dia e a noite, fatores que mudam a comunidade microbiana e a fisiologia da planta (TURNER *et al.*, 2013).

A versatilidade metabólica de bactérias do gênero *Bacillus* confere maior resistência e resiliência desses micro-organismos em vários ambientes com temperaturas, concentrações de sais e pH variáveis (AQEL *et al.*, 2012). Durante as etapas de desenvolvimento do eucalipto ocorrem mudanças na fisiologia da planta (MANKESSI *et al.*, 2010), as quais podem ser responsáveis por modificar a comunidade de bactérias endofíticas. Essas mudanças permitem às bactérias endofíticas multiplicarem-se rapidamente e predominarem em condições favoráveis, mantendo latência em condições menos propícias ao crescimento e proliferação. Bactérias endofíticas em interação com eucalipto podem ser relevantes para a fisiologia da planta e proporcionar tolerância a fatores bióticos e abióticos. Essas características aumentam a sobrevivência e o crescimento da planta em condições adversas e em competição com patógenos (GAIERO *et al.*, 2013). Acrescente-se, ainda, a produção de grande variedade de reguladores de crescimento como

giberelinas, ácido abscísico e auxinas (GAIERO *et al.*, 2013).

A análise filogenética das sequências de rRNA 16S confirmou que a comunidade de endofíticas em folhas de eucalipto está incluída em Firmicutes, Proteobacteria (Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria pela formação de clados distintos (Figura 7). Os *bootstraps* acima de 95 (Figura 7) na maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007). Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Esses gêneros são fixadores de nitrogênio e produtores e excretadores de AIA e aminoácidos (LIBA *et al.*, 2006). Esses metabólitos liberados pelos endofíticos podem ser utilizados pela planta e aumentar sua taxa de crescimento (KEMBEL *et al.*, 2014). A fixação de nitrogênio é amplamente difundida entre bactérias e essa capacidade pode proporcionar uma oportunidade para melhorar a nutrição de plantas (OLDROYD & DIXON, 2014). Entre as Proteobacterias fixadoras de nitrogênio estão dois isolados de *Rhizobium* (Figura 6), com alta identidade e *bootstrap*, geneticamente relacionados com *Agrobacterium*, *Ochrobactrum rhizosphaerae* e *Ochrobactrum tritici* (Figura 7).

Ochrobactrum rhizosphaerae foi descrita recentemente no solo com capacidade de utilizar sacarose e frutose como fontes de carbono (KAMPFER *et al.*, 2008), sendo neste estudo descrita aqui como endofítica em eucalipto. *Xantobacter flavus* é outra fixadora de N descrita há 36 anos com sistema similar a *Azotobacter* e utiliza muitos ácidos orgânicos. A maioria dos carboidratos é utilizada por esses micro-organismos após incubação prolongada (MALIK & CLAUS, 1979). Essas bactérias formam um clado distinto com alto *bootstrap*, o que garante a proximidade filogenética entre elas. Os genes de fixação de nitrogênio presentes podem ser uma das características que as aproximam filogeneticamente.

A maioria dos Firmicutes isolados das várias fases de desenvolvimento do eucalipto pertencente ao gênero *Bacillus* e o filo Alfaproteobacteria foi o que contribuiu com o maior número de gêneros distintos (Figura 6). *Bacillus* geralmente é a bactéria endofítica mais encontrada, sendo fonte de várias enzimas com grande potencial biotecnológico, como amilases, proteases, celulases e lipases (KANNAN *et al.*, 2015). Essas enzimas parecem ser fundamentais para o início da colonização endofítica (SEO *et al.*, 2010). Esses micro-organismos são capazes de produzir auxinas e giberelinas, em adição à fixação de nitrogênio, e secretar substâncias importantes no controle biológico de patógenos (BACON *et al.*, 2015).

O filo Betaproteobacteria foi o menos representativo entre os isolados e BAC 06 foi identificado como *Massilia timonae* (Figuras 6 e 7). Essa espécie é

colonizadora da rizosfera, raízes (OFEK *et al.*, 2012) e folhas (JACKSON *et al.*, 2013) e promotora de crescimento pela produção de AIA, sideróforos em várias espécies de planta. A sensibilidade de *Massilia timonae* à competição (OFEK *et al.*, 2012) pode ser a causa da incapacidade dela em manter-se em outras fases de desenvolvimento do eucalipto, fato que pode ter ocorrido também com outras espécies (Figura 6). Essa comunidade bacteriana endofítica em eucalipto é diversa e dependente dessas fases. Muitas delas são potencialmente diazotróficas e podem contribuir para a fixação de nitrogênio e promoção de crescimento (Figura 6).

A comunidade bacteriana endofítica em eucalipto *Eucalyptus* difere de acordo o órgão de isolamento, área geográfica do cultivo e a espécie de planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). Os poucos estudos existentes envolvendo essa planta mostraram a presença de *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp, *Curtobacterium* sp, *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* (CASTELLANOS *et al.*, 2010).

As espécies isoladas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto ainda não foram registradas em interação endofítica com essa planta. Este estudo, portanto, contribuiu com a inclusão de novas endofíticas em *Eucalyptus*, inclusive aquelas com potencial para fixação de nitrogênio (Figuras 6 e 7). O gênero *Novosphingobium* já foi descrito como endofítico (CASTRO *et al.*, 2014); entretanto, esse é o primeiro registro da espécie *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) como endofítica. Essa espécie está filogeneticamente relacionada com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7) e apresenta maquinaria genética que possibilita a adaptação em diversos habitat como solo, sedimentos e ambientes aquáticos (ADDISON *et al.*, 2007). O interior das folhas de eucalipto recém-saídas do sombreamento é outro importante habitat ocupado por *Novosphingobium barchamii* (Figura 6 e 7). Essa espécie utiliza glicose, sacarose e ramnose como fontes de carbono sendo isolada de solos contaminados com o inseticida hexaclorociclohexano (NIHARIKA *et al.*, 2013). *Rhizobium grahamii*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*

e *Terrabacter lappili* são outras novas espécies endofíticas isoladas de folhas de eucalipto (Figuras 6 e 7). Os altos valores de identidade e *bootstrap* confirmam a identificação dessas espécies como endofíticas (Figura 7). *Rhizobium* é comumente citado como endofítico em várias plantas, porém, a literatura consultada não aponta *Rhizobium grahami* como um deles. Essa bactéria pertence a um novo grupo filogenético de rizóbio, juntamente com *Rhizobium mesoamericanum* e outros (ALTHABEGOITI *et al.*, 2014). A presença de *Stenotrophomonas panacihumi* em interação com plantas é inédita (Figura 6), sendo até o momento encontrada apenas em solos cultivados com plantas medicinais (YI *et al.*, 2010). *Stenotrophomonas panacihumi* mostrou proximidade filogenética com *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas pavani* e *Stenotrophomonas maltophyla* (Figura 7), sendo essas duas últimas isoladas como endofíticas fixadoras em cana-de-açúcar (RAMOS *et al.*, 2014). *P. darwinianus* e *Panibacillus terrigena* são espécies incluídas em Firmicutes, o filo mais abundante entre os grupos bacterianos no ambiente como solos da Antártica (DSOUZA *et al.*, 2014), e rizosfera de bambú (HAN *et al.*, 2009). A habilidade de bactérias desse gênero em colonizar vários ambientes é atribuída à diversidade fisiológica pela formação de endósporos resistentes a estresse, à secreção de enzimas extracelulares e a compostos antimicrobianos. A presença dessas enzimas garante a hidrólise de uma variedade de carboidratos (PRIEST, 2009). A colonização inédita de *Panibacillus darwinianus* e *Panibacillus terrigena* em eucalipto ocorreu em plantas oriundas da expedição e campo, respectivamente (Figura 6). O filo actinobacteria é pouco explorado como fonte de novas bactérias endofíticas. Entretanto, mais recentemente, o número de relatos vem aumentando em várias plantas (BODENHAUSEN *et al.*, 2013; MIGUEL *et al.*, 2013; ROMERO *et al.*, 2014; LEFF *et al.*, 2014). Neste estudo, *Terrabacter lappili*, isolada de folhas de eucalipto em campo, é mais uma actinobacteria incluída entre as endofíticas (Figuras 6 e 7).

A comunidade bacteriana endofítica é parte importante do microbioma de eucalipto. Entre as bactérias que compõem essa comunidade estão as endofíticas diazotróficas, que podem contribuir com o nitrogênio necessário ao crescimento dessa planta. Entretanto, novas abordagens envolvendo a expressão de genes *nifH*, responsáveis pela fixação de N fazem-se necessárias. A descrição da diversidade desses micro-organismos em diferentes fases de desenvolvimento possibilita melhor compreensão sobre a dinâmica da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de bactérias endofíticas é etapa importante para determinar outros possíveis benefícios da interação endofítico-eucalipto e

determinar o papel ecológico que elas têm nessa interação.

CONCLUSÕES

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio. A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou-se distinta em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria. Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas*, e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento. A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.

REFERÊNCIAS

- ADDISON, S. L., FOOTE, S. M., REID, N. M & LLOYD-JONES, G. *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2467-2471, 2007.
- AL-BATAYNEH, K. M., JACOB, J. H & HUSSEIN E. I. Isolation and molecular identification of new thermophilic bacterial strain of *Geobacillus pallidus* and

Anoxybacillus flavithermus. **International Journal Integrative Biology**. v. 11, p. 39-43, 2011.

ALTHABEGOITI, M. J., ORMEÑO-ORRILLO, E., LOZANO, L., TEJERIZO, G. T., ROGEL, M. A., MORA, J & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Characterization of *Rhizobium grahamii* extrachromosomal replicons and their transfer among rhizobia. **BMC Microbiology**, 14, p. 1-14, 2014.

ALTIMIRA, F., YÁÑEZ, C., BRAVO, G., GONZÁLEZ, M., ROJAS, L. A & SEEGER, M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-12, 2012.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.

AQEL, H., AL-QUADAN, F & BOULENOUAR, N. Effects of temperature, pH-values and sodium chloride concentrations on the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by thermotolerant *Bacillus* strains. **Journal Bioscience Biotechnology**, v. 1, p. 57-65, 2012.

BACON, C. W., PALENCIA, E. R & HINTON, D. M. (2015). Abiotic and Biotic Plant Stress-Tolerant and Beneficial Secondary Metabolites Produced by Endophytic *Bacillus* Species. In: **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets** (pp. 163-177). Springer India.

BLACKWOOD, C. B., OAKS, A & BUYER, J. S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6193-6198, 2005.

BODENHAUSEN, N., HORTON, M. W & BERGELSON, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

BONIEK, D., FIGUEIREDO, D., PYLRO, V. S & DUARTE, G. F. Characterization of bacterial strains capable of desulphurisation in soil and sediment samples from Antarctica. **Extremophiles**, v. 14, p. 475-481, 2010.

BONITO, G., REYNOLDS, H., ROBESON, M. S., NELSON, J., HODKINSON, B. P., TUSKAN, G., SCHADT, C. W & VILGALYS, R. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3356-3370, 2014.

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

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 13, p. 79-148, 2000.

BULGARELLI, D., SCHLAEPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de Bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CASTRO, R. A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., BATISTA, B. D., LUVIZOTTO, D. M., MARCON, J., FERREIRA, A., MELO, I. S & AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springer Plus**, v. 3, p. 1-10, 2014.
- CHEN, Y & POLAND, T. M. Interactive influence of leaf age, light intensity, and girdling on green ash foliar chemistry and emerald ash borer development. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 806-815, 2009.
- CHEN, C & ZHU, H. Are common symbiosis genes required for endophytic rice-rhizobial interactions? **Plant Signaling & Behavior**, v 8, p. 1-4, 2013.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-Fixing Bacteria in *Eucalyptus globulus* Plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- DSOUSA, M., TAYLOR, M. W., TURNER, S. J & AISLABIE, J. Genome-Based Comparative Analyses of Antarctic and Temperate Species of *Paenibacillus*. **PloS One**, v. 9, p. e108009, 2014.
- EL-DEEB, B., FAYEZ, K & GHERBAWY, Y. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 1, p. 56-64, 2013.
- FERREIRA, A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., ODA, S., AZEVEDO, J. L & ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, p. 8-14, 2008.
- FIGUEROA, C. M., DIEZ, M. D. A., KUHN, M. L., MCEWEN, S., SALERNO, G. L., IGLESIAS, A. A & BALLICORA, M. A. The unique nucleotide specificity of the sucrose synthase from *Thermosynechococcus elongatus*. **FEBS Letters**, v. 587, p. 165-169, 2013.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. D. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting

- switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, p.19-27, 2011.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.
- HAN, J., XIA, D., LI, L., SUN, L., YANG, K & ZHANG, L. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Microbial Ecology**, v. 58, p. 363-373, 2009.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16, p. 463-471, 2008.
- HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K & WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.
- JACKSON, C. R., RANDOLPH, K. C., OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- KÄMPFER, P., SESSITSCH, A., SCHLOTTER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J & SCHOLZ, H. C. *Ochrobactrum rhizosphaerae* sp. nov. and *Ochrobactrum thiophenivorans* sp. nov., isolated from the environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1426-1431, 2008.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMBEL, S. W., O'CONNOR, T. K., ARNOLD, H. K., HUBBELL, S. P., WRIGHT, S. J & GREEN, J. L. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 13715-13720, 2014.
- KERFELD, C. A & SCOTT, K. M. Using BLAST to Teach “e-value-evolutionary” Concepts. **PLoS Biology**, v. 9, p. 1-4, 2011.
- KÖBERL, M., SCHMIDT, R., RAMADAN, E. M., BAUER, R & BERG, G. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-9, 2013.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p.
- KUKLA, M., PŁOCINICZAK, T & PIOTROWSKA-SEGET, Z. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. **Chemosphere**, v. 117, p. 40-46, 2014.

- LEFF, J. W., DEL TREDICI, P., FRIEDMAN, W. E & FIERER, N. Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees. **Environmental Microbiology**, p. 1-10, 2014.
- LI, X.; RUI, J., XIONG, J., LI, J., HE, Z., ZHOU, J., YANNARELL, A. C., RODERICK, I. & MACKIE, R. I. Functional Potential of Soil Microbial Communities in the Maize Rhizosphere. **PloS One**, v. 9, p. 1-9, 2014.
- LIBA, C. M., FERRARA, F. I. S., MANFIO, G. P., FANTINATTI-GARBOGGINI, F.,

ALBUQUERQUE, R. C., PAVAN, C., RAMOS, P. L., MOREIRA-FILHO, C. A

& BARBOSA, H. R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated

from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate

and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1076-1086, 2006.
- MALIK, K. A & CLAUS, D. Xanthobacter flavus, a new species of nitrogen-fixing hydrogen bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 29, p. 283-287, 1979.
- MANKESSI, F., SAYA, A. R., BOUDON, F., GUÉDON, Y., MONTES, F., LARTAUD, M., VERDEIL, J. L & MONTEUUIS, O. Phase change-related variations of dome shape in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems. **Trees**, v. 24, p. 743-752, 2010.
- MAPELLI, F., MARASCO, R., ROLLI, E., BARBATO, M., CHERIF, H., GUESMI, A., OUZARI, I., DAFFONCHIO, D & BORIN, S. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- MOHAMMAD, I & ALRAWASHDEH, I. Genetic Diversity Determination for Peganum Harmala Species using Shannon's, Simposn, Eveness, Density and Richness Parameters In Jordan. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 5, n. 2, p. 1-5, 2015.

- NAHER, U. A., RADZIAH, O., HALIMI, M. S., SHAMSUDDIN, Z. H & RAZI, I. M. Specific growth rate and carbon sugar consumption of diazotrophs isolated from rice rhizosphere. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 1008 – 1014, 2008.
- NIHARIKA, N., MOSKALIKOVA, H., KAUR, J., SEDLACKOVA, M., HAMPL, A., DAMBORSKY, J., PROKOP, Z & LAL, R. *Novosphingobium barchaimii* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 667–672, 2013.
- OFEK, M., HADAR, Y & MINZ, D. Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). **PloS One**, v. 7, p. e40117, 2012.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- PETERSEN, D. G & DAHLLÖF, I. Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 339-348, 2005.
- POLY, F., RANJARD, L., NAZARET, S., GOURBIÈRE, F & MONROZIER, L. J. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2255-2262, 2001.
- PORTAIS, J. C & DELORT, A. M. Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can ¹³C-NMR tell us? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 375-402, 2002.
- PRIEST, F. G (2009) Genus I. *Paenibacillus*. In: DE VOS. P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W *et al.*, editors. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Firmicutes**. 2nd ed. New York, USA: Springer. pp. 1422.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- RAMOS, P. L., VAN TRAPPEN, S., THOMPSON, F. L., ROCHA, R. C., BARBOSA, H. R., DE VOS, P & MOREIRA-FILHO, C. A. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 926-931, 2014.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 14, P. 435-443, 2011.

- RODIONOV, D. A., YANG, C., LI, X., RODIONOVA, I. A., WANG, Y., OBRAZTSOVA, A. Y., ZAGNITKO, O. P., OVERBEEK, R., ROMINE, M. F., REED, S., FREDRICKSON, J. K., NEALSON, K. H & OSTERMAN, A. L. Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. **BMC Genomics**, v. 11, p. 494, 2010.
- ROMERO, F. M., MARINA, M & PIECKENSTAIN, F. L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, p. 187-194, 2014.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, v. 33, p. 152-155, 2006.
- STEINBAUER, J. Shoot feeding as a nutrient acquisition strategy in free-living psyllids. **PloS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.

- VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M., CRUZ-VÁZQUEZ, F., TREJO-CONTRERAS, M. J., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., BRAVO-PATÍÑO, A., CAJERO-JUÁREZ, M., CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P. & VALDEZ-ALARCÓN, J. J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 137-149, 2011.
- VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J & LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209-216, 2010.
- YI, H., SRINIVASAN, S & KIM, M. K. *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **The Journal of Microbiology**, v. 48, p. 30-35, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou-se eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de bactérias, fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade. Os fungos e leveduras dos filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica e de leveduras endofíticas.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilêmáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

A excisão, a eluição e o sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostraram ser boas técnicas para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto. Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto.

Em eucalipto, a relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a de levedura, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto.

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio.

A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto variou em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL

DIVERSIDADE E MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M635d Miguel, Paulo Sérgio Balbino, 1981-
2015 Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto /
Paulo Sérgio Balbino Miguel. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 125f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

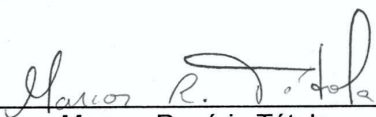
1. Eucalipto - Microbiologia. 2. Fungos.
3. Bactérias endofíticas. 4. Leveduras. 5. Filogenia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 634.973766

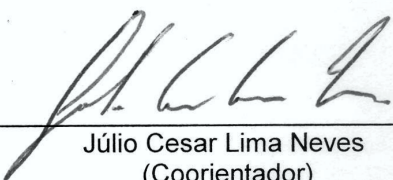
DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

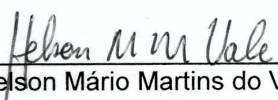
APROVADA: 29 de maio de 2015.



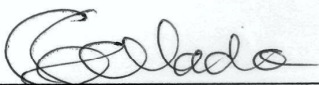
Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)



Júlio Cesar Lima Neves
(Coorientador)



Helson Mário Martins do Vale



Gleiber Quintão Furtado



Maurício Dutra Costa
(Orientador)

A Deus.

*À minha esposa,
à minha mãe e ao meu irmão.*

Dedico.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; mas os insensatos
desprezam a sabedoria e a instrução”. (Prov.1:7)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor e consumidor da minha fé.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pela orientação e pela confiança.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pela orientação no início deste trabalho.

Aos professores Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves, pela coorientação.

À minha amada esposa Mara, que me incentivou todos os dias com seu amor, dedicação, paciência, confiança e compreensão.

À minha mãe, D. Aparecida, que sempre lutou e me sustentou em oração.

Ao meu irmão Fábio, um grande amigo e incentivador.

Aos amigos Julio Delvaux, Marcelo Nagem e Bruno Coutinho Moreira, pelo apoio, pela amizade e pelo auxílio neste trabalho.

Aos irmãos da Igreja Metodista Wesleyana de Viçosa, pelas orações feitas pela minha vida.

A todos que de alguma forma me ajudaram na condução deste trabalho.

BIOGRAFIA

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL, filho de Francisco de Oliveira Miguel e de Aparecida de Fátima Balbino Miguel, nasceu em Astolfo Dutra – MG, no dia 19 de junho de 1981.

Em dezembro de 2008 graduou-se em Ciências Biológicas pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. Em fevereiro de 2011, obteve o título de *Magister Science* em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, e, em março do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da mesma instituição, submetendo-se à defesa da tese de doutorado em maio de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
CAPÍTULO 1.....	04
INTRODUÇÃO.....	05
REVISÃO DE LITERATURA	06
Endofíticos	06
Colonização da planta.	08
Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos	11
Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos.....	13
Eucalipto	16
Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto	18
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2.....	29
RESUMO	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
Área de estudo.....	32
Amostragem	33
Descontaminação superficial das folhas de eucalipto	34
Extração de DNA metagenômico em folhas e exsudatos xilemáticos.....	34
Análises da diversidade de fungos endofíticos	35
Análise filogenética	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 3.....	57
RESUMO	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS	60
Áreas de estudo	60

Amostragem	61
Descontaminação superficial de folhas.....	61
Extração de DNA metagenômico em folhas.....	62
Extração de açúcares	62
Análise da diversidade de fungos e leveduras	63
Análise filogenética	65
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
CAPÍTULO 4	90
RESUMO	91
INTRODUÇÃO	92
MATERIAL E MÉTODOS	93
Área de estudo	93
Amostragem	94
Descontaminação superficial de folhas	94
Extração de DNA metagenômico	95
Análise da diversidade de bactérias endofíticas totais e diazotróficas.....	96
Isolamento de bactérias endofíticas.....	97
Extração de DNA de culturas puras	97
BOX-PCR.....	98
Amplificação e Sequenciamento do rRNA 16S	98
Análise filogenética	99
RESULTADOS	99
DISCUSSÃO	110
CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS.....	117
CONCLUSÕES GERAIS.....	124

RESUMO

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2015. **Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves.

Árvores pertencentes ao gênero *Eucalyptus* estão entre as mais cultivadas em todo o mundo. O rápido crescimento do eucalipto e a sua adaptabilidade a vários ambientes podem ser compreendidos pelo estudo da comunidade microbiana presente nessa planta. Essa comunidade é composta por micro-organismos endofíticos e epifíticos. Endofíticos colonizam os tecidos internos de plantas saudáveis sem causar sintomas ou efeitos negativos à planta. Neste estudo, foram avaliadas a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de plantas de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco. Avaliou-se, também, a diversidade de bactérias, fungos e leveduras em plantas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo. A diversidade microbiana foi relacionada à concentração de açúcares. Após extração de DNA de folhas e exsudatos xilemáticos, os *amplicons* obtidos por amplificação das subunidades do rRNA 16S, 18S e 26S foram utilizados na DGGE e as bandas eluídas dos géis foram sequenciadas. A avaliação da composição da comunidade bacteriana em folhas do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo também foi comprovada pelo isolamento e sequenciamento do rRNA 16S das colônias. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela idade das plantas e pela sazonalidade. A análise filogenética mostrou a dominância de fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota. Neste estudo, foi apresentado o relato inédito de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos em plantas. No viveiro, a colonização endofítica da parte aérea de eucalipto foi dependente das fases de desenvolvimento da planta. Neste estudo, foi relatada pela primeira vez a presença das leveduras dos gêneros *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia* e das espécies *Rhodosporidium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* como endofíticas em eucalipto. Bactérias dos filos Firmicutes, Proteobacteria, classes Alfa, Beta e Gamma, e Actinobacteria foram identificadas

na comunidade investigada. Nessa comunidade, as espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* foram identificadas pela primeira vez como endofíticas. Proteobacteria foi o filo mais representativo em folhas de mudas nas fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento; e Firmicutes, em plantas a campo. Observaram-se correlações negativas entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de diversidade e riqueza microbianas. A distribuição das espécies de fungos, leveduras e bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento da planta. Algumas espécies bacterianas encontradas apresentam potencial para fixação de nitrogênio.

ABSTRACT

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, May, 2015. **Endophytic microbial diversity in Eucalypts**. Adviser: Maurício Dutra Costa. Co-advisers: Marcos Rogério Tótola and Júlio César Lima Neves.

Plants belonging to the *Eucalyptus* genus are among the most cultivated in the world. Eucalypts are fast-growing plants and their ability to adjust to a variety of environments can be understood by studying the associated microbiome. Eucalypt microbiome is composed by endophytic and epiphytic microorganisms. Endophytes colonize the internal tissues of healthy plants without causing symptoms or negative effects. In this study, the endophytic fungal diversity and distribution were evaluated in leaf and xylematic exudates from 18- and 72-month-old eucalypt plants in the beginning of the rainy season, in the rainy season and in the dry season. The bacterial, fungal, and yeast diversity in plants from different developmental stages was also evaluated: clonal garden, shading, post-shading, expedition and field. The microbial diversity was correlated with the sugar concentration in leaves. Following DNA extraction from leaf and xylematic exudates, amplicons generated by the amplification of 16S, 18S, and 26S rRNA subunits were submitted to DGGE, and the bands excised were sequenced. Bacterial community composition in leaves from the clonal garden, shading, post-shading, expedition, and field was also evaluated and confirmed by isolating bacteria and sequencing the 16S rRNA from bacterial colonies. Endophytic fungal community in leaves was affected by plant age and seasonality. Phylogenetic analyses revealed the dominance of Basidiomycota and Ascomycota phyla during the development stages studied. In this work, the first report of *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi*, and *Teratosphaeriaecea* sp. as inhabitants of the xylematic exudates in plants is provided. In the nursery, endophytic colonization of eucalypt shoots was dependent on the plant developmental stages. In this study, the yeasts *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia*, *Rhodosporidium fluviale*, and *Aureobasidium pullulans* were described as endophytic for the first time. Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, and Gamma- classes) and Actinobacteria were identified in the endophytic community. *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, and *Terrabacter lappili* were identified as endophytic for the first time. Proteobacteria was the most represented phylum in

leaves from the shading and post-shading stages, while Firmicutes was the main phylum found in leaves of plants in the field. Negative correlations were observed between the glucose, fructose, and sucrose contents in leaves and the microbial diversity and richness indices measured. The distribution of endophytic fungal, yeast, and bacterial species in eucalypt revealed to be distinct and specific to the developmental stage of eucalypt plants. Some of the bacterial species found in eucalypt leaves show the potential for nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade de adaptação das plantas ao ambiente envolve interações com diferentes espécies de micro-organismos. Dentre essas, as interações endofíticas são amplamente conhecidas pelos benefícios proporcionados ao hospedeiro, os quais incluem o estímulo ao crescimento pela fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), a síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e a supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006). Os micro-organismos endofíticos encontram-se associados a plantas saudáveis, sem causar sintomas de doença ou danos. Podem melhorar o estado sanitário (CLARKE *et al.*, 2006) e o desenvolvimento da planta (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012), o que justifica o grande volume de pesquisas sobre esses micro-organismos (BRADER *et al.*, 2014).

O eucalipto está entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta e a sua elevada produção de biomassa demandam alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004). Muitos desses nutrientes podem ser absorvidos mais eficientemente quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Portanto, estudos envolvendo essas comunidades podem proporcionar melhor compreensão das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento das plantas (BRADER *et al.*, 2014). O entendimento da diversidade dos endofíticos em associação com as plantas pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

O acesso à diversidade microbiana pode ser obtido por abordagens moleculares por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos, proporcionando novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; DA SILVA *et al.*, 2014). Este estudo compreende quatro capítulos. O capítulo 1 teve como objetivo revisar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração e colonização e os métodos de identificação de micro-organismos na planta. No capítulo 2 foi estudada a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilêmáticos em plantas

de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. No capítulo 3 foi avaliada a diversidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento e relacionada à concentração de açúcares. No capítulo 4 foi investigada a diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto em plantas provenientes do jardim clonal, do sombreamento, recém-saídas do sombreamento, da expedição e do campo e relacionadas à concentração de açúcares.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS:
COLONIZAÇÃO, BENEFÍCIOS, IDENTIFICAÇÃO E
DIVERSIDADE EM EUCALIPTO**

INTRODUÇÃO

As plantas sustentam diversidade variável de micro-organismos, que podem influenciar o seu desenvolvimento (SUMAN *et al.*, 2005). Parte dessa diversidade é composta por bactérias (MIGUEL *et al.*, 2013), fungos (DESHMUKH *et al.*, 2006), arqueas e leveduras (OLIVEIRA *et al.*, 2013) endofíticos, os quais interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença (BULGARELLI *et al.*, 2013). Esses micro-organismos têm alto potencial de adaptação e muitos deles persistem ao longo de vários estádios de desenvolvimento da planta (HARDOIM *et al.*, 2008). Quando em interação, eles são responsáveis por estimular o crescimento por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e pela supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, sendo de grande valor econômico e alternativa viável para a indústria madeireira (FAO, 2015). As espécies e híbridos de eucalipto estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, e a madeira é usada para a produção de celulose em função da rápida taxa de crescimento, da adaptação a várias condições ecológicas e pela qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta demanda alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004), os quais podem ser melhor acessados quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo das comunidades microbianas associadas ao eucalipto pode proporcionar melhor entendimento das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento vegetal (BRADER *et al.*, 2014).

O acesso à diversidade microbiana pode ocorrer por métodos moleculares que dependem (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou não de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A diversidade microbiana em eucalipto é pouco documentada (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), malgrado a importância econômica da cultura para o país, que é o maior produtor mundial. O objetivo desta revisão foi levantar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração, colonização e os métodos de identificação desses micro-organismos na planta, com base em dados atuais sobre o assunto.

REVISÃO DE LITERATURA

Endofíticos

Micro-organismos são essenciais para a manutenção da vida na Terra, mas pouco se sabe sobre a diversidade microbiana presente no solo, nos oceanos, na atmosfera, nos seres humanos e nas plantas (TURNER *et al.*, 2013). No interior das raízes, nas folhas e em outras partes da planta, comunidades microbianas distintas proporcionam melhor acesso da planta aos nutrientes e auxiliam na supressão de diversas doenças (SMITH, 2014). O termo endofíticos se refere a micro-organismos que, em alguma fase de seu ciclo de vida, vivem em associação com plantas saudáveis, sem causar sintoma de doença ou prejuízo ao hospedeiro. Esses micro-organismos adaptam-se ao habitat específico representado pelo corpo das plantas, apresentando potencial metabólico distinto da microbiota do solo (BRADER *et al.*, 2014).

No contexto da interação endofítica, as bactérias que se destacam são pertencentes aos filos Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma), Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (BACON & HINTON, 2007). Já os fungos endofíticos estão distribuídos, em sua maioria, nos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011). A detecção dos micro-organismos endofíticos é realizada por métodos culturais ou moleculares (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A densidade populacional de micro-organismos endofíticos é variável e depende das espécies endofíticas, do genótipo da planta, do estágio de desenvolvimento, das condições ambientais (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO 2006), da localização do cultivo (FISHER *et al.*, 1993) e da parte da planta em associação (MAGNANI *et al.*, 2010). As associações endofíticas podem, ainda, mostrarem-se dependentes de muitos fatores, incluindo o tipo de hospedeiro, a densidade de plantas no local, a disponibilidade de nutrientes no solo e as interações com outros micro-organismos (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011).

O sucesso da colonização endofítica depende da expressão de genes cujos produtos serão importantes para a entrada e a sobrevivência do micro-organismo no interior do hospedeiro (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). A planta que abriga associações endofíticas compartilha recursos com os parceiros microbianos, codificando diversos transportadores no genoma que permitem a transferência de carbono de si para a microbiota associada (TAGHAVI *et al.*, 2010).

A interação endofítica pode impactar a nutrição, a adaptação e o desenvolvimento vegetal (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012) e, por meio

da competição, suprimir patógenos e melhorar a sanidade das plantas (CLARKE *et al.*, 2006; SATHISH *et al.*, 2012). Os micro-organismos endofíticos podem também beneficiar a planta pelo aumento da resistência a estresses abióticos (NAGABHYRU *et al.*, 2013).

A existência da interação planta-micro-organismo endofítico tem sido constatada em frutos (MIGUEL *et al.*, 2013), caules, folhas (PROCÓPIO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2008; TUPPAD & SHISHUPALA, 2014), raízes (TUPPAD & SHISHUPALA, 2014) e em outras partes da planta. Hipotetiza-se que a entrada de micro-organismos endofíticos seja controlada pela planta e pelas condições ambientais (HARDOIM *et al.*, 2008). Algumas evidências sugerem que a planta tem papel ativo na seleção de certos micro-organismos para a vida endofítica. No entanto, os mecanismos pelos quais isso é feito ainda não são conhecidos (HARDOIM *et al.*, 2008). Micro-organismos endofíticos que ocupam o mesmo nicho em diferentes plantas podem ser muito distintos taxonomicamente (TURNER *et al.*, 2013).

A capacidade de micro-organismos endofíticos de colonizarem os tecidos internos das plantas pode conferir vantagens ecológicas quando esses são comparados aos micro-organismos epifíticos. O habitat representado pelo ambiente interno do corpo das plantas é mais protegido de variações extremas de temperatura, do potencial osmótico, da radiação ultravioleta e da competição com outros micro-organismos (HALLMAN *et al.*, 1997).

Em relação ao ciclo de vida, os micro-organismos endofíticos podem ser obrigatórios ou facultativos. Micro-organismos endofíticos obrigatórios são estritamente dependentes da associação com a planta para o crescimento e a sobrevivência. Em contrapartida, os facultativos apresentam ciclo de vida bifásico, alternando entre a planta e o ambiente (HARDOIM *et al.*, 2008). O estilo de vida facultativo é o mais comum. Os micro-organismos endofíticos obrigatórios, em face da menor competição com outros micro-organismos no interior da planta, podem apresentar arsenal químico menos rico em relação àqueles da rizosfera e da filosfera. Entretanto, os micro-organismos endofíticos podem produzir metabólitos mais específicos que podem sustentar a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014). Os colonizadores facultativos, por sua vez, têm de ser capazes de sobreviver na rizosfera antes de adentrar a planta, podendo produzir metabólitos inibitórios a outros micro-organismos ou que facilitem a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014).

Colonização da planta

A rizosfera corresponde ao volume de solo influenciado pelas raízes da planta. A diversidade microbiana rizosférica é alta por ser esse ambiente rico em fontes de energia prontamente disponíveis (BRADER *et al.*, 2014), provenientes da rizodeposição de mucilagens e exsudatos (PHILIPPOT *et al.*, 2013). A relação entre micro-organismos endofíticos e rizosféricos é bastante próxima. Muitos deles penetram o hospedeiro pelas raízes (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009) e colonizam novos habitat, escapando da competição intensa vigente na rizosfera (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Entretanto, existem características distintas entre os micro-organismos rizosféricos e os endofíticos, uma vez que nem todas as populações microbianas da rizosfera podem adentrar a planta, modificar seu metabolismo e adaptar-se ao ambiente interno dos tecidos vegetais (TURNER *et al.*, 2013). Muitos micro-organismos competentes na rizosfera podem, coincidentemente, tornarem-se endofíticos após entrarem na planta via raiz, mas a falta de genes-chave para o sucesso ecológico daqueles em endofitismo não permite a persistência no hospedeiro. A competência endofítica é adquirida pela expressão de genes que devem contribuir para a persistência e para o sucesso da colonização dos espaços internos da planta (HARDOIM *et al.*, 2008).

A rizosfera é região de elevada competição entre as populações microbianas aí presentes. Proteobactérias de rápido crescimento, denominadas estrategistas-r, são capazes de se instalar no solo rizosférico e de utilizar ampla diversidade de compostos de carbono derivados das raízes. Não somente bactérias prosperam rapidamente na rizosfera rica em nutrientes, mas também fungos, oomicetos, vírus e arqueas (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Os pontos de emergência de raízes laterais e a zona de diferenciação e alongamento das raízes são locais proeminentes para ingresso ativo de micro-organismos. Nesses locais, os tecidos não completamente diferenciados podem facilitar a penetração microbiana (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Os espaços intercelulares da epiderme, das regiões corticais e das células vegetais lisadas são os principais locais de colonização, com densidades de até 10^{10} células/cm³ (CHI *et al.*, 2005). Os tecidos vasculares e as células do xilema também podem ser invadidos, embora, muitas vezes, em densidades mais baixas (COMPANT *et al.*, 2010). No caso específico de fungos, geralmente, a infecção endofítica nas folhas ocorre horizontalmente por meio de esporos trazidos pelo ar (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

A colonização endofítica bacteriana pode ocorrer em três etapas. Na primeira, ela move-se em direção às raízes da planta passivamente, através do fluxo de água do solo, ou ativamente, por meio da atividade flagelar induzida por compostos liberados pelo hospedeiro (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008), em mecanismo de quimiotaxia. Em *Azospirillum*, por exemplo, a quimiotaxia é induzida por açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outros compostos (COMPANT *et al.*, 2005). Para tal, genes envolvidos no reconhecimento dos compostos e quimiotaxia devem ser ativados. A expressão de genes envolvidos na quimiotaxia em *Pseudomonas aeruginosa*, a exemplo de *cheY*, *cheA* e *pctA*, que codificam, respectivamente, um regulador de resposta de dois componentes, um regulador de resposta de quimiotaxia e uma proteína quimiostática, é regulada negativamente pelos exsudados de uma cultivar de beterraba, mas não por exsudados de outra cultivar. Assim, a composição dos exsudados depende da cultivar, da exposição da planta ao estresse e do estágio de desenvolvimento, o que pode resultar em diferenças na comunidade bacteriana rizosférica e, consequentemente, da endofítica (COMPANT *et al.*, 2010).

Numa segunda etapa, a adsorção não específica da bactéria às raízes, seguida pelo ancoramento das mesmas, vai ocorrer (SPRENT & DEFARIA, 1988). Uma vez ligadas às raízes, as bactérias sofrem várias divisões celulares e se estabelecem em microcolônias (HARDOIM *et al.*, 2008). Por fim, as bactérias endofíticas podem alcançar o interior da planta por meio de tecidos danificados que surgem naturalmente como resultado do crescimento vegetal, pelos radiculares, por junções epidérmicas ou, ainda, via ferimentos (SPRENT & DEFARIA, 1988. HARDOIM *et al.*, 2008). Dentro da planta, a colonização pode ser sistêmica, pela migração através do sistema vascular e do apoplasto, ou local, como nos tecidos do córtex e do xilema (HALLMANN *et al.*, 1997).

Em bactérias gram-negativas, o antígeno-O da camada LPS pode contribuir para a colonização radicular, processo dependente da espécie bacteriana envolvida. Outra estrutura importante na colonização é o pílus do tipo IV, o qual é essencial para o estabelecimento de microcolônias de *Azoarcus* nas raízes de gramíneas (DÖRR *et al.*, 1998).

A colonização bem sucedida inclui genes envolvidos na quimiotaxia, formação de flagelos e pili, além de várias vias metabólicas e sistemas de transporte (COMPANT *et al.*, 2010). A análise do genoma de *Klebsiella pneumoniae* demonstrou que essa espécie apresenta características típicas de bactérias diazotróficas, anaeróbias facultativas e endofíticas, com a presença de genes

envolvidos na degradação de carboidratos, de compostos aromáticos e celulolíticos, na ciclagem de nutrientes e de carbono e na capacidade de formar associações endofíticas (FOUNTS *et al.*, 2008).

A penetração de fungos endofíticos dá-se por hifas de penetração ou apressórios pela parte basal dos pelos radiculares. A ramificação das hifas formam muitos clamidóporos preenchendo todo o pelo radicular (ERNST *et al.*, 2003; DESHMUKH *et al.*, 2006). Essa penetração pode dar-se de maneira semelhante em outras partes da planta, como folhas e caules, e, também, por ferimentos, incluindo os causados por herbivoria e outros mecanismos. Fungos endofíticos não penetram as células das plantas e, geralmente, se abrigam nos espaços intercelulares, enquanto utilizam baixos níveis de nutrientes nos fluidos intercelulares, não proporcionando danos ao hospedeiro (GAO *et al.*, 2005). As sementes podem funcionar como veículo de transporte de propágulos fúngicos para a próxima geração de hospedeiros (ERNST *et al.*, 2003).

A colonização endofítica é possível pela grande diversidade de enzimas produzidas pelo micro-organismo, tais como celulasas, pectinases e xilanasas (SEO *et al.*, 2010; KANNAN *et al.*, 2015). A degradação enzimática da parede celular tem sido observada no momento da colonização da epiderme radicular, mas não nos espaços intercelulares do córtex; porém, muito pouco é conhecido sobre a regulação desses processos. Entretanto, sabe-se que a liberação constitutiva de hidrolases não é desejada, uma vez que poderia resultar em patogenicidade (HALLMAN *et al.*, 1997). Os níveis de enzimas degradadoras da parede celular produzidas por bactérias diferenciam as endofíticas, com baixos níveis, das patogênicas, com níveis altos e danosos (HARDOIM *et al.*, 2008).

A colonização das folhas é afetada por estruturas, como vasos condutores, pelos e estômatos. A comunidade residente no interior da planta, quando comparada ao exterior, está em habitat sujeito a maiores flutuações de temperatura, umidade e radiação (TURNER *et al.*, 2013). Esses fatores alteram a fisiologia da planta e, aliados a outros, como estágio de crescimento, tipo de solo, regime hídrico, manejo e densidade de bactérias, podem promover a mudança na estrutura da comunidade endofítica (HARDOIM *et al.*, 2012). Outro fator que diferencia as comunidades endofíticas é a idade das plantas, com as mais jovens apresentando maior densidade que as mais maduras (TURNER *et al.*, 2013).

A complexidade da interação endofítica e a sua contribuição para as plantas justificam novos estudos. O rápido avanço nas tecnologias de sequenciamento de nova geração e no processamento e interpretação dos dados gerados possibilita o

conhecimento da amplitude da diversidade microbiana nesse ambiente (KEMLER *et al.*, 2013). A abordagem metabolômica possibilita o acesso a informações mais amplas sobre a composição dos metabólitos produzidos pelas plantas (JORGE *et al.*, 2014). A interação de plantas com bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio necessita ser mais bem compreendida e caracterizada (CARVALHO *et al.*, 2014b). O acesso à diversidade desses micro-organismos é a etapa inicial e relevante para esse entendimento (TAGHAVI *et al.*, 2010), e estudos da expressão de genes podem possibilitar a identificação das diversas vias metabólicas envolvidas nessas associações (CARVALHO *et al.*, 2014b).

Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos

A interação entre micro-organismos endofíticos e plantas contribui para a adaptação a diversos nichos e para a produção de vários metabólitos que podem ser importantes na aquisição de nutrientes pela planta (BRADER *et al.*, 2014).

A disponibilidade de nitrogênio é um dos fatores que mais limitam o crescimento vegetal, requerendo a adição do elemento ao solo em altos níveis para a manutenção da produtividade agrícola (OLDROYD & DIXON, 2014). A fixação biológica é importante fonte de nitrogênio na agricultura e representa alternativa promissora à fertilização química. Bactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (SUMMAN *et al.*, 2005; OLDROYD & DIXON, 2014), e os endofíticos podem contribuir significativamente para o sucesso de abordagens biotecnológicas visando o suprimento de nitrogênio às culturas.

A capacidade de fixar nitrogênio é encontrada nos principais grupos filogenéticos bacterianos (OLDROYD & DIXON, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas são geneticamente diversas, sendo identificadas principalmente entre as Proteobacterias (Alfa-, Beta- e Gamma), a exemplo dos gêneros *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Esses micro-organismos possuem o complexo enzimático da nitrogenase (ARAÚJO *et al.*, 2014), sendo a maquinaria de fixação e de regulação do processo muito similar à de *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Interações planta-bactérias diazotróficas ocorrem em diferentes níveis, podendo apresentar especificidade em relação ao hospedeiro (ARAÚJO *et al.*, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas podem expressar os genes *nifH*, além de outros, importantes ao processo de fixação biológica, podendo contribuir com quantidades significativas de N para a planta (TURNER *et al.*, 2013).

Bactérias, leveduras e fungos endofíticos podem produzir fitormônios, principalmente ácido indol acético (AIA) (WAQAS *et al.*, 2012; HOFFMAN *et al.*, 2013; NUTARATAT *et al.*, 2014). Além do AIA, as giberelinas, as citocininas e o ácido abscísico podem também ser sintetizados por esses micro-organismos e disponibilizados para as plantas (KHAN *et al.*, 2012; GAIERO *et al.*, 2013). As auxinas e as citocininas estão envolvidas nos processos regulatórios que determinam a arquitetura da raiz. Já as giberelinas são importantes nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, promovendo o aumento do crescimento caulinar e radicular e da densidade dos pelos radiculares (CARVALHO *et al.*, 2014a). Os fitormônios são os principais agentes que regulam a resposta da planta frente às mudanças ambientais (MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2009). Além disso, podem atuar como antimicrobianos, a exemplo do ácido fenil-acético, produzido por *Azospirillum brasiliense*, com atividade antagonica a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011).

A microbiota endofítica pode melhorar a sanidade vegetal por meio da produção de moléculas antagonistas a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011). A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, pode ser controlada pela secreção de substâncias antimicrobianas que impedem a germinação dos uredósporos (SHIOMI *et al.*, 2006). Os melhores resultados com esse tipo de controle são obtidos com o uso de *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Klebsiella pneumoniae* (SHIOMI *et al.*, 2006).

A proteção da planta por bactérias endofíticas pode ocorrer pela perturbação do *quorum-sensing*, mecanismo necessário para a virulência em alguns patógenos. Esse mecanismo geralmente é mediado pelas *N*-acil homoserina lactonas (AHLs). A produção de lactonases degradadoras de AHLs por bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Klebsiella* pode interferir na comunicação patógeno-patógeno e impedir a expressão de genes de virulência (FRIESEN *et al.*, 2011).

A produção de alcalóides por fungos endofíticos pode reduzir a herbivoria, resultando na diminuição do consumo de folhas e sementes por animais (FRIESEN *et al.*, 2011). Da mesma forma, o uso de endofíticos pode ser estratégia interessante no controle biológico (TURNER *et al.*, 2013). Leveduras endofíticas produzem enzimas hidrolíticas, a exemplo das celulases, quitinases, glucanases e proteases, que degradam quitina, β -1,3-glucana, manoproteínas e celulose, componentes da parede celular de vários fungos fitopatogênicos (NATURAT *et al.*, 2014).

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* são reconhecidamente produtoras de antibióticos, compostos voláteis, substâncias antifúngicas, antivirais e inseticidas (TURNER *et al.*, 2013). Já alguns fungos, principalmente os representantes do filo Ascomycota, são eficientes produtores de compostos antibacterianos (DESHMUKH *et al.*, 2014) e de compostos oxidantes durante a colonização vegetal. A produção de antioxidantes está ligada ao aumento da tolerância ao estresse em plantas hospedeiras (WHITE-JÚNIOR & TORRES, 2010).

Os micro-organismos endofíticos são, portanto, fontes de novos produtos naturais, com potencial biotecnológico. Dada a capacidade dos mesmos de degradar compostos orgânicos, são importantes na biorremediação e na fitorremediação (RYAN *et al.*, 2008). Com a utilização de técnicas de engenharia genética, podem ainda ser melhorados no que concerne ao potencial de degradação de compostos xenobióticos (BARAC *et al.*, 2004).

Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos

O critério para distinguir micro-organismos endofíticos requer a desinfestação da superfície da planta pela utilização de álcool 70%, hipoclorito de sódio 3% e água esterilizada, em tempos variáveis a depender do tecido vegetal utilizado. Essa etapa visa à eliminação de epifíticos presentes na filosfera (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Após a desinfestação das partes vegetais desejadas, a diversidade microbiana endofítica pode ser acessada pela utilização de análises moleculares das comunidades por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.*, 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A comprovação da natureza endofítica dos micro-organismos extraídos das plantas pode ser obtida pelo plaqueamento da última água de lavagem do procedimento de desinfestação da planta, ou pela incubação de partes do material vegetal submetido à desinfestação superficial (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). O tempo de incubação e o meio de cultura utilizado são dependentes do micro-organismo que se deseja estudar.

A análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) é um dos métodos dependentes de cultivo utilizados como discriminadores taxonômicos para a identificação de espécies em comunidades microbianas (HILL *et al.*, 2000). Esse método consiste na esterificação dos lipídeos extraídos da amostra, seguida da

separação e identificação por cromatografia gasosa desses compostos. A identificação é baseada nos tempos de retenção da amostra na coluna cromatográfica, comparados aos tempos de retenção de padrões submetidos ao mesmo processo (KIRK *et al.*, 2004). Esse método é utilizado para se estudar a composição das comunidades microbianas, bem como as mudanças nas populações em razão da presença de contaminantes químicos no ambiente (SICILIANO & GERMIDA, 1998) ou, ainda, para a identificação de isolados de bactérias endofíticas de plantas (VEGA *et al.*, 2008; MIGUEL *et al.*, 2013).

A identificação de isolados bacterianos desconhecidos de uma amostra também pode ser realizada pelo sequenciamento do gene rDNA 16S e subsequente comparação da sequência obtida com as depositadas nos bancos de dados, como o *Genbank* (National Center for Biotechnology Information) (TEMMERMAN *et al.*, 2004). O gene rRNA 16S é alvo de estudos de diversidade porque está presente em todos os organismos procariotos, sendo pouco sujeito à transferência horizontal (KIRK *et al.*, 2004). A sequência do gene rRNA 16S contém regiões variáveis espécie-específica, o que permite a identificação dos isolados bacterianos em nível de espécie (CAI *et al.*, 2003). Esse gene é, portanto, o de escolha para a construção de *primers*, reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e alinhamento de sequências (HARDOIM *et al.*, 2012; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Com esse tipo de análise, é possível conhecer os gêneros bacterianos em mais de 90% dos casos e as espécies entre 65 a 83% (JANDA & ABBOTT, 2007). Quando o poder discriminatório não é suficiente, a análise filogenética exclui outros gêneros e espécies. Assim, os dados de sequenciamento são mais apurados em razão das relações filogenéticas disponíveis (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). Uma limitação considerável da técnica ocorre quando duas espécies bacterianas distintas compartilham sequência rRNA 16S muito similares (WOO *et al.*, 2008).

O sequenciamento do gene rRNA 16S origina dados não ambíguos e reprodutíveis, mesmo para isolados raros (DRANCOURT *et al.*, 2000), tendo se tornado método de referência para a taxonomia e a identificação bacterianas (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). O uso de sequências do rRNA 16S tem levado à reclassificação e à renomeação de gêneros e espécies bacterianas, além de permitir a classificação de micro-organismos não-cultivados e facilitar a descoberta e a classificação de novas espécies (WOO *et al.*, 2008).

A identificação de espécies fúngicas e de leveduras é obtida pela sequência de DNA do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA 18S ou pelo fragmento rRNA

18S (NILSSON *et al.*, 2008). ITS é uma região multicópia que nos eucariotos é compreendida por uma região não codificante, uma codificadora e outra não codificante. A variabilidade dessa região proporciona resolução suficiente para identificação de fungos e leveduras (ARNOLD, 2007). Já a região D1/D2 do gene rRNA 26S e o sequenciamento desse domínio têm proporcionado a identificação de espécies de leveduras de forma rápida e precisa (HESHAM *et al.*, 2014).

A análise do perfil fisiológico das comunidades é outro método dependente de cultivo para análise da diversidade microbiana. Através dele é possível determinar a capacidade do micro-organismo em utilizar diferentes fontes de carbono *in vitro*. Essa metodologia é baseada no uso de microplacas contendo 190 fontes alternativas de carbono. A técnica é importante quando se avalia a diversidade metabólica potencial de comunidades microbianas em diferentes ambientes (KIRK *et al.*, 2004; BOCHNER, 2009). A abordagem polifásica é baseada na combinação entre características morfológicas e bioquímicas das espécies de micro-organismos com informações de sequências e reconstrução filogenética, sendo a escolha para estudos de caracterização da comunidade microbiana (VANDAMME *et al.*, 1996), por tornar as análises mais robustas (STACKEBRANDT & EBERS, 2006).

Diferentemente das endossimbioses ou dos sistemas patogênicos bem estudados, as bases moleculares das interações endofíticas ainda não são bem compreendidas (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Análises genômicas comparativas poderão fornecer melhor compreensão da dinâmica da comunidade, sinalização e funções nas associações endófito-planta (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Estudos dependentes de cultivo são importantes; entretanto, não permitem o acesso à totalidade da diversidade microbiana. A utilização de tecnologias de sequenciamento *high-throughput* nos últimos anos tem permitido a identificação de milhares a milhões de sequências nas amostras, revelando, inclusive, espécies raras. A abordagem metagenômica revela a diversidade da comunidade microbiana em interação com a planta (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação do metagenoma pode ser realizada por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), o qual é satisfatório para avaliação da diversidade, mas limitado para detecção de espécies (DAVID *et al.*, 2014). Os fragmentos de DNA de mesmo tamanho, amplificados por PCR, são submetidos à eletroforese em gel com gradiente desnaturante, geralmente de formamida e ureia, e utilizados para análise da estrutura da comunidade microbiana (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013). Essa técnica

permite a identificação de populações de menor e maior abundância em comunidades rizosféricas e endofíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014) e contribui para elucidar mudanças na estrutura da comunidade microbiana em resposta a determinados fatores ao longo do tempo (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

A tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilita o sequenciamento do DNA de amostras ambientais em plataformas que geram informação em milhões de pares de bases em corrida única. Nessa abordagem é possível a identificação de táxons microbianos com alta resolução (PHILIPPOT *et al.*, 2013). O princípio da NGS é a geração de sequências curtas abundantes que podem ser montadas em elementos contíguos maiores para sequenciar todo o genoma. A técnica requer material genético de alta qualidade, limpo e concentrado (YOCKTENG *et al.* 2013). Essa metodologia é utilizada para se estimar a diversidade em comunidades complexas, permitindo análise mais robusta dos ambientes estudados. Entretanto, a grande quantidade de dados gerados proporciona grandes desafios, especialmente no que diz respeito à bioinformática (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

Eucalipto

Florestas são o ecossistema terrestre dominante na Terra, cobrindo cerca de 4,03 bilhões de hectares, o que significa aproximadamente 30% da área terrestre total do planeta (PAN *et al.*, 2013). Elas contribuem para a biodiversidade e fornecem inumeráveis bens e serviços ambientais, sendo responsáveis pela sustentação de imensa variedade de indústrias, empregos e renda em todo o mundo (FAO, 2015).

As espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, sendo a madeira do tronco utilizada como matéria-prima para a produção de celulose e madeira, devido à sua rápida taxa de crescimento, à adaptação a várias condições ecológicas e pela boa qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). Nativa da Austrália, a planta está distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais, contando até o momento com cerca de 700 espécies descritas (HUDSON *et al.*, 2015). Em muitos países, é a escolha para geração de bioenergia (BAUHUS *et al.*, 2010).

As espécies de *Eucalyptus* mostram alta diversidade de genes para metabólitos especializados, como terpenos, que atuam como defensivos químicos (MYBURG *et al.*, 2014). Espécies desse gênero apresentam ainda grande

diversidade e altas concentrações de óleos de importância ecológica e médica (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009), e, em razão da grande relevância dessa planta, o genoma de *Eucalyptus grandis* foi recentemente sequenciado (MYBURG *et al.*, 2014). Pela importância econômica que apresentam, as espécies de eucalipto são muito utilizadas em estudos de melhoramento genético (HUDSON *et al.*, 2015).

No Brasil, 72% dos 7,6 milhões de hectares de florestas plantadas são eucalipto e pinus. A maioria dessa área (54,2%) está concentrada na região sudeste, sendo Minas Gerais o estado que mais contribui para essa atividade. A maior concentração dos plantios nas regiões Sul e Sudeste do país é justificada pela localização das principais indústrias de papel e celulose, de painéis de madeira, siderurgia a carvão vegetal e madeira processada mecanicamente (IBA, 2014).

O significado social e econômico do setor florestal em 2013 pode ser avaliado pelo número de empregos gerados, mais de 4,4 milhões, pelos 6,4 bilhões de reais obtidos com os produtos exportados e pela contribuição para o Produto Interno Bruto de cerca de 56 bilhões de reais, além de 8,8 bilhões de dólares em impostos arrecadados (IBA, 2014).

A produtividade das áreas plantadas é garantida com a utilização de fertilizantes, os quais mantêm ou restauram a fertilidade dos solos, aumentando o rendimento e a qualidade das plantas cultivadas. O manejo tem sido progressivamente melhorado para reduzir custos e impactos negativos ao ambiente. O plantio de eucalipto é realizado em áreas onde os solos são ácidos, havendo necessidade de adição de quantidades significativas de nutrientes. Entretanto, essa planta apresenta baixa resposta à adubação nitrogenada (GAMA-RODRIGUES *et al.*, 2005).

A propagação clonal de eucalipto por miniestaquia alia a qualidade da muda à redução dos custos da produção. Com essa metodologia obtém-se melhor desempenho de enraizamento, sistema radicular com maior qualidade, maior velocidade de emissão das raízes e redução das atividades operacionais (HOPPE *et al.*, 2004). Após o enraizamento em casa de vegetação, por cerca de 30 dias, as mudas são transferidas para aclimação em casa de sombra, com 50% de incidência de luz, por um período de aproximadamente 10 dias. Nessa etapa, geralmente as plantas recebem uma dose de fertilizante NPK 5-17-3 de 0,25 g/muda. Após esse período, as plantas sem brotos são colocadas a pleno sol para rustificação, sem a utilização de qualquer defensivo agrícola, a menos que haja incidência de doenças, fato que raramente ocorre. Nessa fase, a umidade deve ser

controlada de acordo com o teor de água do substrato. Posteriormente, as mudas são classificadas de acordo com porte apresentado (pequeno, médio e grande) e preparadas para envio ao plantio, sempre considerando o tamanho médio do lote de mudas (HOPPE *et al.*, 2004).

Comunidades microbianas distintas vivem no interior de raízes, folhas e outras partes da planta. Essas interações proporcionam às plantas acesso a nutrientes e auxílio na supressão de doenças, sendo importantes na agricultura (SMITH, 2014). O estudo das comunidades microbianas pode, portanto, contribuir para compreender sua relação com a adaptabilidade do eucalipto a vários ambientes, com sua sanidade e o desenvolvimento dessa planta.

Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto

Endofíticos estão em interação com várias espécies de plantas e compõem a comunidade microbiana de várias espécies de eucalipto (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Esses micro-organismos têm potencial para reduzir a incidência de doenças (CLARKE *et al.*, 2006) e aumentar a produtividade (PAZ *et al.*, 2012), o que pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

A comunidade e a densidade bacteriana endofítica em eucalipto variam de acordo com o órgão e a localização na planta, a área geográfica do cultivo, as condições ambientais, a espécie e o genótipo da planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). As comunidades endofíticas bacterianas em eucalipto reportadas até o momento são compostas por *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia* e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* em raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010). Essa comunidade distinta pode ser transferida das sementes para as mudas e, quando inoculados em sementes ou em mudas, as características benéficas dos micro-organismos podem ser expressas no hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2008).

Árvores tropicais sustentam grande abundância de fungos endofíticos em suas folhas. Essa comunidade fúngica presente (ARNOLD, 2005) afeta a estrutura e a diversidade dos organismos associados às plantas, além da sua adaptabilidade

e evolução (OMACINI *et al.*, 2001). À semelhança do que ocorre em outras plantas, fungos endofíticos também se associam ao eucalipto, e a diversidade deles nessa planta mostra dominância de Ascomycota (KEMLER *et al.*, 2013). Essa interação parece ser dependente da espécie de planta (LUPO *et al.*, 2001; KHARWAR *et al.*, 2010) e do local do cultivo (FISHER *et al.*, 1993). Muitos deles são antagonistas a diversos patógenos (KHARWAR *et al.*, 2010), pela produção de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (SATHISH *et al.*, 2012). A produção desses compostos por esses micro-organismos pode proporcionar maior capacidade competitiva no interior da planta.

A colonização de fungos endofíticos ocorre mais frequentemente pela penetração das hifas de fungos epifíticos na superfície da planta, seguida pela adaptação ao novo habitat (KHARWAR *et al.*, 2010). Entretanto, nem todos epifíticos podem adentrar a planta, modificar o metabolismo e adaptar-se a esse habitat (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação da comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é geralmente baseada em metodologias dependentes de cultivo (FISHER *et al.*, 1993; LUPO *et al.*, 2001), que subestimam a diversidade desses micro-organismos. Abordagens metagenômicas se fazem necessárias a fim de se elucidar a presença de representantes mais raros presentes nessa comunidade.

Para se compreender como a comunidade microbiana endofítica do eucalipto pode afetar a adaptabilidade a vários ambientes, a sanidade e o desenvolvimento, a avaliação da diversidade de endofíticos é etapa importante. Entretanto, pouco é conhecido sobre esse aspecto em eucalipto, sendo que a maioria dos relatos enfatiza o isolamento desses micro-organismos. Portanto, torna-se necessária a investigação desses micro-organismos em outras partes da planta, bem como em outras áreas de cultivo, e a utilização de metodologia independente de cultivo para melhor elucidar a dinâmica dessa interação.

O sequenciamento de nova geração através das diversas plataformas disponíveis permite a maior cobertura de uma amostra individual. Essa maior cobertura aumenta a possibilidade de detecção de maior número de representantes de filos microbianos, o que é de extrema importância em estudos ecológicos (SIQUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2012). Os avanços das técnicas moleculares como RT-PCR e RNA-Seq (VARGAS *et al.*, 2014) permitem o estudo da expressão de genes envolvidos na fixação de nitrogênio e síntese de hormônios de crescimento vegetal (BRUTO *et al.*, 2014; VARGAS *et al.*, 2014). Com essas técnicas é possível a investigação simultânea do perfil de transcrição de vários genes da planta e do

hospedeiro (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2013). Assim, é possível realizar uma análise detalhada do perfil de genes dos micro-organismos e das modificações que ocorrem na planta em resposta a mudanças ambientais ou a condições impostas (BERTHRONG *et al.*, 2009). Esses avanços, aliados ao estudo da diversidade dos micro-organismos por sequenciamento de genes extraídos de diferentes partes do sistema solo-planta, suportam a ideia de que micro-organismos endofíticos podem ser alternativa para se melhorar a aquisição de nutrientes em plantas importantes, como eucalipto, aumentando a produtividade da planta e sustentabilidade do processo de produção.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. O., VITORINO, A. C. T., MERCANTE, F. M & OLIVARES, F. L. Biological nitrogen fixation by diazotrophic bacteria in association with grasses of economic importance. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 2898-2903, 2014.
- ARNOLD, A. E. 2005. **Diversity and Ecology of fungal endophytes in tropical forests**. Current Trends in Mycological Research (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.
- BACON, C. W & HINTON, D. M. **Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility**. In: GNANAMANICKAM, S. S. 1 ed. Plant-Associated Bacteria. Netherlands: Springer. 2007, p. 155-195.
- BARAC, T., TAGHAVI, S., BORREMANS, B., PROVOOST, A., OEYEN, L., COLPAERT, J. V., VANGRONVELD, J & VAN DER LELIEL, D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water- soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**. v. 22, p. 583–588, 2004.
- BAUHUS, J., VAN DER MEER, P., KANNINEN, M (Ed.). **Ecosystem goods and services from plantation forests**. Routledge, 2010.
- BERTHRONG, S. T., SCHADT, C. W., PINEIRO, G & JACKSON, R. B. Afforestation alters the composition of functional genes in soil and biogeochemical processes in South American grasslands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6240-6248, 2009.
- BOCHNER, B. R. Global phenotypic characterization of bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p.191–205, 2009.
- BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F & SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.
- BRUTO, M., PRIGENT-COMBARET, C., MULLER, D & MOËNNE-LOCCOZ, Y. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-

- promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-10, 2014.
- BULGARELLI, D., SCHLAEPPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.
- CAI, H., ARCHAMBAULT, M & PRESCOTT, J. F. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p. 465–469, 2003.
- CAMILIOS-NETO, D., BONATO, P., WASSEM, R., TADRA-SFEIR, M. Z., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., VALDAMERI, G., DONATTI, L., FAORO, S., WEISS, V. A., CHUBATSU, L. S., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M, Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, v. 15, p. 378, 2014.
- CARVALHO, T. L. G., BALSEMÃO-PIRES, E., SARAIVA, R. M., FERREIRA, P. C. G & HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 2014, p. 1-12, 2014a.
- CARVALHO, T. L. G., PIRES, E., SARAIVA, R., VARGAS, L., BOMFIM, A. C. J., BALLESTEROS, H & HEMERLY, A. S. Nitrogen fixation in grasses-gluconacetobacter activates genes in sugarcane. **BMC Proceedings**, v. 8, p. –20, 2014b.
- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CHEEWANGKON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**. V. 23, p. 55-85, 2009.
- CHI, F., SHEN, S. H., CHENG, H. P., JING, Y. X., YANNI, Y. G., DAZZO, F. B, Ascending migration of endophytic Rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7271-7278, 2005.
- CLARKE, B. B., WHITE JR, J. F., HURLEY, R. H., TORRES, M. S., SUN, S & HUFF, D. R. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. **Plant Disease**, v. 90, p. 994-998, 2006.
- COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT C & AIT BARKA, E. 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, 2005.
- COMPANT, S., CLÉMENT, C & SESSITSCH, A, Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization,

mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

DAVID, V., TERRAT, S., HERZINE, K., CLAISSE, O., ROUSSEAU, S., TOURDOT-MARÉCHAL, R & ALEXANDRE, H. High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 811-821, 2014.

DESHMUKH, S., HÜCKELHOVEN, R., SCHÄFER, P., IMANI, J., SHARMA, M., WEISS, M & KOGEL, K. H. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 18450-18457, 2006.

DESHMUKH, S. K., VEREKAR, S. A & BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-43, 2014.

DÖRR, J., T., HUREK & B. REINHOLD-HUREK. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 7-17, 1998.

DRANCOURT, M., BOLLET, C., CARLIOZ, A., MARTELIN, R., GAYRAL, J. P & RAOULT. D. 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3623–3630, 2000.

ERNST, M., MENDGEN, K. W & WIRSEL, S. G. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 580-587, 2003

FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.

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

FISHER, P. J.; PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**. v. 45, p. 338-345, 1993.

FOUNTS, D. E., TYLER, H. L., DEBOY, R. T., DAUGHERTY, S., REN, Q., BADGER, J. H., DURKIN, A. S., HUOT, H., SHRIVASTAVA, S., KOTHARI, S., DODSON, R. J., MOHAUD, Y., KHOURI, H., ROESCH, L. F. W., KROGFELT, K. A., STRUVE, C., TRIPLETT, E. W & METHE, B. A. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella*

- pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 7, p. 1-18, 2008.
- FRIESEN, M. L., PORTER, S. S., STARK, S. C., VON WETTBERG, E. J., SACHS, J. L. & MARTINEZ-ROMERO, E. Microbially mediated plant functional traits. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 23-46, 2011.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S. & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAMA-RODRIGUES, E. D., BARROS, N. D., GAMA-RODRIGUES, A. D. & SANTOS, G. D. A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 893-901, 2005.
- GAO, X. X., ZHOU, H., XU, D. Y., YU, C. H., CHEN, Y. Q., & QU, L. H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology letters**, v. 249, p. 255-266, 2005.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HARDOIM, P. R., HARDOIM, C. C., VAN OVERBEEK, L. S. & VAN ELSAS, J. D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS One**, v. 7, p. e30438, 2012.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HESHAM, A. E. L., WAMBUI, V., JO, H. O & MAINA, J. M. Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8 S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, p. 37-43, 2014.
- HILL, G. T., MITKOWSKI, A., ALDRICH-WOLFE, L., EMELEA, L. R., JURKONIE, D. D., FICKE, A., MALDONADO-RAMIREZA, S., LYNCHA, S. T & NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 25–36, 2000.
- HOFFMAN, M. T., GUNATILAKA, M. K., WIJERATNE, K., GUNATILAKA, L., & ARNOLD, A. E. Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. **PloS one**, v. 8, p. e73132, 2013.
- HOPPE, J. M., & BRUN, E. (2004). Produção de sementes e mudas florestais. Caderno didático, v.1, 388p.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N: Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**. v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUDSON, C. J., FREEMAN, J. S., MYBURG, A. A., POTTS, B. M & VAILLANCOURT, R. E. Genomic patterns of species diversity and divergence in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, v. 2015, p. 1-15, 2015.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- JACKSON, C. R.; RANDOLPH, K. C.; OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- JANDA, J. M & ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2761–2764, 2007.
- JORGE, T. F., RODRIGUES, J. A., CALDANA, C., SCHMIDT, R., VAN DONGEN, J. T., THOMAS-OATES, J & ANTÓNIO, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: metabolite responses to abiotic stress. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 2015, p. 1-30, 2015.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHAN, A. L., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., JUNG, H. Y., LEE, J. H & LEE, I. J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-14, 2012.
- KHARWAR R. N., GOND S. K., KUMAR A & MISHRA A. A. Comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KIRK, J., BEAUDETE, L., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIROMONOS, J., LEE, H & TREVORS, J. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.

- MAGNANI, G. S., DIDONET, C. M., CRUZ, L. M., PICHETH, C. F., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Journal Genetics and Molecular Research**, v. 9, n.1, p.250-258, 2010.
- MALHOTRA, M & SRIVASTAVA, S. Stree-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 73–80, 2009.
- MIGNARD, J. P & FLANDROIS, S. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 574–581, 2006.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffee canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- MYBURG, A. A., GRATTAPAGLIA, D., TUSKAN, G. A., HELLSTEN, U., HAYES, R. D., GRIMWOOD, J *et al.* The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-362, 2014.
- NAGABHYRU, P., DINKINS, R. D., WOOD, C. L., BACON, C. W., & SCHARDL, C. L. Tall fescue endophyte effects on tolerance to water-deficit stress. **BMC Plant Biology**, v. 13, p.127, 2013.
- NILSSON, R. H., KRISTIANSSON, E., RYBERG, M., HALLENBERG, N., & LARSSON, K. H. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics online**, v. 4, p. 193, 2008.
- NUTARATAT, P., SRISUK, N., ARUNRATTIYAKORN, P & LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-694, 2014.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, p. 78-81, 2001.
- PAIVA, J. A.; PRAT, E.; VAUTRIN, S.; SANTOS, M. D.; SAN-CLEMENTE, H.; BROMMONSCHENKEL, S.; FONSECA, P. G. S.; GRATTAPAGLIA, D.; SONG, X.; AMMIRAJU, J. S. S.; KUDRNA, D. WING, R. A.; FREITAS, A. T.; BERGÈS, H.; PETTENATI, J. G & GRIMA-PETTENATI, J. Advancing *Eucalyptus* genomics: identification and sequencing of lignin biosynthesis

- genes from deep-coverage BAC libraries. **BM Genomics**, v. 12, p. 1-13, 2011.
- PAN, Y., BIRDSEY, R. A., PHILLIPS, O. L & JACKSON, R. B. The structure, distribution, and biomass of the world's forests. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 44, p. 593-622, 2013.
- PAZ, I. C. P., SANTIN, R. C. M., GUIMARÃES, A. M., ROSA, O. P. P., DIAS, A. C. F., QUECINE, M. C & MATSUMURA, A. T. S. *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 11, p. 3711-3720, 2012.
- PHILIPPOT, L., RAAIJMAKERS, J. M., LEMANCEAU, P & VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789-799, 2013.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T, Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, p. 14:435–443, 2011.
- RINCON-FLOREZ, V. A., CARVALHAIS, L. C & SCHENK, P. M. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. **Diversity**, v. 5, p. 581-612, 2013.
- RODRIGUEZ, R. J., WHITE JR, J. F., ARNOLD, A. E & REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 82, p. 314e330, 2009.
- ROSENBLUETH, M & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.
- RYAN, R. P., GERMAINE, K., FRANKS, A., RYAN, D. J & DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SATHISH, L., PAVITHRA, N., & ANANDA, K. Antimicrobial activity and biodegrading enzymes of endophytic fungi from *Eucalyptus*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 2574, 2012.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against

- pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SHIOMI, H. F., SILVA, H. S. A., MELO, I. N. S., NUNES, F. V., BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, n.1, p.32-39, 2006.
- SICILIANO, S. D & GERMIDA, J.J. Biolog analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that *Pseudomonad* inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1717–1723, 1998.
- SIQUEIRA-JÚNIOR, J. F., FOUAD, A. F & RÔCAS, I. N. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, P. 1-15, 2012.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- SMITH, P. A. Foliage Friendships. **Scientific American**, v. 311, n. 2, p. 24-25, 2014.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. “Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards,” **Microbiology Today**, v.33, p. 152-155, 2006.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TAGHAVI, S., DER LELIE, D. V., HOFFMAN, A.; ZHANG, Y. B., WALLA, M. D.; VANGRONVELD, J., NEWMAN, N & MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2010.
- TEMMERMAN, R., HUYS, G & SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.348–359, 2004.
- TUPPAD, D, S & SHISHUPALA, S. Evaluation of endophytic fungi from *Butea monosperma* for antimicrobial and enzyme activity. **Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 4, p. 38-45, 2014.
- TURNER, T. R.; JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.

- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., VOS, P., KERSTERS, K & SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407–438, 1996.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VARGAS, L., SANTA BRÍGIDA, A. B., MOTA FILHO, J. P., DE CARVALHO, T. G., ROJAS, C. A., VANEECHOUTTE, D.; VAN BEL, M.; FARRINELLI, L.; FERREIRA, P. C. G.; VANDEPOELE, K & HEMERLY, A. S. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PloS One**, v. 9, p. e114744, 2014.
- VEGA, F. E., PAVA-RIPOLL, M., POSADA, F & BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal Basic Microbiology**, v 45, p371–380, 2005.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209–216, 2010.
- WHITE, J. F & TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. **Physiologia Plantarum**, v. 138, 440-446, 2010.
- WOO, P. C. Y., LAU, S. K. P., TENG, J. L. L., TSE, H & YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p. 908-934, 2008.
- YOCKTENG, R., ALMEIDA, A. M., YEE, S., ANDRE, T., HILL, C & SPECHT, C. D. A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next-generation sequencing and gene expression analyses. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, p. 1300070, 2013.

CAPÍTULO 2

COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NAS FOLHAS E EXSUDATOS XILEMÁTICOS DE EUCALIPTO

RESUMO

As espécies de eucalipto estão entre as mais cultivadas e mais valorizadas economicamente em todo o mundo. No Brasil, apresentam grande importância ambiental e econômica pela geração de milhares de empregos e por ser alternativa à utilização de madeira de florestas nativas. Em ecossistemas florestais, a parte aérea das plantas é considerada habitat comum para vários micro-organismos, e a família Myrtaceae é fonte relevante de biodiversidade de fungos. Entretanto, muito pouco é conhecido sobre a diversidade e a distribuição da microbiota em folhas e exsudatos xilemáticos em eucalipto. O objetivo desse estudo foi mostrar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade. As folhas e os exsudatos xilemáticos foram coletados no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A diversidade foi obtida empregando-se extração de DNA, amplificação da subunidade rRNA 18S, DGGE e sequenciamento das bandas eluídas. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela localidade das plantas e pela sazonalidade entre as épocas de coleta. Mudanças observadas na distribuição dos grupos filogenéticos encontrados nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos indicam que a composição da comunidade endofítica em eucalipto é dependente da posição das folhas na copa das árvores e do local de cultivo. A análise filogenética mostrou a dominância dos filos Basidiomycota e Ascomycota nos ambientes estudados. Esse é o primeiro relato da presença de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos de uma planta.

Palavras-chave: diversidade, fungos endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

As espécies de eucalipto estão entre as mais utilizadas em florestas plantadas, em razão de suas características de crescimento, adaptabilidade a condições de clima e solo distintos e valor de sua madeira (FAO, 2015). A madeira do eucalipto pode ser utilizada de várias maneiras, incluindo a produção de papel e celulose, de painéis, de madeira processada mecanicamente e na siderurgia a carvão vegetal (IBA, 2013). Além disso, também pode fornecer fonte rentável de lignocelulose para a produção de energia e biocombustíveis avançados (ROCKWOOD *et al.*, 2008). No Brasil, as plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) apresentam crescimento uniforme e alta produção de celulose, características que impulsionaram o crescimento das florestas plantadas a partir da década de 1990 (IGLESIAS-TRABADO & WILSTERMANN, 2008).

As partes aéreas das plantas são habitat comum para vários micro-organismos (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015), sendo a interação com elas importante na manutenção do equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos, dos fluxos de gases e de outros processos determinantes no ecossistema (LINDOW & BRANDL, 2003). Assim, os significados agrônomo e ambiental dos micro-organismos que habitam a parte aérea da planta podem ser expressos na adaptabilidade de populações de plantas e também na qualidade e produtividade das culturas (TURNER *et al.*, 2013). Em escala global, a diversidade de fungos tem se mostrado maior em florestas tropicais, onde a diversidade de plantas terrestres também é maior; porém, a verdadeira escala de diversidade dos endofíticos associados ainda não é bem conhecida (LUO *et al.*, 2014).

Fungos endofíticos estão presentes nas plantas terrestres e são especialmente abundantes e diversos em folhas de várias árvores tropicais. Esses micro-organismos são considerados componentes importantes da biodiversidade em escala global (ARNOLD, 2005). A diversidade de fungos endofíticos na estrutura da comunidade fúngica pode afetar a adaptabilidade e evolução da planta no ambiente em que se encontra (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015).

A caracterização da comunidade microbiana associada às plantas do eucalipto em florestas comerciais brasileiras, além de contribuir para o conhecimento da interação planta-micro-organismo, é de suma importância quando se pretende maximizar a produtividade e o manejo de uma cultura de grande expressão para a economia do país. A maioria dos trabalhos sobre a diversidade de fungos endofíticos têm sido realizados com métodos dependentes de cultivo desses

micro-organismos, o que permite acesso a apenas uma pequena fração dessa diversidade (TORSVIK & OVREAS, 2002). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos e proporcionado novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição e a diversidade da comunidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

As duas áreas de estudo foram as florestas plantadas com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) situadas nos municípios de Catas Altas (Área 1 – Projeto Catas Altas I) e Santa Bárbara (Área 2 – Projeto Serra do Pinho), Minas Gerais, Brasil, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A floresta correspondente a Catas Altas está no sétimo ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1970, e a de Santa Bárbara está no terceiro ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1989. A produtividade média das duas áreas é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos (Tabela 1) e os solos são altamente intemperizados, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o Latossolo Amarelo.

Tabela 1: Georreferenciamento das áreas das florestas plantadas de eucalipto, classe de solo predominante, ano do primeiro plantio e produtividade média da floresta (m³ ha⁻¹)/rotação.

Área/ Projeto	Latitude (w)	Longitude (s)	Altitude (m)	Classe Solo	Implantação/ plantio de eucalipto	Produtividade (m ³ ha ⁻¹)/ rotação
I (Catas Altas)	43° 24' 54"	19° 57' 32"	750	LAd1	1970	340
II (Serra do Pinho)	43° 24' 28"	20° 4' 30"	750	LAW2	1989	340

A vegetação natural dessas áreas era de floresta estacional semidecidual, a qual foi substituída pela cultura do café e por pastagens, respectivamente. Posteriormente, áreas de floresta nativa e extensas áreas de pastagens, em sua maioria compostas por áreas degradadas, foram ocupadas com a cultura do eucalipto (CENIBRA). A idade das plantas à época da amostragem era de 18 meses em Catas Altas (área 1) e de 72 meses em Santa Bárbara (área 2).

Nas duas áreas, o clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão (Tabela 2). As médias de temperaturas máxima, média e mínima nos últimos anos foram de 26,4; 16,9 e 21,6°C, respectivamente, a umidade relativa de 67% e a precipitação e o déficit hídrico de 122,9 e 15,3 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Tabela 2: Histórico de precipitação na região estudada (Catatas Altas/Santa Bárbara).

Ano	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
-----mm ³ -----												
2011	243	123,4	329,5	93,7	21,3	8,9	1,8	1	8,9	231,4	431	664,2
2012	328,3	28,7	166,1	21,8	138,6	16,5	0	5,3	36,8	-	-	-

Amostragem

Após o corte de uma árvore de cada área avaliada, foram coletadas amostras de exsudato xilemático e de folhas em terços equidistantes da copa (superior, médio e inferior). As coletas foram realizadas no início do período chuvoso (outubro de 2011), no período chuvoso (dezembro de 2012) e no período seco (abril de 2012). Cerca de 50 folhas sem sintomas de doenças (150 g) dos terços superior, médio e inferior da parte da copa foram coletadas separadamente. O exsudato xilemático foi coletado após o corte do tronco da árvore em porções de aproximadamente 1 m de comprimento, utilizando motosserra desinfestada em álcool 70%. Após 30 segundos de exsudação, o líquido foi coletado em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL. As amostras foram acondicionadas em caixa contendo gelo para o transporte ao Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. No LEM, as amostras foram estocadas em freezer a - 20°C por cerca de um mês até o processamento.

Descontaminação superficial das folhas de eucalipto

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço das copas das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato ($0,05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, e individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 μL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas e exsudatos xilemáticos

As folhas amostradas de cada terço das copas que se mostraram superficialmente esterilizadas após a incubação em meio R2A foram maceradas em nitrogênio líquido, e o macerado, transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL. Aos eppendorfs contendo as amostras maceradas foram adicionados tampão de extração composto de [(2% (p/v) brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), $1,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,0 e 1g de polivinilpirrolidona e 0,2% (v/v) de β -mercaptoethanol]. As amostras de exsudatos xilemáticos foram inicialmente homogeneizadas em vórtex e uma alíquota de 500 μL transferida para tubos de polipropileno com capacidade para 2 mL. Aos tubos foram adicionados 1000 μL de tampão de extração, 0,5 g de *beads* de 106 μm , 50 μL de SDS 4% (dodecil sulfato de sódio) e 400 μL de fenol-clorofórmio (1:24). A mistura foi submetida a agitação em homogeneizador por 10 min, e colocada em banho-maria a 60°C durante 10 min. Os tubos foram centrifugados a $15000g$, e o sobrenadante, transferido para tubos contendo 400 μL de fenol-clorofórmio, seguindo-se nova centrifugação a $15000g$ por 5 min. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 0,6 volumes de isopropanol, seguindo-se a centrifugação a $15000g$ por 20 min. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% e ressuspensionado em 100 μL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram

comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc).

Análise da diversidade de fungos endofíticos

Para se examinar a diversidade de fungos endofíticos de folhas e exsudatos xilemáticos foram utilizadas a DGGE e a estratégia Nested-PCR. Para isso, em uma primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram utilizados para a primeira reação. Os fragmentos gerados foram utilizados como molde para uma segunda PCR, e a região V7-V8 foi amplificada utilizando-se os *primers* FF390 (VAINIO & HANTULA, 2000) e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000), contendo grampo GC incorporado à região *forward* desse oligonucleotídeo.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µM de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 µM do *primer* NS1, 0,16 µmol do *primer* EF3, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72°C e extensão final a 72°C durante 10 min. A segunda PCR foi realizada utilizando-se 1,0 µL da primeira reação como molde e substituição dos *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC. Nessa reação, as condições foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min, extensão por 1 min a 72°C e extensão final a 72°C durante 10 min.

Os *amplicons* resultantes foram submetidos a DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermophilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo, para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8% (p/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma), em gel com gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ de Tris-HCl, pH 8 e 20 mmol·L⁻¹ de ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ de EDTA,

pH 8,0), 0,09% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina) e 0,7% (p/v) de persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ de ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis foram registradas sob luz UV (300 nm) utilizando um equipamento Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise da comunidade fúngica endofítica, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, eluídas em tubos de polipropileno contendo 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos a 4°C *overnight*. Uma alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1 (sem o grampo GC). Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência foi realizada busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando-se o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença de uma banda correspondente a uma unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de diversidade foram realizadas utilizando-se o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software SigmaPlot 13.0.

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank* utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97% foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S obtidas no NCBI, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados

manualmente e o cálculo para análise filogenética baseada no alinhamento dessas sequências foi feito pelo Método de *Neighbor Joining*. A robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram determinados pela análise de *bootstrap* com 1000 réplicas, e os valores acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

O protocolo de extração de DNA e a amplificação do gene rRNA 18S resultaram em *amplicons* e migração distintos no perfil eletroforético, comprovando a eficiência para acessar a diversidade de fungos endofíticos por DGGE em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2).

O perfil eletroforético na DGGE mostrou bandas mais intensas na mesma posição relativa e número expressivo de UTOs detectadas nas folhas analisadas. A presença de UTOs de menor e maior intensidade é um indicativo de que a Nested-PCR propiciou a resolução necessária às análises de diversidade (Figuras 1 e 2). Os fragmentos de DNAs nas bandas excisadas em diferentes posições do gel da DGGE foram identificados como de membros pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota. Embora outros autores não tenham obtido resultados satisfatórios com a utilização da técnica de excisão de bandas (LIANG *et al.*, 2008), essa estratégia foi bem sucedida no acesso à diversidade de fungos endofíticos de eucalipto no presente trabalho (Figuras 1 e 2).

A análise dos fragmentos do gene rRNA 18S de fungos presentes em folhas e nos exsudatos xilemáticos revelou uma comunidade fúngica distinta, de acordo com as áreas de cultivo. O número e a densidade das bandas de fungos no gel dos exsudatos xilemáticos foram menores em relação aos das folhas, embora nas duas áreas avaliadas, a similaridade delas seja pouco mais de 30% e com o perfil distinto (Figuras 1, 2 e 3). A DGGE permitiu discriminar diferenças entre as comunidades endofíticas em eucalipto cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 2).

Nas folhas de eucalipto coletadas na região de Catas Altas, a análise por UPGMA gerou cinco grupos distintos, sendo o maior valor de similaridade (52,3%) o correspondente à coleta realizada no início do período chuvoso em folhas da parte inferior da copa da árvore (Figura 3A). A maior similaridade encontrada na região de Santa Bárbara foi 55,3%, em período seco, também na parte inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs (23 e 22) nas folhas de eucalipto independe do período de coleta. Outras UTOs exibem flutuações entre os períodos

de coleta, a exemplo da maior incidência de UTOs específicas no período chuvoso em Catas Altas, enquanto na localidade de Santa Bárbara esse fato se deu no período seco (Figura 4).

Os índices de diversidade de Shannon em Catas Altas variaram entre 2,56 a 3,02, e os de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3). Em Santa Bárbara, essa variação foi menor, com índices de diversidade entre 2,09 e 2,4, e de riqueza, entre 7,5 e 11,3 (Tabela 4). Já os índices de Shannon nos exsudatos xilêmáticos variaram entre 1,8 e 2,5, e os de riqueza, entre 6 e 16 (Figura 2).

A comunidade de fungos endofíticos em folhas de eucalipto na região de Catas Altas é distinta com relação à posição das folhas na copa da árvore e entre os períodos chuvoso e seco. Essa distinção indica que a colonização ou a permanência das espécies de fungos é influenciada pela posição das folhas e pela sazonalidade. Nessa área foram identificadas 14 espécies, sendo o maior número delas encontrado no início do período chuvoso (Tabela 5).

A comunidade endofítica das folhas de Santa Bárbara é composta por sete espécies (Tabela 6), que em sua maioria são as mesmas que as encontradas em Catas Altas (Tabela 6). Entretanto, *Anomoloma albolutescens*, *Rhodotarzetta rosea* e *Rizoctonia solani* foram exclusivas de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6).

A posição das folhas e a sazonalidade influenciaram mais a composição da comunidade de fungos endofíticos de Catas Altas que a de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6). Em Catas Altas, a maior prevalência de endofíticos foi encontrada no início do período chuvoso (Tabela 5), e em Santa Bárbara, no período chuvoso (Tabela 6). Nessa área, das espécies fúngicas identificadas por sequenciamento, apenas *Boletus rubropunctus* foi encontrada em mais de um terço da copa da árvore e em mais de uma época de coleta (Tabela 6). Em eucalipto, existem diferenças na colonização e na persistência de fungos endofíticos em relação à sazonalidade (Tabelas 5 e 6).

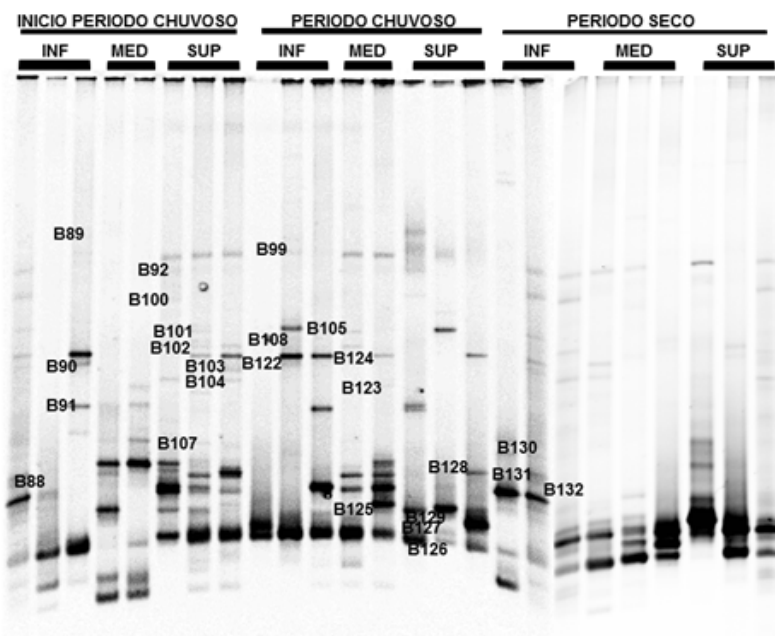
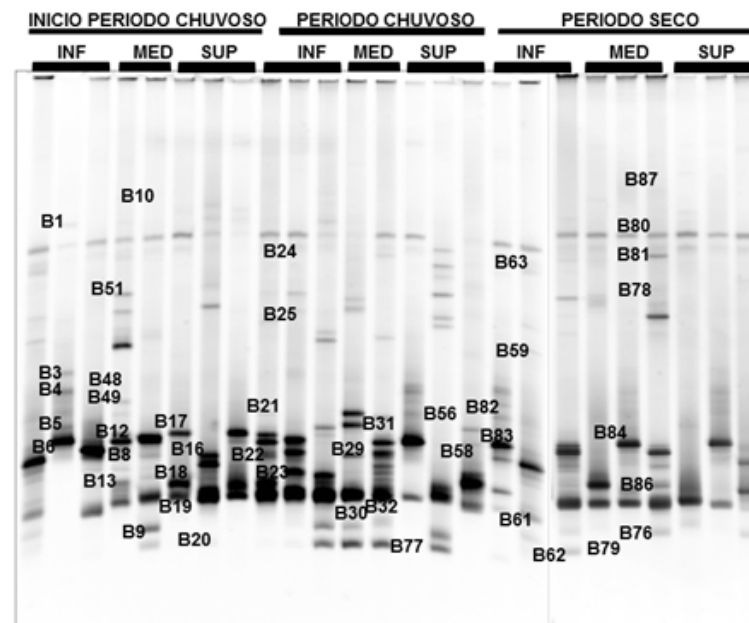
A**B**

Figura 1: Perfis eletroforéticos de DGGE da comunidade de fungos endofíticos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior (em triplicata) da copa das árvores de eucalipto cultivadas em áreas distintas: (A) - Árvores com 18 meses de idade cultivadas no município de Catas Altas, (B) – Árvores com 72 meses de idade cultivadas no município de Santa Bárbara. INF: folhas do terço inferior da copa da árvore; MED: folhas do terço médio da copa da árvore; SUP: folhas do terço superior da copa da árvore. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso; período chuvoso e período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas.

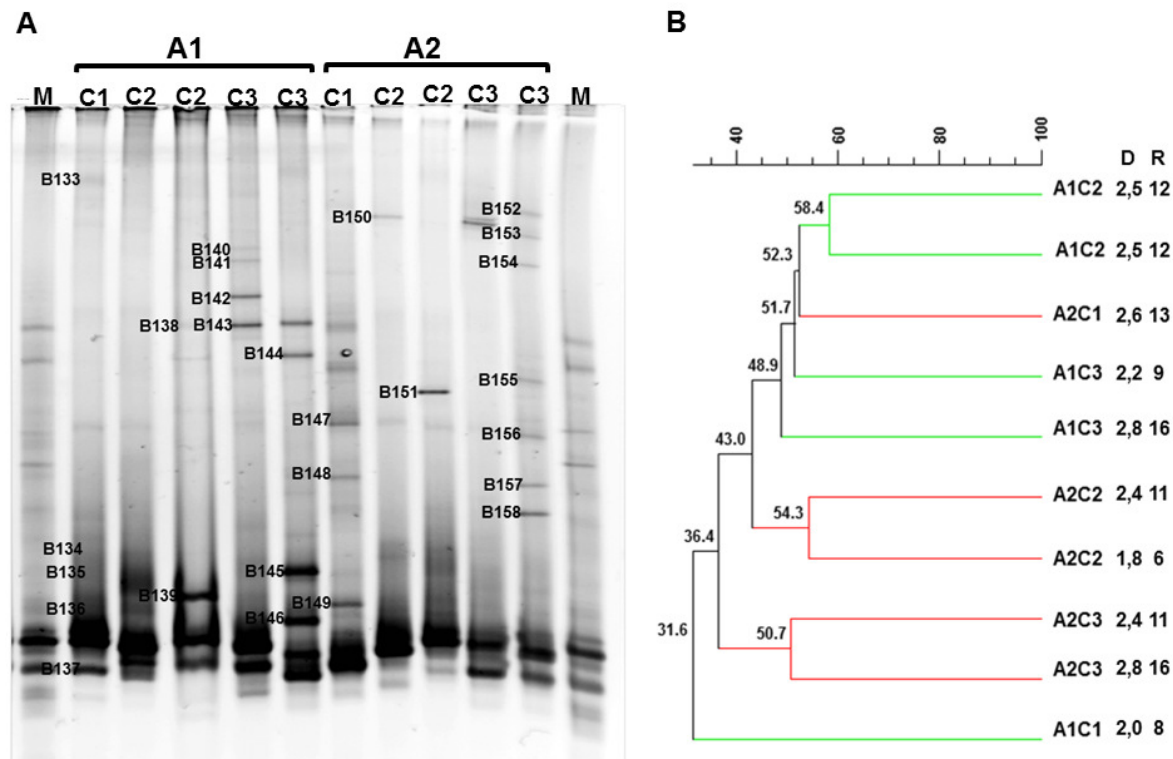


Figura 2: (A) - Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos extraídos dos exsudatos xilemáticos de eucalipto em áreas distintas. A1 - Árvores com 18 meses de idade, cultivadas no município de Catas Altas. A2 – Árvores com 72 meses de idade, cultivadas no município de Santa Bárbara. M: marcador; C1: coleta realizada no início do período chuvoso; C2: coleta realizada no período chuvoso; C3: coleta realizada no período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas. (B) Análise de agrupamento a partir do perfil eletroforético da DGGE e índices de diversidade de Shannon (D) e Riqueza (R) das amostras de exsudatos xilemáticos.

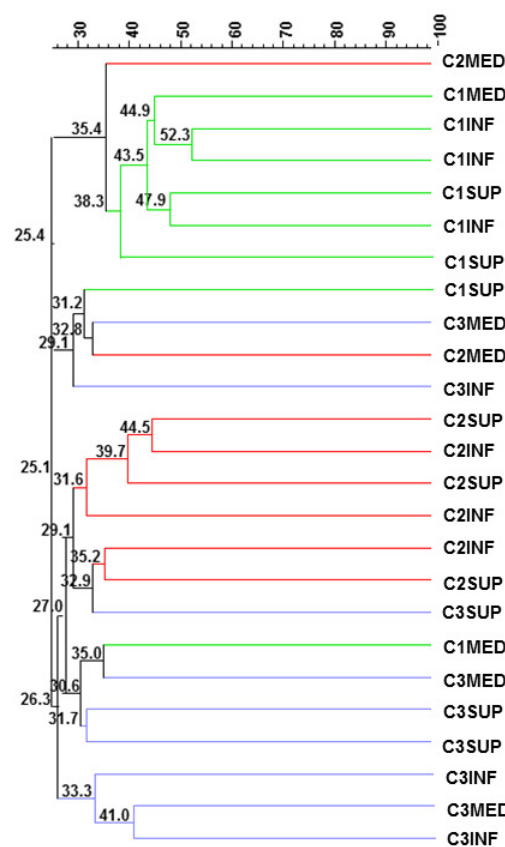
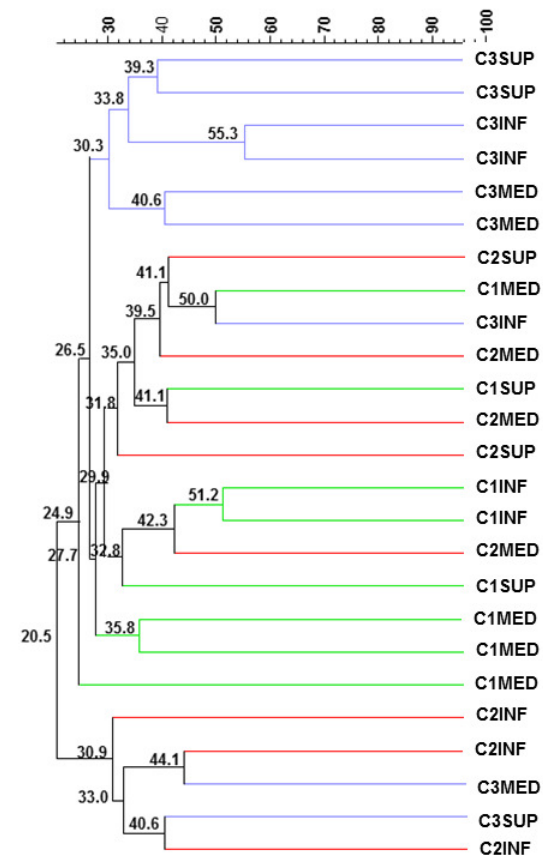
A**B**

Figura 3: Análise de agrupamento e índices de similaridades obtidos a partir do perfil eletroforético da DGGE das amostras de fungos endofíticos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto cultivadas em A - Catas Altas (árvores com 18 meses de idade) e em B - Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade). C1 – Coleta 1 (início do período chuvoso); C2 – Coleta 2 (período chuvoso); C3 – Coleta 3 (período seco). INF – parte inferior da copa; MED – parte média da copa; SUP – parte superior da copa.

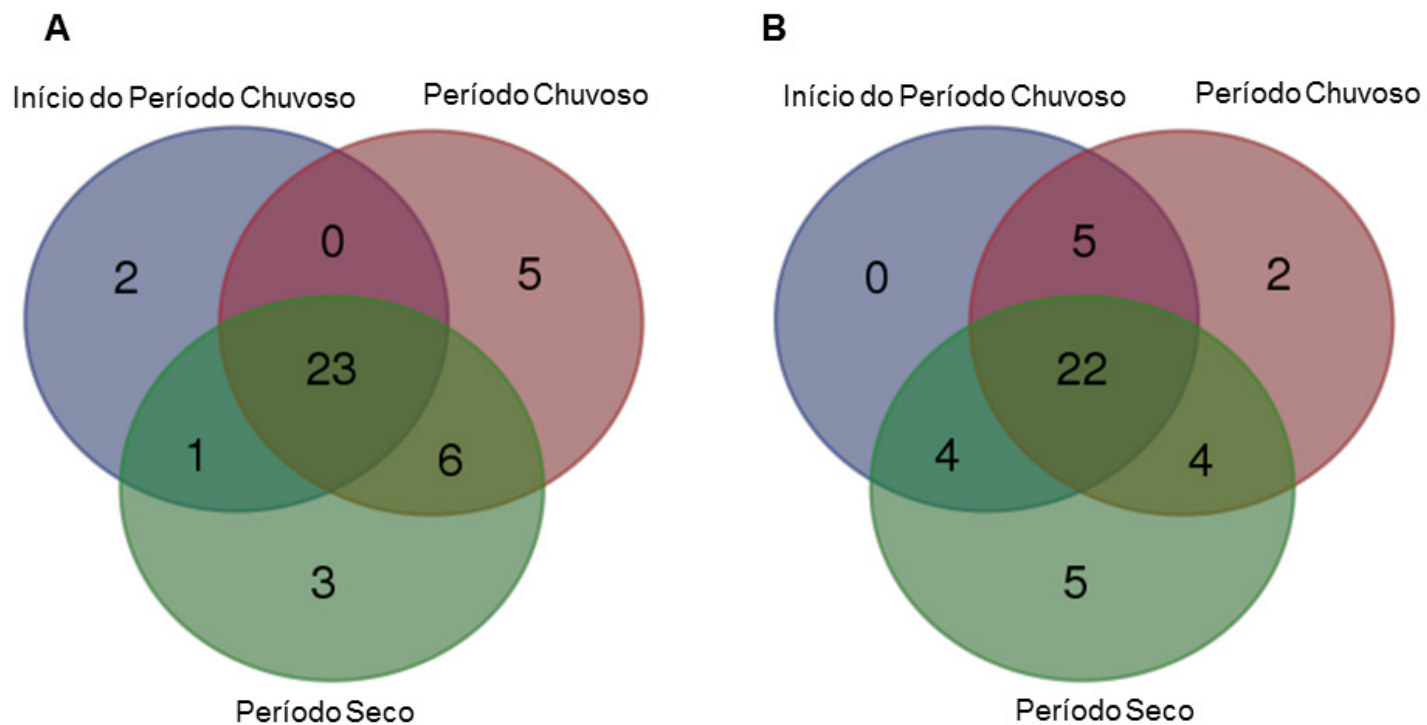


Figura 4: Distribuição de UTOs pelo diagrama de Venn em folhas de eucalipto no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Catas Altas (árvores com 18 meses de idade). B – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade).

O sequenciamento dos *amplicons* a partir das bandas excisadas dos exsudatos xilemáticos mostrou a presença de oito espécies de fungos endofíticos nesse habitat (Tabela 7), sendo que a maioria delas foi identificada em Santa Bárbara. Entre os fungos endofíticos encontrados, apenas um deles, *Fusarium solani*, foi encontrado em folhas provenientes da região de Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* em Santa Bárbara. Entre as espécies encontradas, cinco são exclusivas de Santa Bárbara, uma de Catas Altas e duas são comuns às duas áreas, indicando que a interação endofítica em exsudatos xilemáticos é moldada pela sazonalidade (Tabela 7). Basidiomycota é o filo de fungo que predomina em folhas e exsudatos de eucalipto (Tabelas 5, 6 e 7). Até o momento, esse é o primeiro relato da presença de fungos em exsudatos xilemáticos.

A análise filogenética das sequências revelou que todas pertencem aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 5). A maioria dos agrupamentos formados apresentou valores de *bootstrap* acima de 70, os quais são considerados entre moderados e fortes, o que confere robustez à análise. Em Catas Altas, as bandas 1 (B1), 4 (B4), B8 (B8), 25 (B25), 62 (B62) e 87 (B87) formaram os agrupamentos com maior sustentação filogenética, com *bootstraps* maiores que 80, a maioria deles entre 98 e 100. Esses *bootstraps* são considerados fortes e proporcionaram robustez à análise filogenética.

As UTOs provenientes dos *amplicons* extraídos das bandas excisadas dos géis referentes às folhas coletadas na região de Santa Bárbara formaram os agrupamentos com maiores *bootstraps* para as bandas 99 (B99) e 101 (B101), com *bootstraps* de 97 e 99, respectivamente. As UTOs agruparam com alta sustentação filogenética e formaram dois clados distintos, ambos pertencentes ao filo Ascomycota. A sustentação da árvore filogenética é garantida pelo valor 99 do nó mais externo a ela (Figura 5), embora alguns dos valores de *bootstrap* sejam considerados moderados e baixos.

A análise filogenética para as bandas excisadas a partir de amostras de exsudatos xilemáticos também demonstrou *bootstrap*, em sua maioria, entre moderados a fortes, sustentados filogeneticamente pelo alto valor do nó mais externo. Nos exsudatos, as bandas que apresentaram maiores *bootstraps* foram a 144 (B144) e a 151 (B151) (Figura 5).

Tabela 3: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços superior, médio e inferior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior
Riqueza	17,3	15,5	15,7	13	19,5	15,7	18,3	21	16
Diversidade	2.84	2.73	2.75	2.56	2.89	2.75	2.9	3.02	2.76

Tabela 4: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Média	Superior
Riqueza	11,3	7,5	11	10	9,5	8,7	9,3	9,7	8,3
Diversidade	2,35	2,2	2,4	2,3	2,2	2,15	2,22	2,24	2,09

Tabela 5: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terço inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-Value</i>	Acesso/NCBI
Início do período chuvoso	Inferior	<i>Laetisaria fuciformis</i>	99	1 e ⁻¹⁵³	AY293139.1
		<i>Trametes versicolor</i>	99	1 e ⁻¹⁴³	KM222266.1
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	99	2 e ⁻¹⁵⁵	JQ698926.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	99	5 e ⁻¹⁴²	HQ832428.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	Médio	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832427.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Acidomyces acidothermus</i>	98	4 e ⁻¹³⁷	JQ172747.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Knufia petricola</i>	98	6 e ⁻¹³⁷	KC988739.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
Período Chuvoso	Inferior	<i>Aspergillus glaucus</i>	100	1 e ⁻¹⁵³	AY083218.1
	Médio	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Marasmius alliaceus</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	NG_013179.1
Período Seco	Inferior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Coniophora puteana</i>	95	48e ⁻¹¹⁵	GU187631.1
		<i>Sistotrema brinkmanni</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	KM232435.1
	Médio	<i>Coniophora puteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Microdochium nivale</i>	95	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Coniophora pauteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1

Tabela 6: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Início do período chuvoso	Médio	<i>Anomoloma albolutescens</i>	97	8e ⁻¹⁴⁵	GU187618.1
		<i>Malassezia restricta</i>	98	1e ⁻⁶⁰	AAYY01000016.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
Período Chuvoso		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
		<i>Rhodotarzetta rósea</i>	97	4e ⁻¹⁴⁷	DQ646550.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
	Superior	<i>Microdochium nivale</i>	97	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Rizoctonia solani</i>	97	1e ⁻¹⁴³	D85644.1
Período Seco	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1

Tabela 7: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S, nos exsudatos xilemáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente.

Coleta	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Catatas altas	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
Santa Bárbara	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Alloclavaria purpurea</i>	99	6e ⁻¹³¹	DQ437679.1
	<i>Wallemia sebi</i>	98	3e ⁻⁸⁰	KM582658.1
	<i>Coniophora puteana</i>	93	3e ⁻¹⁰⁸	GU187631.1
	<i>Boletus rubropunctus</i>	85	4e ⁻⁶²	FJ480426.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
	<i>Teratosphariacea sp.</i>	99	9e ⁻¹³⁴	GU250359.1

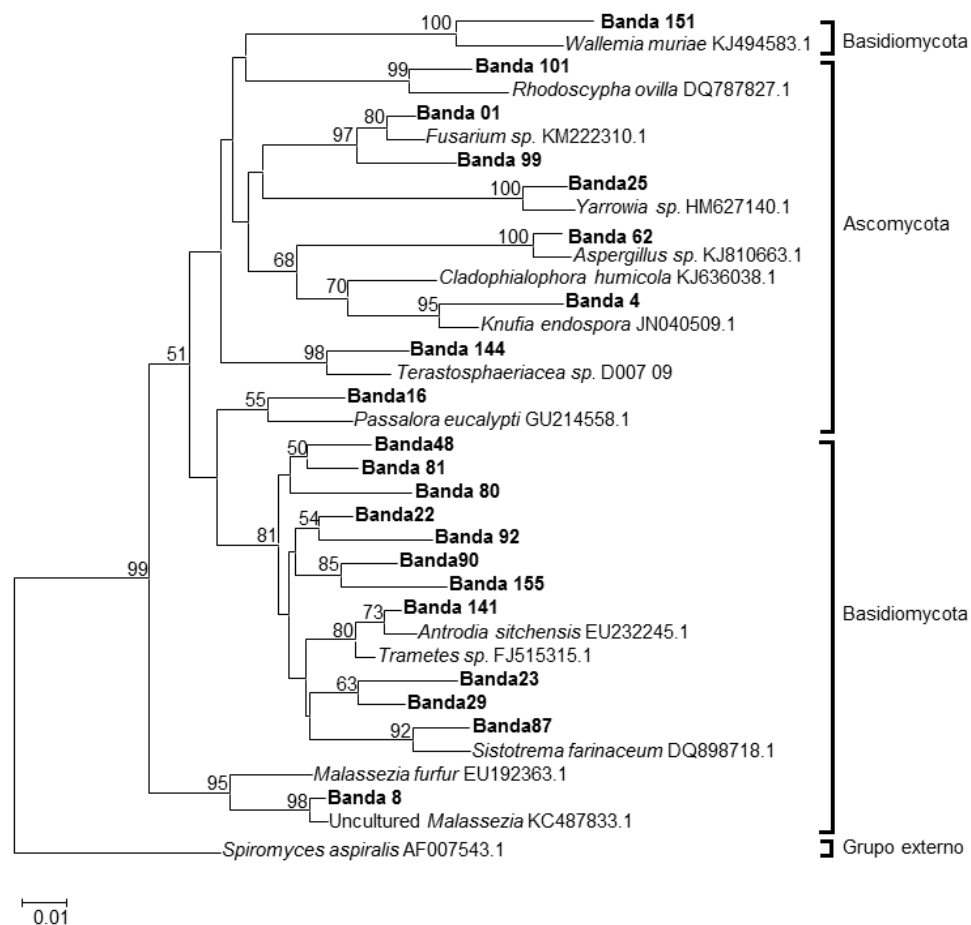


Figura 5: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos identificados em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto com 18 e 72 meses de idade cultivados em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos endofíticos na parte aérea de eucalipto determinada por Nested-PCR e DGGE, ao revelar número expressivo de UTOs, demonstrou ser apropriada para se avaliar a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2). Ressalte-se que esse método foi desenvolvido há mais de 20 anos (MUYZER *et al.*, 1993) e tem sido o de escolha em estudos de diversidade microbiana de vários ambientes, como no solo (BRESOLIN *et al.*, 2010), em plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e em animais (KITTELMANN *et al.*, 2012).

A abordagem Nested-PCR é a recomendada para facilitar a análise por DGGE de diferentes grupos microbianos em comunidades complexas, como, por exemplo, as de frutos de café (OLIVEIRA *et al.*, 2013), uma vez que também revela as populações menos abundantes.

A distribuição dos fungos endofíticos nos cinco grupos distintos gerados pela análise por UPGMA, em que o maior valor de similaridade (52,3%) foi o correspondente à coleta de folhas do terço inferior da copa da árvore no início do período chuvoso na região de Catas Altas. Tal fato indica a existência de mudança na composição da comunidade fúngica endofítica em função da sazonalidade e posição das folhas. Essa mudança é menos acentuada em folhas mais velhas da região de Santa Bárbara onde há menor número de clados distintos (Figura 3B). O maior valor de similaridade encontrado nessa área foi 55,3%, em período seco, no terço inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs nos três períodos de coleta das folhas de eucalipto (23 e 22) é similar; entretanto, existem UTOs específicas, as quais refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos endofíticos. Além disso, também exibem as flutuações dos períodos chuvoso e seco, a exemplo da maior incidência delas no período chuvoso em Catas Altas; ao contrário de Santa Bárbara, onde a maior incidência ocorreu no período seco (Figura 4).

As variações nos índices de diversidade de Shannon em Catas Altas, entre 2,56 a 3,02, e as de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3), e as de Santa Bárbara em que foram menores, com diversidade entre 2,09 a 2,4 e riqueza entre 7,5 a 11,3 (Tabela 4), foram interpretadas como indicativo de que os terços da copa da árvore e a sazonalidade são fatores que modificam a distribuição de UTOs (Figura 4). A diversidade de espécies é medida em termos de riqueza e uniformidade, e o índice mais comum e amplamente utilizado é o de Shannon-Wiener (H'); os valores usualmente encontrados estão entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Em

virtude disso, comunidades mais diversas tendem a apresentar maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2010), o que explica a discrepância encontrada nos índices de diversidade em folhas das localidades de Catas Altas e Santa Bárbara (Tabelas 3 e 4). Portanto, a sazonalidade molda a diversidade de fungos endofíticos em eucalipto, fato que pôde ser observado pela presença de UTOs comuns e específicas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 4 – Tabelas 3 e 4). A sazonalidade também pode de influenciar no ganho, na perda, na latência ou na manutenção de uma dada espécie microbiana na comunidade (Tabelas 3, 4 e 5). Embora o significado funcional dessas mudanças na estrutura da comunidade microbiana em função da sazonalidade não tenha sido demonstrado, alguns relatam que elas são influenciadas por fatores, como o antagonismo entre fungos, e por variáveis abióticas, que podem afetar a planta hospedeira e, assim, moldar a dinâmica da microbiota associada (GHIMIRE *et al.*, 2010).

A colonização endofítica é geralmente influenciada pela ontogenia das folhas (ARNOLD *et al.*, 2003). As variações na diversidade e na abundância observadas neste trabalho podem estar associadas com as propriedades nutricionais e de defesa em cada estágio de desenvolvimento desses órgãos (SANCHEZ-AZOFEIFA *et al.*, 2012). Entretanto, as diferenças na diversidade de fungos endofíticos entre as plantas de Catas Altas (mais juvenis) e as de Santa Bárbara (mais velhas), não podem ser atribuídas somente à idade das plantas. Outras variáveis, a exemplo dos ciclos de cultivo e rotação, dos teores de nutrientes e açúcares nas folhas e de outras características, podem, em conjunto, ter influenciado as diferenças entre os índices de diversidade nas duas áreas (Tabelas 5 e 6). Ciclos de cultivo e de rotação podem interferir na comunidade fúngica do solo (ELLOUZE *et al.*, 2014) e, conseqüentemente, na colonização endofítica, já que muitos dos micro-organismos endofíticos presentes em folhas são originários do solo (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009). Adicionalmente, outros fatores também podem contribuir para as diferenças das comunidades endofíticas, tais como mudanças na fisiologia das folhas e presença de substâncias químicas, a exemplo de compostos fenólicos que podem limitar a riqueza de espécies microbianas. Por serem esses compostos inibidores naturais da colonização fúngica, em especial de representantes do filo Ascomycota, como *Aspergillus* (BANSO & RAI, 2008) e *Fusarium* (KAUR *et al.*, 2011), esses compostos podem ter inibido a presença desses táxons nas plantas mais velhas de Santa Bárbara.

A presença de maior número de UTOs nos terços médio e inferior da copa de plantas da área de Santa Bárbara (Tabela 6) possivelmente resultou de condições abióticas mais favoráveis, como maior umidade e menor incidência de radiação ultravioleta. A quantidade e a qualidade da luz incidente nas folhas, pode ter contribuído para a menor frequência de fungos nos terços superiores da copa bem como para as diferenças observadas entre as árvores de Catas Altas e de Santa Bárbara. Na literatura, há relatos de que as condições de luminosidade podem diminuir a viabilidade de propágulos fúngicos ou causar efeitos deletérios em conídios, especialmente a radiação UV-B (ISAAC, 1995; ARNOLD & HERRE, 2003; POSADAS *et al.*, 2012).

As diferenças na distribuição de fungos endofíticos nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos (Tabelas 5, 6 e 7), pode indicar que a colonização endofítica seja dependente do local ou órgão da planta amostrado. As espécies *Pachylepyrium carbonicola* e *Malassezia restricta* (Tabela 5), presentes em Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* (Tabela 6), observado em Santa Bárbara, podem ocupar diferentes micro-habitats no corpo da planta, indicando comportamento mais generalista (Tabelas 5 e 6). É relatado na literatura que fatores como altitude, umidade, densidade da copa, entre outros fatores, podem influenciar o nível de infecção da planta (QI *et al.*, 2012). O fato de as folhas abrigarem mais espécies fúngicas endofíticas (Tabelas 5 e 6) do que os exsudatos xilemáticos (Tabela 7) pode ser atribuído às diferenças nas barreiras à infecção vigentes nesses dois locais, bem como a capacidade do xilema em selecionar os micro-organismos nesse ambiente (ARNOLD & LUTZONI, 2007).

Os principais colonizadores encontrados nesse estudo (Tabelas 5, 6 e 7) diferem dos encontrados em *Eucalyptus nitens* cultivados na Austrália e Inglaterra (FISHER *et al.*, 1993). Isso pode ser atribuído à espécie da planta e às condições ambientais distintas das do presente trabalho. Além disso, as diferenças encontradas na estrutura da comunidade fúngica endofítica em diferentes espécies de eucalipto podem estar relacionadas à estratégia metodológica utilizada, já que Fisher *et al.* (1993) utilizaram métodos dependente de cultivo. A diversidade de fungos endofíticos nos exsudatos xilemáticos de eucalipto é influenciada pelo local e pela sazonalidade (Tabela 7). Na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre diversidade de fungos em exsudatos xilemáticos de árvores de eucalipto de florestas plantadas. Os exsudatos xilemáticos apresentam compostos nitrogenados e ácidos orgânicos (PFAUTSCH *et al.*, 2009), além de açúcares como sacarose, frutose, glicose, galactose e arabinose em pequenas concentrações

(MATTIELLO *et al.*, 2009). Em razão dessa composição o xilema pode ser considerado como um habitat oligotrófico para o crescimento e desenvolvimento microbiano em várias plantas, incluindo eucalipto (YADETA & THOMMA, 2013).

Os fungos endofíticos mais frequentes observados em eucalipto cultivado em Catas Altas e Santa Bárbara foram *Fusarium solani*, *Malassezia restricta*, *Pachylepyrium carbonicola* e *Boletus rubropunctus* (Tabelas 5 e 6). A alta identidade das sequências obtidas com as do banco de dados do NCBI (Tabelas 5, 6 e 7) foi o critério utilizado para a confirmação dessas espécies como pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (Figura 5). Embora muitas delas sejam patogênicas para algumas plantas, no presente trabalho, mostraram-se como de natureza endofítica. Ressalte-se que a desinfestação da superfície de folhas saudáveis, sem sintomas de infecção, foi comprovada pela ausência de crescimento fúngico em R2A da última água de lavagem. A alta dominância de alguns grupos fúngicos (Tabelas 5, 6 e 7) é uma indicação de que eles possam ter papel relevante na fisiologia da planta. Espécies fúngicas podem produzir ampla variedade de reguladores de crescimento, como giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) e auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012) e também conferir tolerância a fatores bióticos e abióticos adversos (HUBBARD *et al.*, 2014).

Os fungos endofíticos presentes no xilema apresentaram altos *bootstraps* (Figura 5) e similaridade com aqueles que são geralmente encontrados no solo e nas folhas de eucalipto, fato que pode explicar a origem da colonização xilemática. Micro-organismos endofíticos podem colonizar a planta por meio de ferimentos, nos sítios de emergência de raízes laterais (HALLMAN *et al.*, 1997) ou pela liberação de enzimas hidrolíticas (ROBL *et al.*, 2013) que lhes permitem adentrar e colonizar a planta (HALLMAN *et al.*, 1997). Dentro da planta, os exsudatos xilemáticos podem funcionar como meio de transporte para a colonização endofítica, seguindo o fluxo ascendente da seiva do xilema. Tal fato pode explicar a ocorrência de *Fusarium solani* e *Marasmius alliaceus* em folhas e exsudatos xilemáticos de Catas Altas (Figuras 5 e 7) e *Boletus rubropunctus* em folhas e exsudatos de Santa Bárbara (Figuras 6 e 7).

As comunidades fúngicas nas folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto mostraram-se distintas uma da outra. Somente os fungos *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* estavam presentes nas duas comunidades (Tabelas 5, 6 e 7). As espécies de *Fusarium* são relatadas como as mais frequentemente isoladas como endofíticas em plantas tropicais (VEGA *et al.*, 2010). Fungos do gênero *Marasmius* são reconhecidos pela produção de

metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli* (ROSA *et al.*, 2003). Esse grupo já foi descrito como endofítico (NGIENG *et al.*, 2013). Entretanto, na literatura consultada, não foi encontrada relatos de endofitismo para a espécie *Marasmius alliaceus*. O gênero *Boletus* apresenta espécies descritas como endofítica em folhas de *Pinus* sp., (ARNOLD *et al.*, 2007). No entanto, a espécie *Boletus rubropunctus* é relatada aqui como endofítica pela primeira vez.

A presença de *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* nos exsudatos xilemáticos de eucalipto indica que esses micro-organismos podem ser transportados às folhas por meio do fluxo ascendente da seiva do xilema, após adentrarem a planta via raiz. A presença de fungos endofíticos em folhas e exsudatos aqui relatada amplia a compreensão da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de fungos endofíticos nessa importante espécie florestal é etapa importante para o acesso a esse patrimônio genético na busca de metabólitos e processos que possam contribuir para a melhoria no desenvolvimento da planta.

CONCLUSÕES

A DGGE foi eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade.

Os filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica endofítica em eucalipto.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilemáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W.; MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410. 1990.
- ARNOLD, A. E., HENK, D. A., EELLS, R. L., LUTZONI, F., & VILGALYS, R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v. 99, p. 185-206, 2007.

- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, 88, p. 541–549, 2007.
- BANSO, D. S & RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 81-88, 2008.
- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 391-403, 2010.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. (2014). Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- ELLOUZE, W., ESMAEILI TAHERI, A., BAINARD, L. D., YANG, C., BAZGHALEH, N., NAVARRO-BORRELL, A., HANSON, K & HAMEL, C. Soil fungal resources in annual cropping systems and their potential for management. **BioMed Research International**, 2014.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- FISHER, P. J., PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, p. 338-345, 1993.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 19-27, 2011.
- HALLMAN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** v. 4, p. 9, 2001.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUBRRARD, M., GERMIDA, J. J. & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 109-122, 2014.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- IGLESIAS-TRABADO, G & WILSTERMANN, D. *Eucalyptus universalis*. Global cultivated eucalypt forests map, 2008.
- ISAAC, S. Mycology Answers: Old papers, manuscripts and books often develop brown spots and patches; are these caused by fungi?. **Mycologist**, v. 9, n. 3, p. 138-139, 1995.
- KAUR, S., SINGH, H. P., BATISH, D. R & KOHLI, R. K. Chemical characterization and allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*. **Journal of Plant Interactions**. v. 6, p. 297-302, 2011.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) Suitable for Large-Scale Sequence-Based Community Structure Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LIANG, Z., DRIJBER, R. A., LEE, D. J., DWIEKAT, I. M., HARRIS, S. D & WEDIN, D. A. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 956-966, 2008.
- LINDOW, S. E & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875–1883, 2003.
- LUO, J., WALSH, E., NAIK, A., ZHUANG, W., ZHANG, K., CAI, L & ZHANG, N. Temperate pine barrens and tropical rain forests are both rich in undescribed fungi. **PloS One**, v. 9, p. e103753, 2013.
- MATTIELLO, E. M., RUIZ, H. A., SILVA, I. R. D., SARKIS, J. E. S., NEVES, J. C. L & PUCCI, M. M. Phloem mobility of boron in two eucalypt clones. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1695-1704, 2009.
- MAY, L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 829-841, 2001.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C & UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p.695–700, 1993.

- NGIENG, N. S., ZULKHARNAIN, A., ROSLAN, H. A., & HUSAINI, A. Decolourisation of synthetic dyes by endophytic fungal flora isolated from Senduduk plant (*Melastoma malabathricum*). **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PFAUTSCH, S., GESSLER, A., ADAMS, M. A & RENNENBERG, H. Using amino-nitrogen pools and fluxes to identify contributions of understory *Acacia* spp. overstory *Eucalyptus regnans* and stand nitrogen uptake in temperate Australia. **New Phytologist**, v. 183, p. 1097-1113, 2009.
- POSADAS J. B., MARICEL, A. L., MINI J. I & LECUONA R, E. Natural Tolerance to UV-B and Assessment of Photoprotectants in Conidia of Six Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Griv) Vuillemin. **World Applied Sciences Journal**, v. 20, p. 1024-1030, 2012.
- QI, F., JING, T & ZHAN, Y. Characterization of endophytic fungi from *Acer ginnala* Maxim. in an artificial plantation: media effect and tissue-dependent variation. **PLoS ONE**, v. 7, p. 46785-46785, 2012.
- REASONER, D. J & GELDREICH, E. E A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, p. 1-7, 1985.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C., VICENTE, V. A., PRADELLA, J. G. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v.13, p. 1-12, 2013.
- ROCKWOOD, D. L., RUDIE, A. W., RALPH, S. A., ZHU, J. Y & WINANDY, J. E. Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1361-1378, 2008.
- ROSA, L. H., MACHADO, K. M. G., JACOB, C. C., CAPELARI, M., ROSA, C. A., & ZANI, C. L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 967-974, 2003.
- SANCHEZ-AZOFEIFA, A., OKI, Y., FERNANDES, G. W., BALL, R. A & GAMON, J. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees**, v. 26, p. 291–299, 2012.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.

- TORSVIK, V & OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p. 240-245. 2002.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- VEGA, F. E., SIMPKINS, A., AIME, M. C., POSADA, F., PETERSON, S. W., REHNER, A., INFANTE, F., CASTILLO, A & ARNOLD, E. A. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, n. 3, p. 122–138, 2010.
- YADETA, K. A & THOMMA, B. P. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-12, 2013.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 3

FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS ENDOFÍTICOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As folhas do eucalipto sustentam diversidade variável de fungos filamentosos e de leveduras que podem exercer influência na sanidade e no desenvolvimento da planta. Endofíticos interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença. Fungos simbiossiontes podem utilizar açúcares solúveis simples, como glicose e frutose, os quais podem funcionar como principal fonte de carbono para esses micro-organismos. O eucalipto é cultivado em todo o mundo e é a espécie da família Myrtaceae mais amplamente distribuída e utilizada em plantios comerciais. Neste estudo, a diversidade e a distribuição de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos do híbrido eucalipto urograndis foram determinadas e relacionadas à concentração de açúcares em folhas provenientes de plantas em cinco fases de desenvolvimento, incluindo as mudas de viveiro e plantas em campo. O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Foram identificadas: 15 espécies e dois gêneros de fungos e duas espécies e sete gêneros de leveduras. As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a estrutura da comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em folhas. Muitas das espécies identificadas são específicas de determinada fase de desenvolvimento. Os fungos endofíticos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos de folhas de plantas da fase de jardim clonal; *Chaetomella acutisetula* e *Ascotricha chartarum* de folhas da fase de sombreamento; *Erratomyces patellii* e *Saxomyces* sp. de folhas da fase de saída do sombreamento; *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da fase de expedição, e *Mycosphaerella populicola*, das folhas de plantas do campo. As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* são específicas das folhas das fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento, respectivamente. Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar folhas de plantas provenientes de mais de uma fase de desenvolvimento. O fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem em plantas nas fases de expedição e de campo, e o gênero *Candida*, nas de jardim clonal, sombreamento e saída do sombreamento. Neste estudo é apresentada pela primeira vez a presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

Palavras-chave: diversidade, fungos, leveduras, endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

A parte aérea das plantas, especialmente as folhas, é considerada habitat de grande importância agrônômica e ecológica, por hospedar grande diversidade de micro-organismos endofíticos e epifíticos, incluindo fungos e leveduras. Os micro-organismos endofíticos, em particular, já foram encontrados em várias espécies de plantas, sendo importantes componentes da biodiversidade (ARNOLD *et al.*, 2000). *Eucalyptus* spp. são as plantas da família Myrtaceae mais amplamente distribuídas e utilizadas em plantios comerciais em muitos países (FAO, 2015), devido ao seu rápido crescimento, à sua adaptabilidade e ao valor comercial de sua madeira (BROOKER, 2000). A avaliação da diversidade e abundância de fungos filamentosos e de leveduras em eucalipto, com a utilização de metodologia independente de cultivo, reconhecidamente retrata, com maior fidelidade, a complexidade dessas comunidades e suas interações com a planta (KEMLER *et al.*, 2013). Assim, a complexidade da microbiota fúngica endofítica tem sido subestimada até o momento.

As leveduras compreendem o maior grupo de micro-organismos epifíticos em interação com plantas (WHIPPS *et al.*, 2008), enquanto fungos endofíticos são abundantes em folhas assintomáticas de várias árvores tropicais (ARNOLD, 2005). Esses micro-organismos apresentam grande influência sobre a planta, por afetarem a estrutura da comunidade e a diversidade de organismos a ela associados ou a adaptabilidade e evolução do hospedeiro (OMACINI *et al.*, 2001; BRUNDRETT, 2006). Além disso, são fontes de várias enzimas de interesse industrial, como celulasas, xilanases, lacases, pectina liase, hemicelulasas, entre outras, e, por isso, estão entre os micro-organismos de maior interesse para produção de biocompostos industriais (LUMYONG *et al.*, 2002; ROBL *et al.*, 2013).

Endofíticos são organismos que vivem interiormente nos tecidos da planta, não causando sintomas de doenças (ARNOLD *et al.*, 2007), e, em associação com árvores, podem reduzir danos às folhas e as perdas ocasionadas por patógenos (ARNOLD *et al.*, 2003). Apesar de o Brasil ter a maior área de plantio de eucalipto no mundo e da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de fungos nessa planta (CHEEWANGKON *et al.*, 2009; SÁNCHEZ MÁRQUEZ *et al.*, 2011), pouco se conhece sobre a dinâmica das comunidades microbianas endofíticas durante as fases de desenvolvimento da planta em viveiro e no campo. A compreensão do impacto das práticas de produção de mudas em viveiros sobre a estrutura das comunidades microbianas endofíticas é fundamental para a produção de mudas mais saudáveis e resistentes ao transplante para o campo.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de fungos filamentosos e de leveduras endofíticas associados às folhas de eucalipto em fases distintas do desenvolvimento da planta, em viveiros comerciais e em campo, e relacioná-la às concentrações de açúcares foliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Este estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP – etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e a campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato.

Fertilizantes	Doses* (kg/m³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira

(CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de $340 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ /rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é $19^\circ 24' 54''$, a longitude $42^\circ 25' 56''$ e a altitude 318 m. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulinitico ou caulinitico-oxídico ou gibbsítico-oxídico, hipoférrico ou mesoférrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente; a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56, 39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Amostragem

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20°C . Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato ($0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi

repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspensionado e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspensionado *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Extração de açúcares

As amostras de folhas de eucalipto foram analisadas quanto ao conteúdo de glicose, frutose e sacarose (LISEC *et al.*, 2006) por metodologia adaptada. O extrato das amostras de folhas de cada uma das cinco fases de desenvolvimento

da planta foi preparado por maceração, em almofariz e pistilo, de cerca de 50 a 60 mg de tecido foliar, seguindo-se a transferência do macerado para tubo de polipropileno e adição de 1000 µL de metanol (100%). Essa mistura foi aquecida a 70°C sob agitação de 950 rpm durante 60 min, seguindo-se a centrifugação a 14000g por 10 min. Cerca de 600 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos contendo 500 µL de clorofórmico e 800 µL de água. Após centrifugação a 12000g por 15 min, a fase polar foi coletada (1000 µL), e os açúcares quantificados por ensaios enzimáticos acoplados, pelo aumento da densidade óptica a 340 nm da razão NADP/NADPH⁺H⁺ detectada (Multiscan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As enzimas utilizadas foram glicose 6-fosfato (0,2 mg/mL), hexoquinase (0,2 mg/mL), fosfoglicose isomerase (0,2 mg/mL) e invertase (1 mg/mL). Sucessivamente, essas enzimas foram adicionadas ao extrato de folhas e as concentrações de glicose, frutose e sacarose expressas em mmol/kg de massa seca. A concentração de sacarose foi estimada como correspondente à metade da concentração de hexose. As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise da diversidade de fungos e leveduras

A diversidade de fungos e de leveduras em folhas de eucalipto foi examinada por DGGE, e a estratégia Nested-PCR foi utilizada. Na primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos e dos domínios D1-D2 de rRNA 26S de leveduras. Os oligonucleotídeos iniciadores NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram os utilizados para amplificação de fungos, e o NL1 (COCOLIN *et al.* 2000) e NL4 (PRAKITCHAIWATTANA *et al.*, 2004), para leveduras. Os fragmentos específicos gerados foram utilizados como molde para segunda PCR, sendo a região V7-V8 amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000) para amplificação de fungos e NL1GC e LS2 (COCOLIN *et al.* 2000) para leveduras. Esses oligonucleotídeos continham grampo GC incorporado à região *forward*.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µmol de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mmol de cloreto de magnésio, 0,16 µmol dos *primers* NS1, EF3, NL1 e NL4, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações para fungos foram realizadas sob as seguintes

condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72°C e extensão final durante 10 min a 72°C. Para a amplificação dos *amplicons* das leveduras a temperatura inicial foi de 95°C e a de anelamento 52°C. A segunda PCR foi realizada com 1,0 µL da primeira como molde, e substituição do *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC e NL1 e NL4 por NL1GC e LS2. Os *amplicons* de fungos filamentosos foram amplificados em desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min, extensão por 1 min a 72°C e extensão final a 72°C durante 10 min. Com os *amplicons* de leveduras, a desnaturação inicial foi a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, 52°C e 72°C durante 2 min para anelamento e extensão, e, extensão final a 72°C por 7 min.

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após a Nested-PCR foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermo-lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização das bandas dos géis com utilização do software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (m/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09 % (v/v) TEMED (N,N,N=,N=tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% (fungos filamentosos) e 40%-60% (leveduras) ureia/formamida [(100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida)]. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis obtidos por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, os *amplicons* eluídos em 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos *over night* a 4°C. Uma

alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela MacroGen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência dos fungos filamentosos e das leveduras foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos filamentosos e de leveduras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e a ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software Sigma plot (Systat Software, Inc. 2008). Foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificar a correlação entre os teores de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e os índices de riqueza e diversidade a 5% de probabilidade (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S ou 26S, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética foi baseado no alinhamento dessas sequências, utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram realizados por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a estrutura da comunidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em fases distintas de desenvolvimento das plantas foram examinadas por DGGE e sequenciamento do rRNA 18S e 26S. O protocolo de extração de DNA e a amplificação dos genes rRNA 18S e 26S foram eficientes para acessar a diversidade dessas comunidades endofíticas em folhas de eucalipto (Figura 1).

A análise por DGGE mostrou que o número de táxons representados pelas UTOs, é afetado pelas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2), indicando mudança na comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em interação com a planta. O padrão obtido pelos *primers* proporcionou a observação de bandas mais e menos intensas no perfil eletroforético (Figuras 1 e 2), permitindo a análise de populações de maior e menor abundância.

O perfil da comunidade de leveduras mostrou maior complexidade (Figura 2) e homogeneidade nas diferentes amostras em comparação ao perfil de fungos (Figura 1), evidente pelo maior número de UTOs e pela maior riqueza e diversidade (Figuras 4 e 5).

A análise de agrupamento hierárquico por UPGMA revelou que os padrões dos perfis entre as etapas de cultivo foram diferentes (Figura 1B e 2B). Os resultados da análise de agrupamento indicam a formação de grupos distintos que compartilham entre 25% (Figura 1) e 35% (Figura 2) de similaridade e subgrupos mais similares que tendem a agruparem juntos. As folhas das plantas oriundas do jardim clonal e das plantas recém-saídas do sombreamento apresentaram composição da comunidade fúngica similar, e as do sombreamento e expedição formaram pelo menos um clado com 43,9% e 64,2% de similaridade (Figura 1). À exceção do subgrupo das folhas em sombreamento, em todas as fases de desenvolvimento das plantas, a comunidade de leveduras foi similar, alcançando valores de mais de 87% de similaridade no jardim clonal (Figura 2).

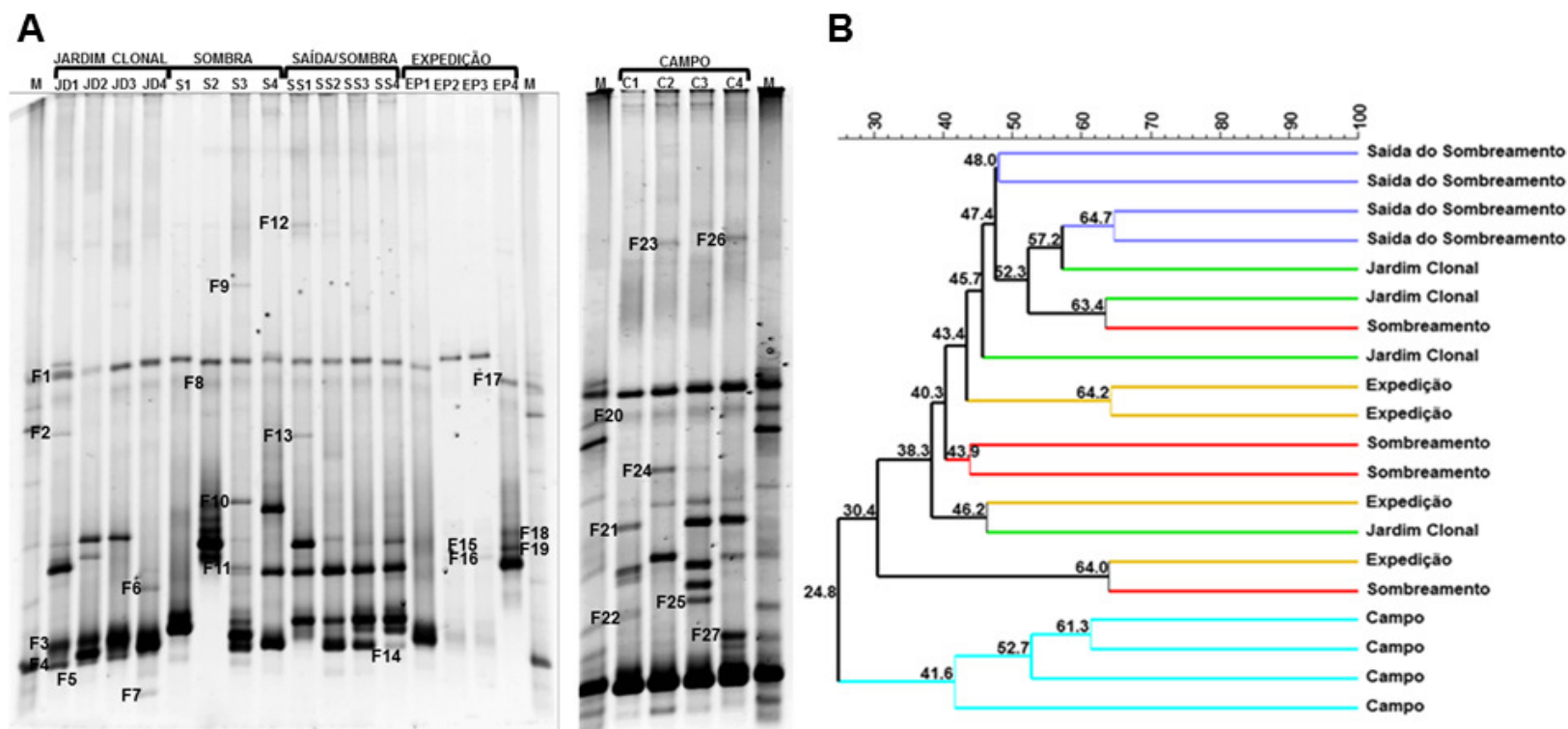


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos durante as fases de desenvolvimento do eucalypto. A – Gel a partir da DGGE. As letras F seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalypto em quatro repetições.

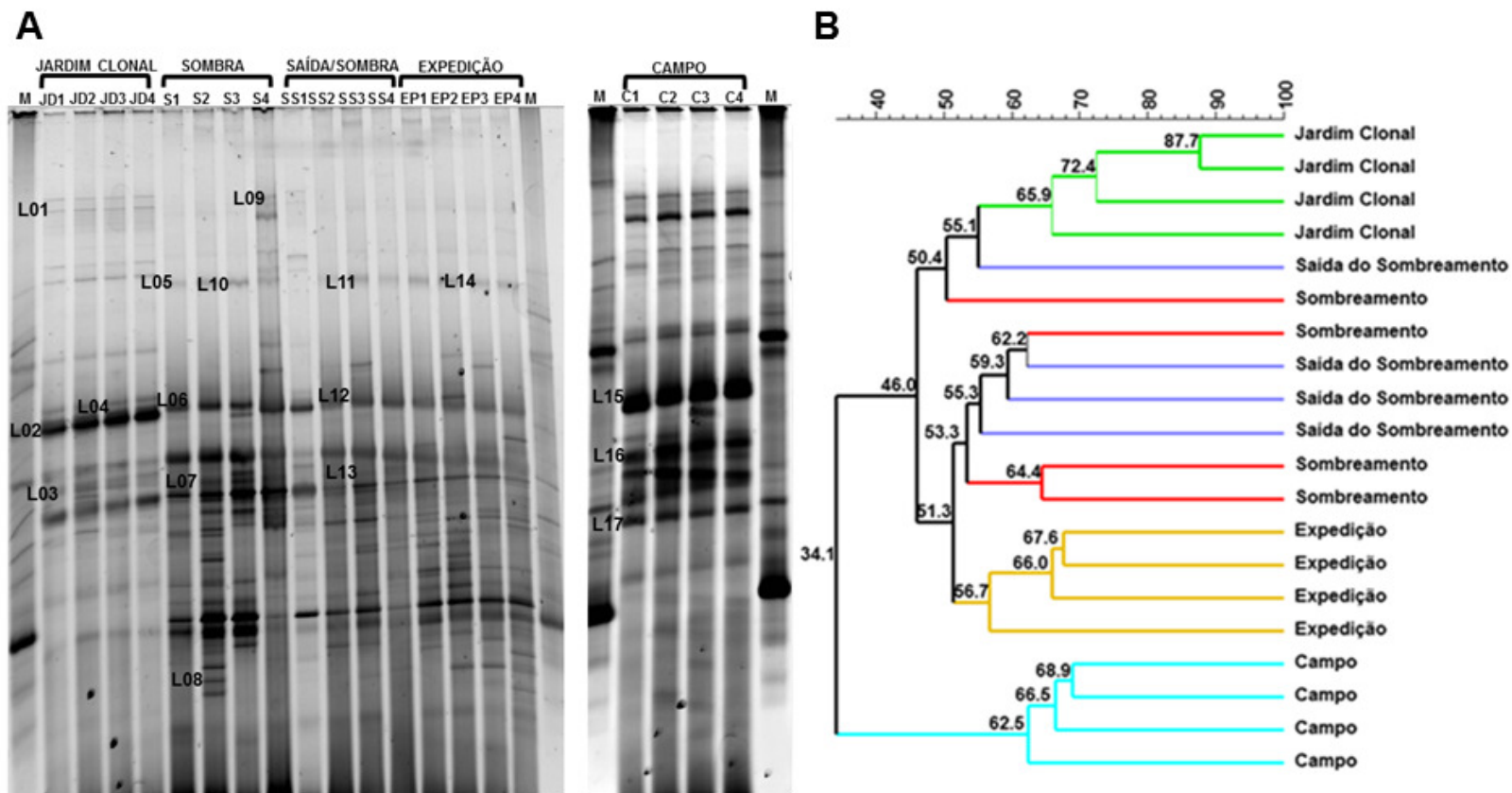


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de leveduras endofíticas durante as fases de desenvolvimento do eucalipto. A – Gel a partir da DGGE. As letras L seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalipto em quatro repetições.

Embora a maioria das UTOs (8 e 10) seja comum entre as fases de desenvolvimento das plantas, existem UTOs específicas para cada uma delas, refletindo diferenças na estrutura das comunidades de fungos filamentosos e leveduras. A maior incidência de UTOs específicas de fungos ocorreu nas folhas provenientes do campo, enquanto para leveduras isso ocorreu nas folhas da expedição e campo (Figura 3). Mesmo sendo pequenas, essas mudanças mostraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto modulam a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, fato mais evidente para as leveduras.

A diversidade e a riqueza de fungos endofíticos não foram influenciadas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 4), diferentemente do observado para as leveduras que apresentaram maiores médias desses índices nas amostras das plantas em expedição (Figura 5). As folhas do jardim clonal foram as que mostraram os menores índices de diversidade e de riqueza de leveduras (Figura 5).

A concentração de glicose e frutose variou em relação às folhas provenientes das fases de desenvolvimento das mudas e no campo, enquanto os teores de sacarose foram mais próximos. As maiores concentrações de glicose e frutose foram encontradas nas folhas das plantas em expedição e no campo, enquanto as de sacarose somente em campo ($p\text{-valor} < 0,05$) (Figura 6). Entretanto, as correlações entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de riqueza e diversidade de Shannon foram moderadamente negativas ($-0,8 < r \leq -0,5$) ($p\text{-valor} > 0,05$).

A identificação das UTOs foi realizada pela excisão das bandas do gel da DGGE, sequenciamento do rRNA 18S e 26S e comparação das sequências obtidas pelo algoritmo BLASTn (NCBI). O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Dentro desses filos, foram identificadas 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos (Figura 7) e duas espécies e sete gêneros de leveduras (Figura 8), em plantas de diferentes idades, em viveiro e em campo.

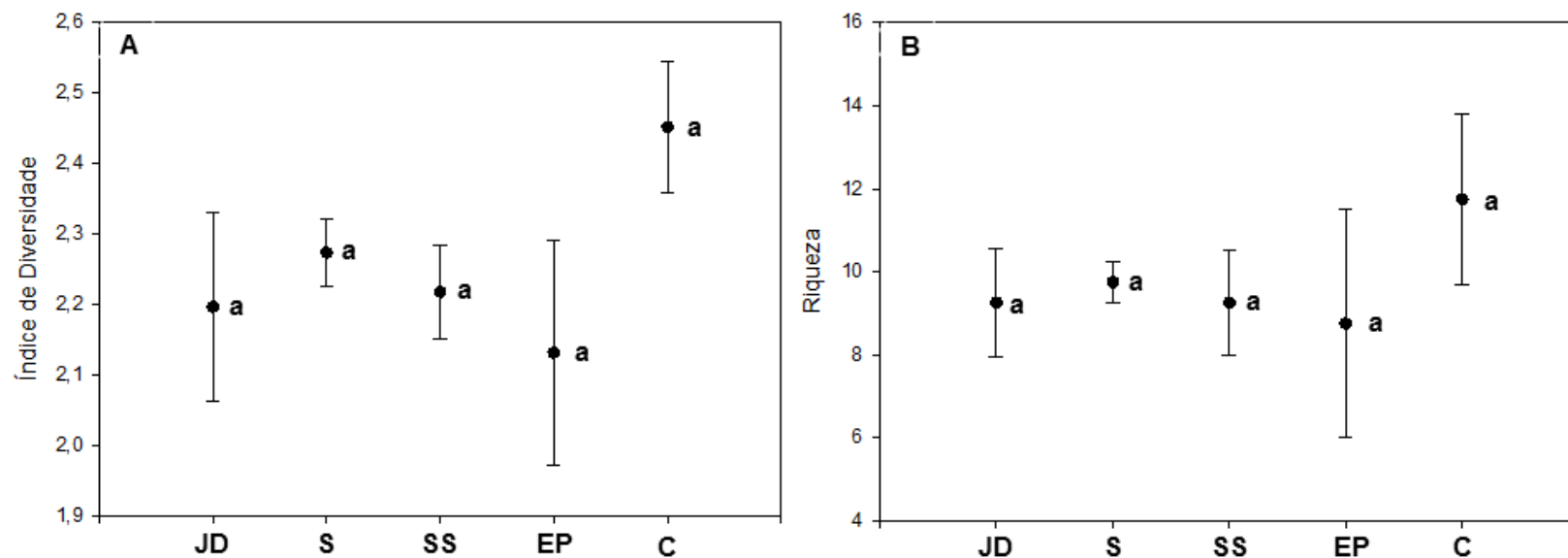


Figura 4: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de fungos endofíticos em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

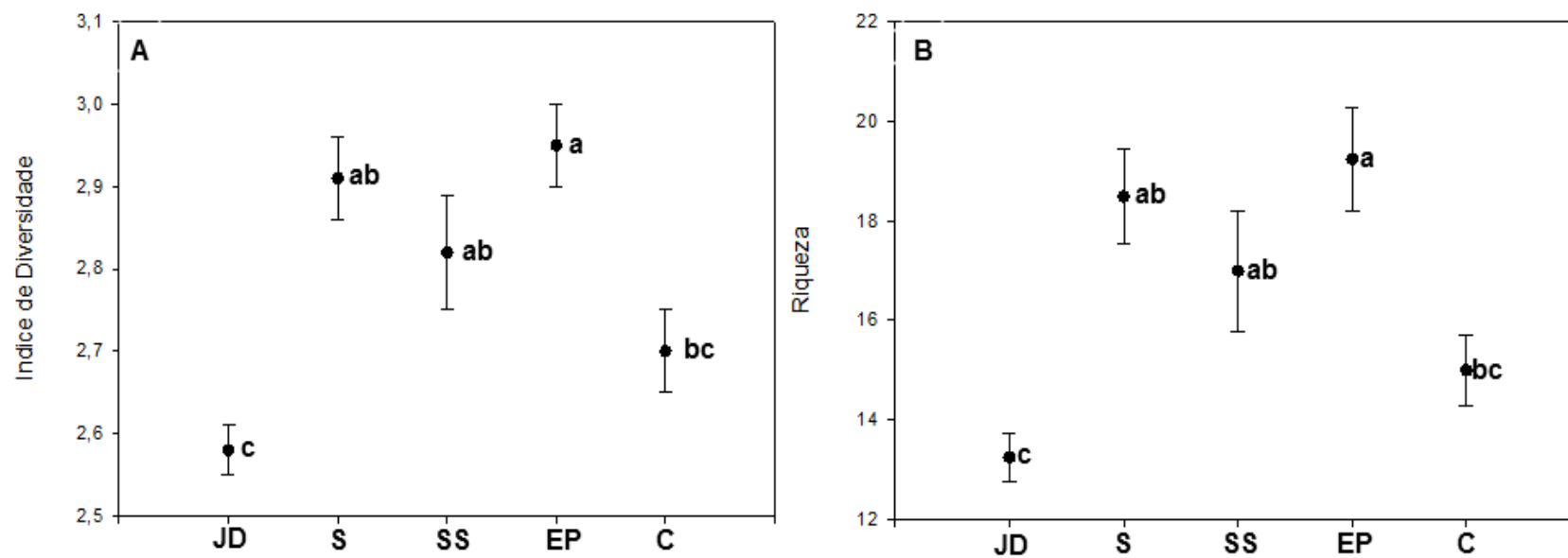


Figura 5: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de leveduras endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

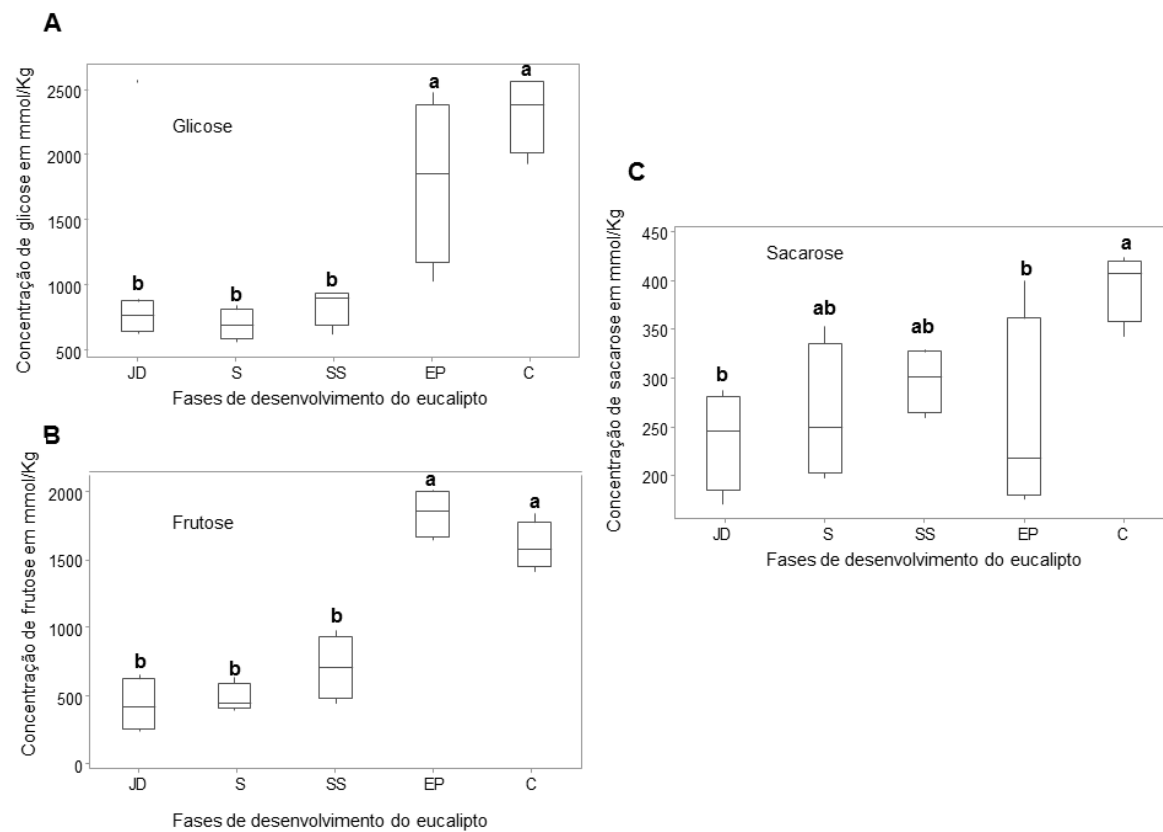


Figura 6: Boxplots mostrando as concentrações de açúcares (glicose, frutose e sacarose) em mmol/kg de folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. (A): glicose (B): frutose e (C): sacarose. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação entre fungos endofíticos e eucalipto é dependente das fases de desenvolvimento da planta, pois a maioria das espécies é fase-específica (Tabela 2). Entretanto, *Cladosporium* sp. e *Teratosphaeria acidotherma*, se mostraram presentes em mais de uma etapa (Tabela 2). Essas diferenças na colonização endofítica em folhas de eucalipto podem indicar a presença de condições mais favoráveis ao estabelecimento de determinadas espécies em dado momento. O menor número de fungos endofíticos identificados pelo sequenciamento do rRNA 18S foram provenientes das plantas sombreadas, todas elas específicas dessa fase de desenvolvimento (Tabela 2).

A comunidade de leveduras em interação com o eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento das plantas foi acessada pela primeira vez em eucalipto e, à semelhança do que ocorre em *Coffea arabica* (MASOUD *et al.*, 2004), é composta por muitos representantes de poucas espécies ou gêneros, distribuídas nos filos Ascomycota e Basidiomycota. A maioria das UTOs sequenciadas foi identificada em nível de gênero por apresentarem identidades abaixo de 97% com as sequências do banco de dados NCBI (Tabela 3). Entretanto, os representantes do filo Basidiomycota *Rhodospodium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* apresentaram identidades de 99 e 98%, respectivamente, valores esses que possibilitaram a identificação em nível de espécie. Essas leveduras são específicas das fases de expedição e campo (Tabela 3). Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em folhas de eucalipto. As leveduras endofíticas identificadas em interação com eucalipto mostraram ser dependentes da fase de desenvolvimento em associação com a planta. Tanto fungos quanto leveduras não são persistentes durante o desenvolvimento do eucalipto.

A análise filogenética das sequências de rRNA 18S revelou que a comunidade de fungos endofíticos presente nas folhas de eucalipto pertence aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), valores que suportam a análise (Figura 7).

Tabela 2: Distribuição das espécies/gêneros de fungos endofíticos identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade	Acesso/NCBI	Banda	Filo
			(%)			
Jardim Clonal (JD)	<i>Diplomitoporus crustulinus</i>	9 e ⁻¹³⁸	99	AY336770.1	B10	Basidiomycota
	<i>Podosphaera tridactyla</i>	5 e ⁻¹³⁵	99	AB022392.1	B07	Ascomycota
	<i>Aspergillus restrictus</i>	2 e ⁻¹³⁸	99	AB008407.1	B11	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Ascotricha chartarum</i>	6 e ⁻¹⁵⁵	99	AB048283.1	B12	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	3 e ⁻¹³³	99	AY544728.1	B13	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹³⁰	98	AB537894.1	B14	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	7 e ⁻⁹⁹	91	AY544728.1	B15	Ascomycota
Saída do Sombreamento (SS)	<i>Erratomyces patelii</i>	2 e ⁻¹⁰⁸	96	DQ663693.1	B17	Basidiomycota
	<i>Saxomyces</i> sp.	1 e ⁻¹¹⁶	98	KC315864.1	B20	Ascomycota
Expedição (EP)	<i>Lepidostroma</i> sp.	6 e ⁻⁴⁰	99	AB767250.1	B21	Basidiomycota
	<i>Schizophyllum radiatum</i>	5 e ⁻¹¹¹	95	AY705952.1	B22	Basidiomycota
	<i>Mycosphaerella lateralis</i>	7 e ⁻¹³⁹	99	GU214531.1	B25	Ascomycota
	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B26	Ascomycota
Campo (C)	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B27	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹⁰¹	92	AB537895.1	B29	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	3 e ⁻¹³²	99	AB537895.1	B30	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	98	GU214618.1	B33	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	99	GU214618.1	B34	Ascomycota
	<i>Mycosphaerella populicola</i>	8 e ⁻⁹³	92	EU167578.1	B39	Ascomycota

Tabela 3: Distribuição das espécies/gêneros de leveduras endofíticas identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade (%)	Acesso/NCBI	Banda	Filo
Jardim Clonal (JD)	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L01	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	80	EU585764.1	L02	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L03	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	90	EU585764.1	L04	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L05	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L06	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L07	Ascomycota
	<i>Saturnispora</i> sp.	4e ⁻⁰⁹	95	KC832478.1	L08	Ascomycota
	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L09	Ascomycota
	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L10	Ascomycota
Saída da Sombreamento (SS)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L11	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L12	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L13	Ascomycota
	<i>Malassezia obtusa</i>	6e ⁻⁹⁶	91	EU192365.1	B18	Basidiomycota
	<i>Bensingtonia ingoldii</i>	2e ⁻¹⁰⁶	93	D38234.1	B19	Basidiomycota
Expedição (EP)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L14	Ascomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B23	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B24	Basidiomycota
Campo (C)	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L15	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L16	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L17	Ascomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B28	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B31	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	8e ⁻¹³⁸	99	AB073272.1	B32	Basidiomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B37	Basidiomycota

Entre os Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Pedospaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. A UTO B10 agrupou com os dois fungos do gênero *Diplomitoporus*, a B17 agrupou com as espécies *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com *Cortinarius*, todos confirmados como Basidiomycota com altos *bootstraps* (Figura 7).

A amplificação e análise de sequências do gene rRNA 18S e 26S revelou que as UTOs estão relacionadas a leveduras pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota, com agrupamentos de alta sustentação filogenética (Figura 8). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram altos *bootstraps* com valores de 99 e 100. Os melhores agrupamentos formados entre os Basidiomycota foram os das bandas 23 e 28, com as espécies *Rhodosporidium toruloides* e *Rhodotorula glutinis* e as do gênero *Aureobasidium* (Figura 8). As leveduras ascomicéticas, por sua vez, mostraram agrupamentos fortes entre si, com os altos *bootstraps* dos nós mais externos, confirmando a proximidade filogenética entre elas e as do banco de dados NCBI (Figura 8).

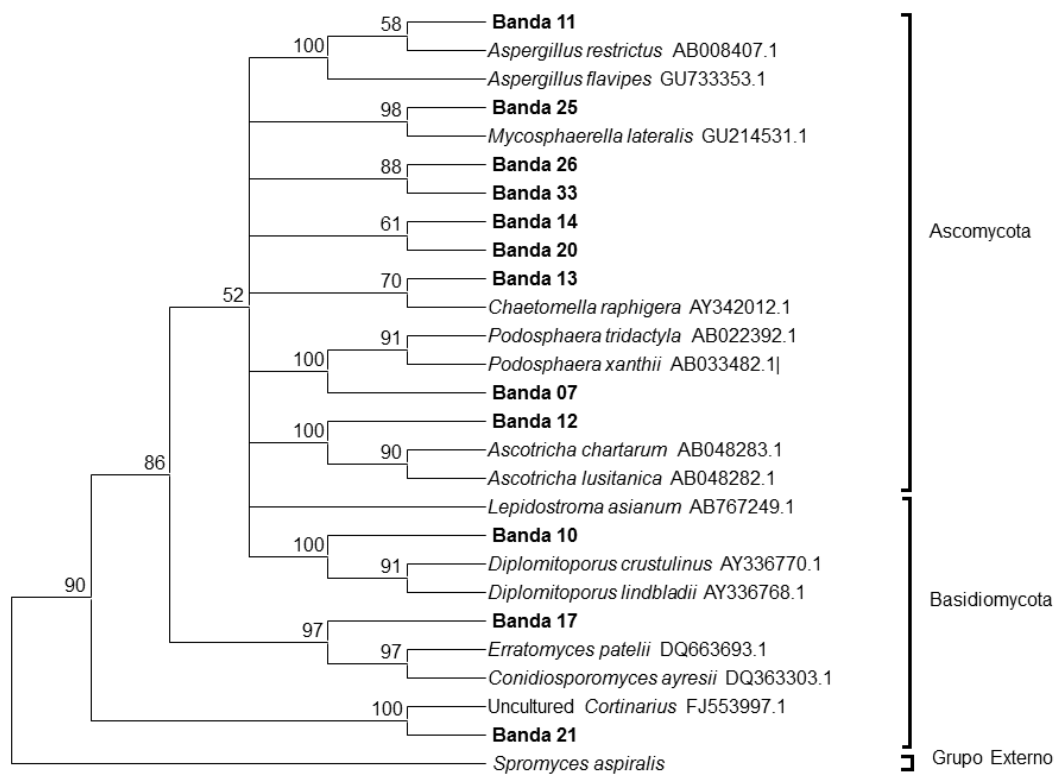


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces aspiralis* foi utilizado como grupo externo.

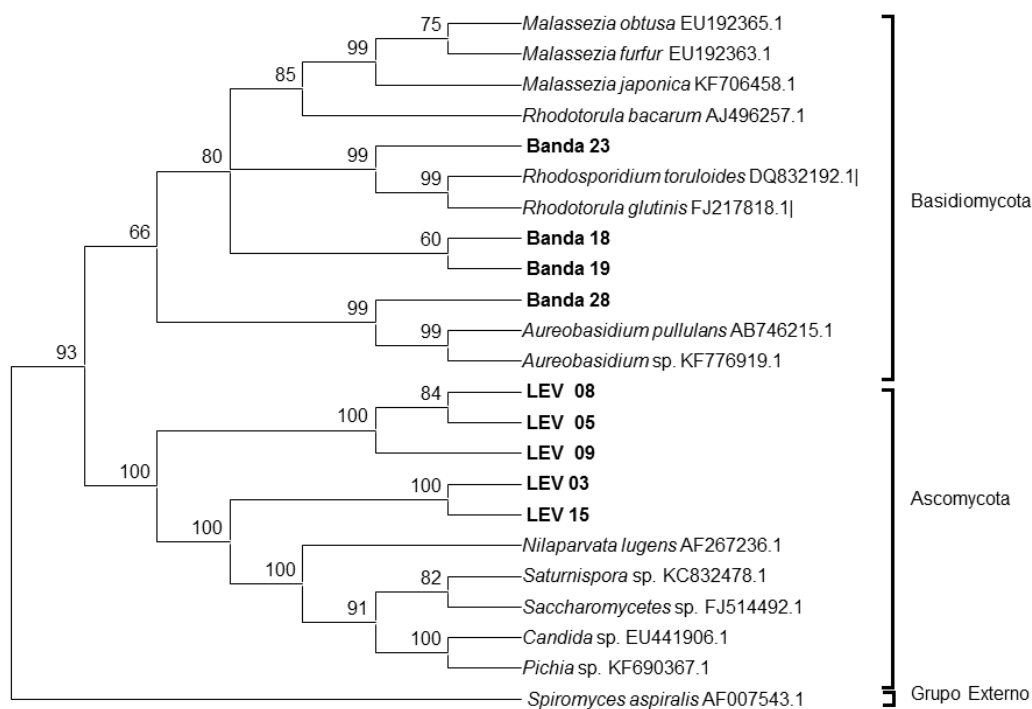


Figura 8: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências dos genes rRNA 18S e 26S de leveduras encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces spiralis* foi utilizado como grupo externo.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos e de leveduras endofíticos acessada por DGGE mostrou a presença de UTOs mais e menos intensas no gel, representando populações com abundância distinta (Figuras 1 e 2). Essa técnica é a escolha para avaliação da diversidade microbiana em vários ambientes (BRESOLIN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; KITTELMANN *et al.*, 2012), o que inclui as folhas de eucalipto (Figura 1 e 2). Essa análise mostrou-se mais robusta quando realizada em conjunto com a abordagem Nested-PCR (Figuras 1 e 2) e permite a análise de comunidades microbianas complexas (OLIVEIRA *et al.*, 2013), proporcionando boa resolução de populações menos abundantes.

Nested-PCR-DGGE mostrou ser eficiente em diferenciar a estrutura das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2). As mudanças foram mais acentuadas na composição da comunidade de leveduras pela formação de clados mais distintos, com UTOs mais similares em um mesmo agrupamento (Figuras 1 e 2). Essas UTOs, em sua maioria, são compartilhadas entre todas as fases de desenvolvimento (8 e 10). Entretanto, mesmo sendo poucas, as UTOs específicas refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos e de leveduras (Figura 3) e demonstram que essas comunidades são modeladas pelo desenvolvimento da planta, fato mais acentuado em leveduras (Figura 3).

Enquanto a comunidade de fungos endofíticos não apresenta diferenças significativas na diversidade e na riqueza (Figura 4), a de leveduras mostrou as melhores médias desses índices nas plantas em expedição (Figura 5). Leveduras apresentam sistema de transporte de glicose altamente regulado, podendo absorver eficazmente a glicose em várias concentrações, pela presença de transportadores de alta e baixa afinidade (BARNETT, 2008). Tal fato pode explicar os maiores índices de diversidade e riqueza encontrados (Figura 5). Os valores de riqueza e de diversidade encontrados nesse estudo estão entre aqueles mais comumente encontrados na literatura, entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Mesmo não existindo diferenças significativas nos índices de diversidade e riqueza de espécies de fungos (Figura 4), observou-se a existência de padrões distintos de colonização desses micro-organismos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 3 e Tabela 2).

A Comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é composta por vários gêneros ao longo das etapas estudadas (Tabela 2), e a de leveduras, por menor quantidade de gêneros e espécies (Tabela 3). Portanto, as folhas dessa planta são

habitat que suportam maior comunidade de fungos em relação à de leveduras. Entretanto, ambas sofrem alterações significativas ao longo do desenvolvimento da planta. Representantes da família Myrtaceae são considerados fonte importante de biodiversidade de fungos, sendo que a maior parte desses fungos está associado às folhas de *Corymbia*, *Eucalyptus* e *Syzygium* spp. (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). As espécies fúngicas em associação com eucalipto relatadas no presente trabalho (Tabela 2) são distintas daquelas descritas na Austrália, Nova Zelândia, Madagáscar e Tailândia (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). Isso indica que essa interação planta-micro-organismo é dependente da espécie de planta em associação, da área de cultivo e da idade da planta associada.

A interação fungo endofítico-planta foi também relatada em outras famílias de plantas como Malvaceae, Cecropiaceae, Lauraceae, Fabaceae, Lecythidaceae e Celastraceae (CANNON & SIMMONS, 2002). Especificamente, no caso de eucalipto, a maioria dos trabalhos publicados até o momento priorizaram os métodos dependentes de cultivo (LUPO *et al.*, 2001; CHEEWANGKOON *et al.*, 2009; KHARWAR *et al.*, 2010), os quais subestimam a diversidade e abundância desses micro-organismos. Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

O grande número de UTOs obtidas pelas sequências analisadas por sequenciamento do rRNA 18S e 26S pode ser considerado como indicativo de alto nível de riqueza e diversidade microbiana, considerando-se que o estudo foi realizado com uma única espécie de planta. As fases em expedição e a campo foram as que apresentaram o maior número de fungos e de leveduras distintos (Tabelas 2 e 3). Açúcares solúveis simples, como a glicose e a frutose, podem funcionar como fonte principal de carbono para fungos simbiotes de plantas (BAGO *et al.*, 2000; CHAMBERGO *et al.*, 2002). Além disso, os micro-organismos associados às plantas podem apresentar via metabólica que facilita a absorção e a quebra da sacarose, sendo essa característica vantagem evolutiva e competitiva. A presença de invertases foi descrita em diversos filos fúngicos. As espécies endofíticas apresentam, em geral, diferentes estratégias nutricionais visando à degradação da sacarose (DOIDY *et al.*, 2012).

A maior predominância de algumas espécies de fungos e de leveduras endofíticas na expedição e no campo (Tabelas 2 e 3) pode ser atribuída ao fato de que, nessas etapas, em plantas tropicais, as folhas apresentam concentrações menores de substâncias químicas de defesa, fato que pode permitir maior crescimento desses micro-organismos (ARNOLD *et al.*, 2003).

Outro fator que afeta o crescimento de fungos e contribui para diferenças na densidade e, conseqüentemente, na diversidade microbiana avaliada (Figuras 4 e 5) é a umidade, uma vez que o conteúdo de água próximo à saturação pode afetar a entrada e o crescimento fúngico na planta (RAYNER & BODDY, 1986). As folhas provenientes do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento foram irrigadas diariamente, de acordo com os padrões de umidade apresentados na região, diferente do que ocorreram com as plantas em expedição e a campo, dependentes da precipitação pluviométrica. Esse fato também pode explicar as diferenças na prevalência e frequência de fungos e leveduras nas fases de desenvolvimento do eucalipto.

Ascomycota foi o filo predominante entre as espécies de fungos e leveduras em eucalipto (Tabelas 2 e 3). Entre os fungos endofíticos, *Teratosphaeria acidotherma* e *Cladosporium sp.* e as leveduras do gênero *Candida* e *Nilaparvata* (Figura 9) foram encontrados em mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto (Tabela 2). O predomínio de leveduras do filo Ascomycota pode ser reflexo da adaptação desses micro-organismos às folhas como micro-habitat que favorece o crescimento de espécies fermentativas (POZO et al 2011). Fungos do gênero *Teratosphaeria* foram encontrados em folhas com sintomas de MLD (doença das manchas da folha) em eucalipto na Austrália (ANDJIC et al., 2010). Entretanto, neste estudo, *Teratosphaeria acidotherma* e *Teratosphaeria toledana* (Tabela 2) foram extraídas de folhas saudáveis de eucalipto. Essa observação evidencia que certos micro-organismos podem ser endofíticos em uma planta e patógenos em outras (SAIKKONEN et al. 2004). A diferença entre o estágio endofítico e patogênico pode ser devido a fatores abióticos ou à idade da planta (SAIKKONEN et al., 2004; PORRAS-ALFARO et al., 2011).

Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* estavam presentes em folhas de plantas provenientes de mais de uma etapa de produção de mudas (Tabelas 2 e 3). Esse comportamento mais generalista indica capacidade de adaptação a condições nutricionais e ambientais distintas. O fungo *Cladosporium sp.* e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem na folhas nas etapas de expedição e campo; já o gênero *Candida* está presente em folhas de plantas do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento. Esse comportamento indica que elas possuem informações genéticas para colonizar e persistir em folhas de eucalipto em mais de uma etapa de desenvolvimento dessa planta, sugerindo que sejam micro-organismos endofíticos competentes (HARDOIM et al., 2008), com

papéis relevantes na fisiologia da planta.

Os fungos e as leveduras podem beneficiar as plantas, aumentando a tolerância das mesmas a fatores bióticos e abióticos, melhorando o crescimento e a sobrevivência em condições adversas, competindo com patógenos (HUBBARD *et al.*, 2014) e produzindo ampla variedade de reguladores de crescimento, a exemplo das giberelinas (GAs), do ácido abscísico (ABA) e das auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012). *Candida tropicalis* já foi relatada como tendo capacidade de promoção de crescimento em arroz por meio de alta atividade da ACC deaminase, da produção de ácido indol acético (AIA) e de poliaminas (AMPRAYN *et al.*, 2012). Plantas em estresse produzem altas concentrações de etileno, inibindo o crescimento (GLICK *et al.*, 2007). A ACC deaminase é a enzima responsável pela quebra do precursor do etileno, o aminociclopropano-1-carboxilato – ACC, em amônia e alfa-cetoglutarato. Micro-organismos produtores de ACC-deaminase diminuem os níveis de etileno pelo consumo dos subprodutos da quebra do precursor, ACC, promovendo, ainda, o crescimento vegetal pela síntese de AIA (GLICK, 2014).

Muitas das espécies de fungos filamentosos e leveduras são específicas de algumas fases de desenvolvimento do eucalipto. Os fungos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos do jardim clonal, *Chaetomella acutiseta* e *Ascotricha chartarum* do sombreamento, *Erratomyces patelii* e *Saxomyces* sp. das planta recém-saídas do sombreamento, *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da expedição e *M. populicola* do campo (Tabela 2). As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* estavam presentes apenas nas plantas em sombreamento e nas recém-saídas do sombreamento, respectivamente.

A análise filogenética das sequências de 18 e 26S rDNA confirmou que a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, presente nas folhas de eucalipto em diferentes etapas de desenvolvimento, está incluída nos filos Basidiomycota e Ascomycota, pela formação de clados distintos, com altos *bootstraps* (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), os quais sustentam a análise filogenética (Figura 7).

Entre os fungos pertencentes à Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Podosphaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. Já entre

os Basidiomycota, os melhores agrupamentos foram o da UTO B10 com dois fungos pertencentes ao gênero *Diplomitoporus*, a B17 com *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com o gênero *Cortinarius*, todos com altos *bootstraps* (Figura 7).

Fungos do gênero *Mycosphaerella* são frequentemente relatados como habitantes da parte aérea das plantas, com algumas de suas espécies hospedeiro-específicas (MAXWELL *et al.*, 2005). *Mycosphaerella lateralis* já foi demonstrada em interação patogênica com eucalipto na Austrália, formando lesões necróticas nas folhas (MAXWELL *et al.*, 2000). No presente estudo, entretanto, esse fungo foi identificado em folhas assintomáticas. Tal fato pode indicar que a interação seja dependente da espécie de planta, da área de cultivo, da idade da planta ou de mecanismos de reconhecimento planta-hospedeiro que podem determinar o comportamento fúngico como patogênico ou endofítico (SAIKKONEN *et al.*, 2004; PORRAS-ALFARO *et al.*, 2011).

A levedura cosmoploita *Aureobasidium pullulans* já foi identificada em várias plantas, sendo considerada como potencial agente de controle biológico de patógenos (ANDREWS *et al.*, 1994). Neste estudo, essa levedura é relatada como endofítica de eucalipto (Figura 8) em plantas de 18 meses de idade, mas não nas demais fases de desenvolvimento (Tabela 3).

Ampla variedade de fungos e leveduras endofíticos foi encontrada em eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento da planta durante a produção de mudas em viveiro. A diversidade microbiana levantada neste trabalho sugere significativa importância dos micro-organismos endofíticos nos sistemas de produção de mudas em escala comercial, abrindo novas avenidas para a elucidação do papel de micro-organismos associativos e simbióticos na nutrição vegetal e na adaptação da planta ao meio.

CONCLUSÕES

A excisão, eluição e sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostrou ser boa técnica para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto.

Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto. Essa comunidade é representada por 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos e duas espécies e sete gêneros de leveduras, em plantas de diferentes fases de desenvolvimento.

A relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a levedura e eucalipto, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto. Entretanto, os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto. Já o fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodospiridium fluviale* são persistentes nas etapas de expedição e campo, e o gênero *Candida*, no jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.
- AMPRAYN, K. O., ROSE, M. T., KECSKÉS, M., PEREG, L., NGUYEN, H. T & KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis*) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.
- ANDJIC, V., WHYTE, G., HARDY, G & BURGESS, T. New *Teratosphaeria* species occurring on eucalypts in Australia. **Fungal Diversity**, v. 43, p. 27-38, 2010.
- ANDREWS, J. H., HARRIS, R. F., SPEAR, R. N., LAU, G. W & NORDHEIM, E. V. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 40, p. 6-17, 1994.
- ARNOLD, A. E. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. **Current Trends in Mycological Research** (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68, 2005.
- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, p. 541-549, 2007.
- ARNOLD, A. E., MAYNARD, Z., GILBERT, G. S., COLEY, P. D & KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.
- BAGO, B., PFEFFER, P. E & SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.124, p. 949-958, 2000.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. **Yeast**, v. 25, p. 689-731, 2008.

- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 391-403, 2010.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**. v. 13, p. 79-148, 2000.
- BRUNDRETT, M. C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editors. **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. 281–293, 2006.
- CANNON, P. F & SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**. v. 94, p. 210-220, 2002.
- CHAMBERGO, F. S., BONACCORSI, E. D., FERREIRA, A. J., RAMOS, A. S., FERREIRA, J. R., ABRAHAO-NETO, J., FARAH, J. P & DORRY, EL- H. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 13983-13988, 2002.
- CHEEWANGKOON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C., & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**, v. 23, p. 55-85, 2009.
- COCOLIN, L., BISSON, L & MILLS, D. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 81–87, 2000.
- DOIDY, J., GRACE, E., KÜHN, C., SIMON-PLAS, F., CASIERI, L & WIPF, D. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. **Trends in Plant Science**. v. 17, p. 413-422, 2012.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, p. 30-39, 2014.
- GLICK, B. R., CHENG, Z., CZARNY, J & DUAN, J. **Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria**. In New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research (pp. 329-339). Springer Netherlands, 2007.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T & RYAN, P.D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.

- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HUBBARD, M., GERMIDA, J. J & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology*, v. 116, n.1, p. 109-122, 2014.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHARWAR, R. N., GOND, S. K., KUMAR, A & MISHRA, A. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A proposed taxonomy of anaerobic fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LISEC, J., SCHAUER, N., KOPKA, J., WILLMITZER, L & FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387–396, 2006.
- LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E. H & HYDE, K. D: Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. **Canadian Journal Microbiol**, v. 48, p. 1109-1112, 2002.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.
- MASOUD, W., BJØRG CESAR, L., JESPERSEN, L & JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East África determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**. v. 21, p. 549-556, 2004.
- MAXWELL, A., HARDY, G. E. STJ., WINGFIELD, M. J. & DELL, B. First record of *Mycosphaerella lateralis* on *Eucalyptus* in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 29, p. 279, 2000.
- MAXWELL, A., JACKSON, S. L., DELL, B., & HARDY, G. E. S. J. PCR-identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. **Mycological Research**, v. 109, p. 992-1004, 2005.

- MAY L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 829-841, 2001.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594, 2013.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, 78–81, 2001.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- POZO, M. I., HERRERA, C. M & BAZAGA, P. Species richness of yeast communities in floral nectar of southern Spanish plants. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 82-91, 2011.
- PRAKITCHAIWATTANA, C. J., FLEET, G. H & HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, v.4, p. 865–877, 2004.
- RAYNER, A. D. M & BODDY, L. Population structure and the infection biology of wood-decay fungi in living trees. **Advance Plant Pathology**, v. 5, p. 119–160, 1986.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- SAIKKONEN, K., WALI, P., HELANDER, M & TAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 275-280, 2004.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.

- SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S., BILLS, G. F & ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal species diversity in juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus* from plantations affected by *Mycosphaerella* leaf disease. **Annals of Applied Biology**, v. 158, p. 177-187, 2011.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- WHIPPS, J. M., HAND, P., PINK, D & BENDING, G. D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 1744-1755, 2008.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 4

DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As associações de plantas com bactérias endofíticas contribuem significativamente para a fitossanidade e produtividade das culturas. Bactérias endofíticas adaptaram-se à vida no interior dos tecidos vegetais, podendo contribuir positivamente para processos-chave para nutrição das culturas, a exemplo da fixação biológica de nitrogênio. O *Eucalyptus* é um dos gêneros de plantas mais cultivados e valorizados economicamente no mundo. A caracterização da comunidade microbiana associada às espécies deste gênero pode proporcionar novas ferramentas biotecnológicas para o cultivo sustentável e mais econômico dessas plantas. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, incluindo os grupos com potencial para fixação de N associados às folhas dessa planta. A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica foi acessada por PCR-DGGE, isolamento e sequenciamento do gene rRNA 16S. Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma-) e Actinobacteria foram identificados na comunidade investigada. Nessa comunidade, esse é o primeiro relato das espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* como endofíticas. A diversidade variou entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, sendo Proteobacteria o filo mais representativo em folhas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento, e Firmicutes no campo. A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento em estudo, com muitas espécies encontradas apresentando potencial para fixação de nitrogênio.

Palavras-chave: diversidade, bactérias endofíticas, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

Eucalyptus é um dos gêneros de planta mais cultivados em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, pelo rápido crescimento, adaptabilidade e valor comercial da madeira produzida (BROOKER, 2000). O rápido crescimento do eucalipto demanda alta disponibilidade de nutrientes, especialmente nitrogênio (SMETHURST *et al.*, 2004). Esse elemento pode ser obtido pela fixação biológica, realizada por bactérias de vida livre e por endofíticas (SUMMAN *et al.*, 2005; REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo da comunidade microbiana do eucalipto pode proporcionar melhor panorama das interações planta-micro-organismo, permitindo ampliar o entendimento da contribuição da microbiota associada para a nutrição florestal.

A parte aérea de várias plantas abriga ampla diversidade de micro-organismos, especialmente bactérias e fungos, com grande importância ecológica (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Essa diversidade tem sido alvo de vários estudos que revelam a presença de bactérias em diferentes órgãos do hospedeiro, influenciando sua sanidade e desenvolvimento (BRADER *et al.*, 2015). Micro-organismos endofíticos adaptam-se a ambientes específicos do corpo da planta e, ao colonizá-los (BULGARELLI *et al.*, 2013), podem estimular o crescimento vegetal por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de auxinas e seus análogos e pela síntese de giberelinas (WAQAS *et al.*, 2012). A interação eucalipto-bactérias endofíticas é pobremente documentada, sendo a maioria das pesquisas focada nos micro-organismos associados às raízes (BONITO *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2014).

A diversidade microbiana tem sido acessada em diversas plantas agronomicamente importantes pela utilização da análise molecular das comunidades microbianas por meio de métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) e independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Apesar da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de bactérias em *Eucalyptus* spp. (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), da importância das endofíticas como parte da comunidade microbiana dessas plantas (BRADER *et al.*, 2015) e do Brasil ser o maior produtor mundial dessa essência florestal, pouco se conhece sobre a microbiota endofítica associada ao eucalipto. Variações na estrutura dessa comunidade em função da idade da planta e das fases de desenvolvimento em viveiros comerciais são totalmente desconhecidas. Da mesma forma, a diversidade de bactérias com potencial de fixação de nitrogênio

sob essas mesmas condições necessita ainda ser caracterizada.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas, incluindo aquelas com potencial de fixação de nitrogênio, em associação com folhas de plantas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento em viveiros comerciais e em campo, combinando métodos dependentes e independentes de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Esse estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP - etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato

Fertilizantes	Doses* (kg/m ³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é 19° 24' 54”, a longitude 42° 25' 56” e a altitude 318 metros. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulínítico ou caulínítico-oxídico ou gibbsítico-oxídico, hipoférrico ou mesoférrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente, a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56,39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20 °C. Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato (0,05 mmol.L⁻¹), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de

sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspensionado e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspensionado *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Análise da Diversidade de bactérias totais e diazotróficas

A estratégia Nested-PCR foi utilizada para acessar a diversidade de bactérias totais em folhas de eucalipto por DGGE. O DNA total, na primeira PCR, foi utilizado como molde para amplificação do gene rRNA 16S, e, juntamente com primers P027/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005), produziram *amplicons* específicos que serviram de molde para a segunda PCR, com os primers 984GC/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005).

As PCRs foram realizadas em volume final de 25 μ L, sendo 5 μ L do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 μ M de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 μ M dos primers, 20 ng de molde e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 47 °C por 1 min, extensão por 2 min a 72 °C e extensão final durante 10 min a 72 °C.

O acesso à diversidade de bactérias potencialmente fixadoras de N em folhas de eucalipto foi obtido por PCR em duas reações: uma utilizando os primers polF/polR (POLY *et al.*, 2001) e outra substituindo polF por polFGC. As reações foram realizadas em volume de 50 μ L contendo tampão 1X, 1.5mM MgCl₂, 0.12mM of dNTPs, 0.3 μ M de cada *primer*, 1U Taq polymerase e 10 ng molde, submetidos a desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 0,5 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min e extensão final de 72 °C por 10 min. (MAPELLI *et al.*, 2013).

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após as PCRs foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioideus thermo- lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (37.5:1, acrilamida – N,N=–metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris–HCl, pH 8.0, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09% (v/v) TEMED (N,N,N=,N=–tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 40%–60% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em

tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e as imagens dos géis obtidas por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de bactérias totais e fixadoras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessas comunidades foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software sigmaplot (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Isolamento de bactérias endofíticas

As folhas desinfestadas de cada uma das fases de desenvolvimento do eucalipto foram utilizadas para estabelecer a densidade de bactérias cultiváveis por folha ([UFC] folha⁻¹). As folhas foram individualmente trituradas em homogeneizador em tubos contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7). A suspensão foi, então, filtrada em gaze esterilizada, e o filtrado diluído seriadamente em tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7.0). Alíquotas de 100 µL foram espalhadas em meio sólido R2A e incubadas a 28°C por 72 horas.

Extração de DNA de culturas puras

O DNA total das culturas puras crescidas em meio R2A líquido foi extraído utilizando o Kit de purificação de DNA (Promega™, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. A integridade e a quantidade de DNA extraído foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corados com Gel Red® 1000X, e as imagens obtidas utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

BOX-PCR

BOX-PCR foi realizado utilizando o primer BOX-A1R (VERSALOVIC *et al.*, 1994) para analisar a diversidade genômica em nível de isolado. A PCR foi preparada em volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão, 3,75 µL de MgCl₂ 25mmol, 0,5 µL de dNTPs 10 mmol, 1,25 µL de DMSO, 1,25 µL de BSA (soro albumina bovina), 0,5 µL oligonucleotídeos iniciadores BOX-A1R (10mM) e 0,25 µL de Taq DNA polymerase (BONIEK *et al.*, 2010), 1 µL de DNA e 15,25 µL de água mili-Q autoclavada. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94° C por 7 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min, extensão por 8 min a 65°C e extensão final durante 16 min a 65°C (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Os *amplicons* obtidos pela PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) a 100V durante 6 horas e corados com Gel Red® 1000X. As imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil). Para determinar a similaridade entre os isolados o gel de agarose contendo os produtos BOX-PCR foi analisado por UPGMA (agrupamento médio entre grupos) software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). O dendrograma resultante foi avaliado com base no coeficiente de Jaccard, o qual analisa a similaridade e a distância com base nas bandas obtidas. Isolados com valores de similaridade acima de 90% foram considerados iguais.

Amplificação e sequenciamento do rRNA 16S

Os *primers* universais P27F/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005) foram utilizados para amplificar o gene rRNA 16S dos isolados bacterianos diferenciados por BOX-PCR. A reação foi realizada contendo aproximadamente 20 ng de DNA, tampão (Promega), 2,25 mmol of MgCl₂, 210 mmol de cada *primer*, 250 µM of deoxinucleotídeos (dNTPs), e 0,02 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega). A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf-Germany) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 min, e extensão a 72°C por 1,5 min, com extensão final de 7 min a 72°C. Os *amplicons* foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) e o gel corado com Gel Red® 1000X. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank*

(NCBI). Para cada sequência bacteriana foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97%, identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências do gene rRNA 16S utilizando ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética baseado no alinhamento dessas sequências foi feito utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram obtidos por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica em folhas de plantas de eucalipto provenientes das fases do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e a campo foram examinadas por DGGE, cultivo em placa e sequenciamento do rRNA 16S. A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e potenciais fixadoras de nitrogênio. Essa abordagem permitiu a identificação de comunidades mais e menos abundantes pela presença de bandas mais e menos intensas nos géis (Figuras 1 e 2). A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes fases de desenvolvimento dessa planta (Figura 2).

O perfil de bandas e a análise de agrupamento mostraram que a comunidade bacteriana endofítica em folhas de eucalipto foi homogênea, com alta similaridade, e as populações mais distintas estão presentes no jardim clonal e no campo. Essas duas fases mostraram a formação de dois grupos distintos, com menor similaridade que os demais (Figura 1). Portanto, a comunidade bacteriana endofítica de eucalipto variou em relação às fases de desenvolvimento dessa

planta.

Em comparação com a comunidade de bactérias endofíticas totais, a de diazotróficos revelou-se mais heterogênea entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, pelo menor número de agrupamentos distintos. A comunidade de endofíticas diazotróficas no campo é distinta das outras etapas de desenvolvimento, com valores de similaridade inferiores a 58,3% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelas diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). A DGGE mostrou sensibilidade em detectar diferenças na comunidade endofítica diazotrófica em folhas de eucalipto, sendo o gene *nifH* marcador molecular eficiente para verificar diferenças de forma rápida na diversidade e distribuição de diazotróficas endofíticas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas.

A distribuição de bandas revelou poucas alterações na estrutura da comunidade de bactérias endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto, sendo que a maior parte delas foi ocasionada pelas bactérias diazotróficas (Figura 3). A maioria das UTOs é compartilhada entre as fases de desenvolvimento das plantas para ambas as comunidades. Entretanto, a presença de UTOs específicas é evidente, o que reflete as diferenças na estrutura da comunidade nas folhas provenientes do campo (Figura 3). Essas mudanças demonstraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a comunidade de bactérias endofíticas nas condições avaliadas, fato mais evidenciado entre as bactérias diazotróficas.

Os índices de diversidade de Shannon e de riqueza foram calculados para as comunidades de bactérias endofíticas em interação com as folhas de eucalipto. A diversidade e a riqueza de bactérias endofíticas totais foram maiores nas folhas provenientes do campo (Figura 4). De forma distinta, para as bactérias diazotróficas, as maiores médias desses índices foram obtidas para as amostras de folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo (Figura 5). Esses resultados indicam que as fases de desenvolvimento de eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias diazotróficas endofíticas do que a de bactérias totais. As folhas provenientes do jardim clonal e da expedição foram as que mostraram as menores médias de diversidade e de riqueza de bactérias endofíticas diazotróficas (Figura 5).

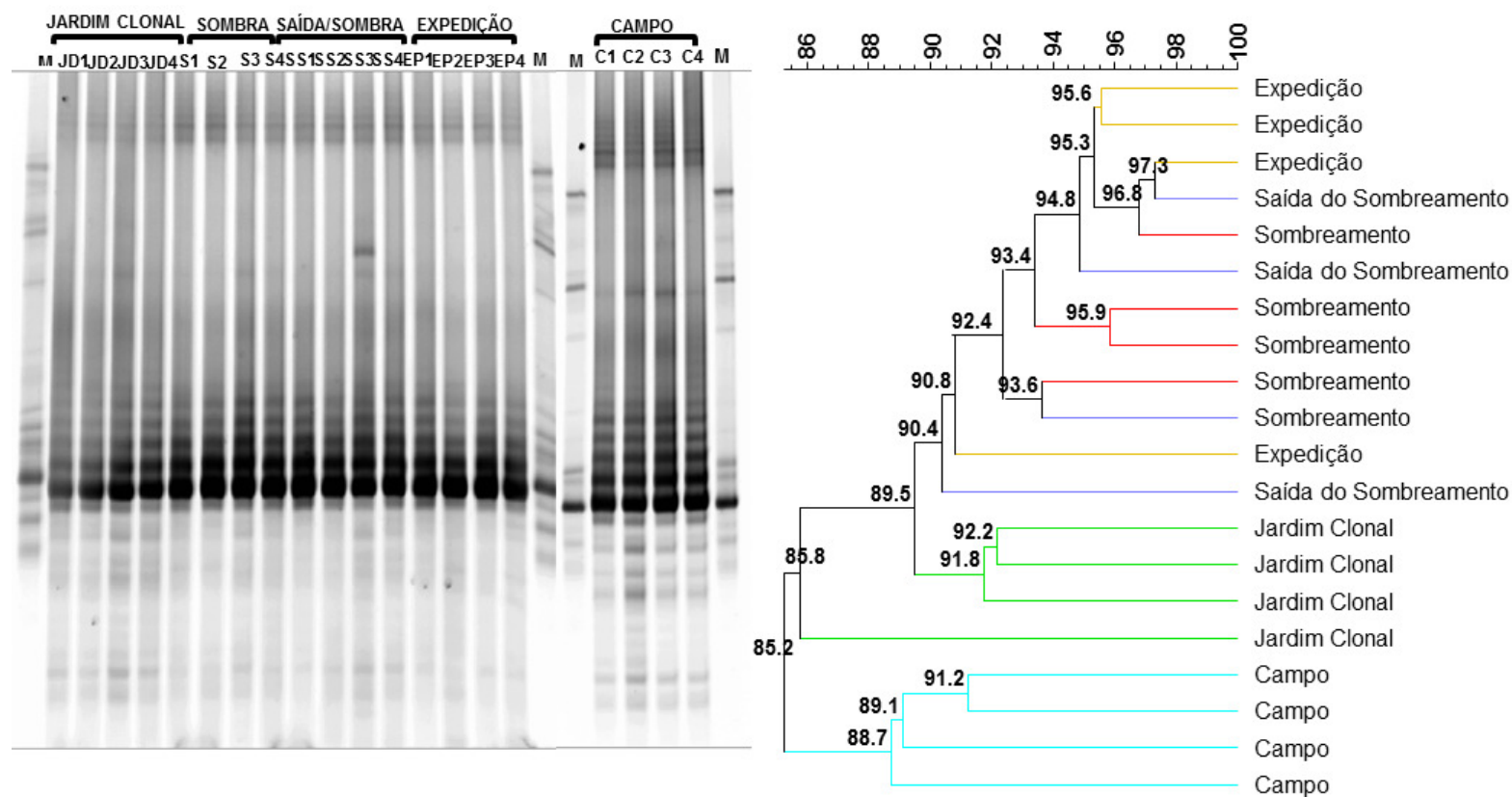


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes rRNA 16S. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene rRNA 16S das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

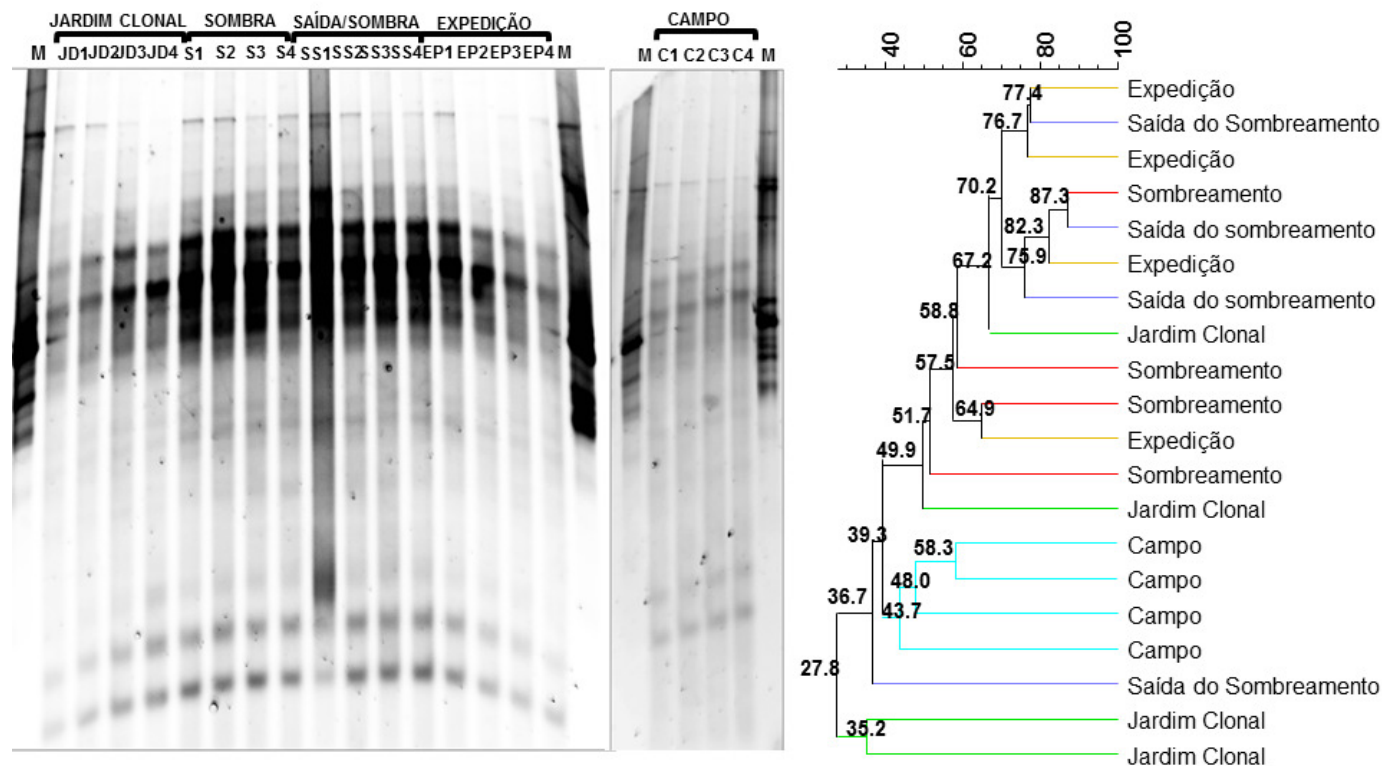


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes *nifH*. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém- saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene *nifH* das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

Os isolados com perfil genômico distinto, segundo a técnica de BOX-PCR, e com índices de similaridade inferiores a 90% (dados não publicados) foram identificados por sequenciamento do rRNA 16S e comparados com sequências obtidas pelo algoritmo BLAST (NCBI). O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria (Figura 6). Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, seja no viveiro ou em campo. As sequências de rRNA 16S obtidas de 32 isolados apresentaram alta identidade com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Entre essas sequências, somente duas, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores de identidade inferiores a 97%. Esses isolados foram identificados apenas em nível de gênero, e os demais, em nível de espécie (Figura 6).

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento das plantas, já que apenas 27% das espécies identificadas foram isoladas em mais de uma etapa, como *Bacillus flexus*, presente desde as folhas do jardim clonal até as do campo (Figura 6). A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S (44%) foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento (35%). A colonização endofítica pelo gênero *Bacillus* em folhas de eucalipto inicia-se no jardim clonal e se estende em etapas subsequentes em que são encontradas as espécies *B. flexus*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Figura 6).

A análise filogenética das sequências de rDNA 16S com identidades acima de 97% confirmou que a comunidade de bactérias endofíticas em folhas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto pertencem aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, pela formação de clados distintos com altos *bootstraps* (Figuras 7). Os *bootstraps* apresentados pela maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007) (Figura 7).

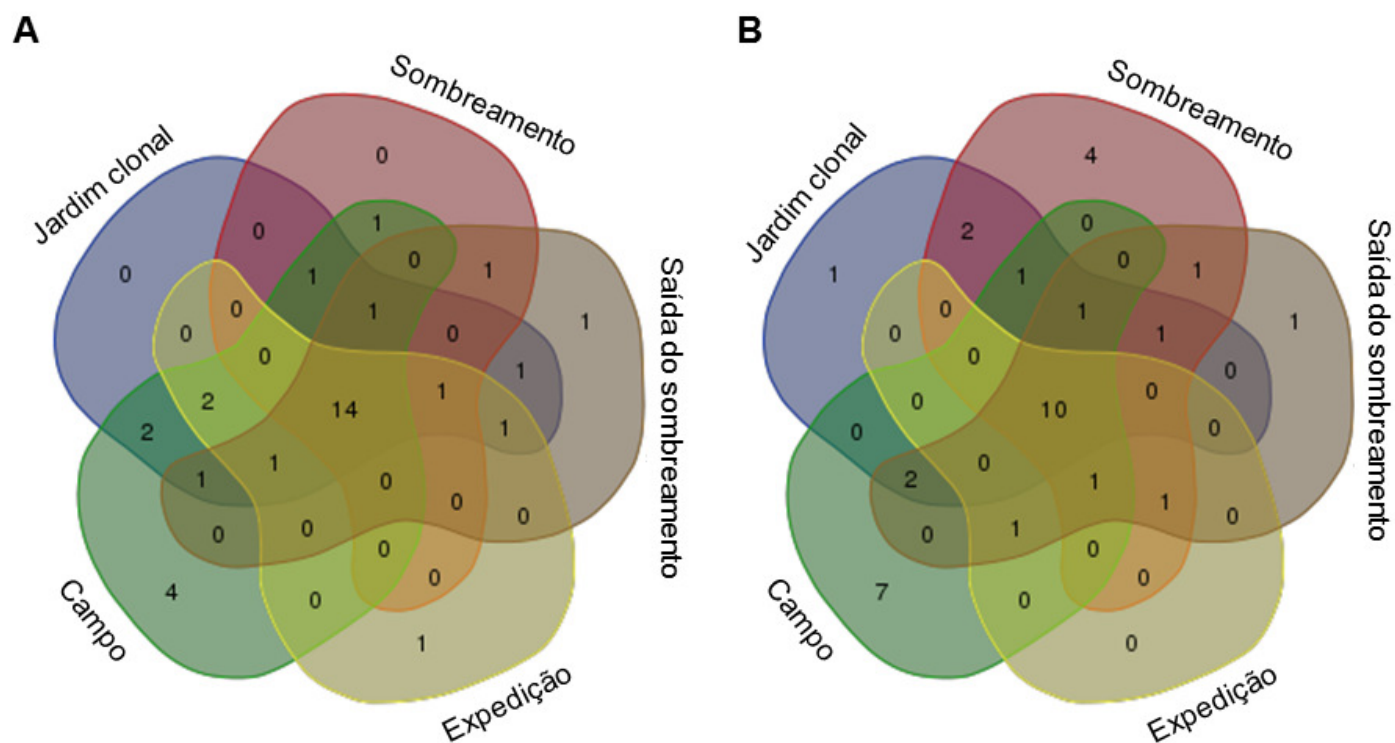


Figura 3: Distribuição de UTOs de bactérias endofíticas totais (A) e potencialmente diazotróficas (B) pelo diagrama de venn em diferentes etapas de desenvolvimento das folhas de eucalipto: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo.

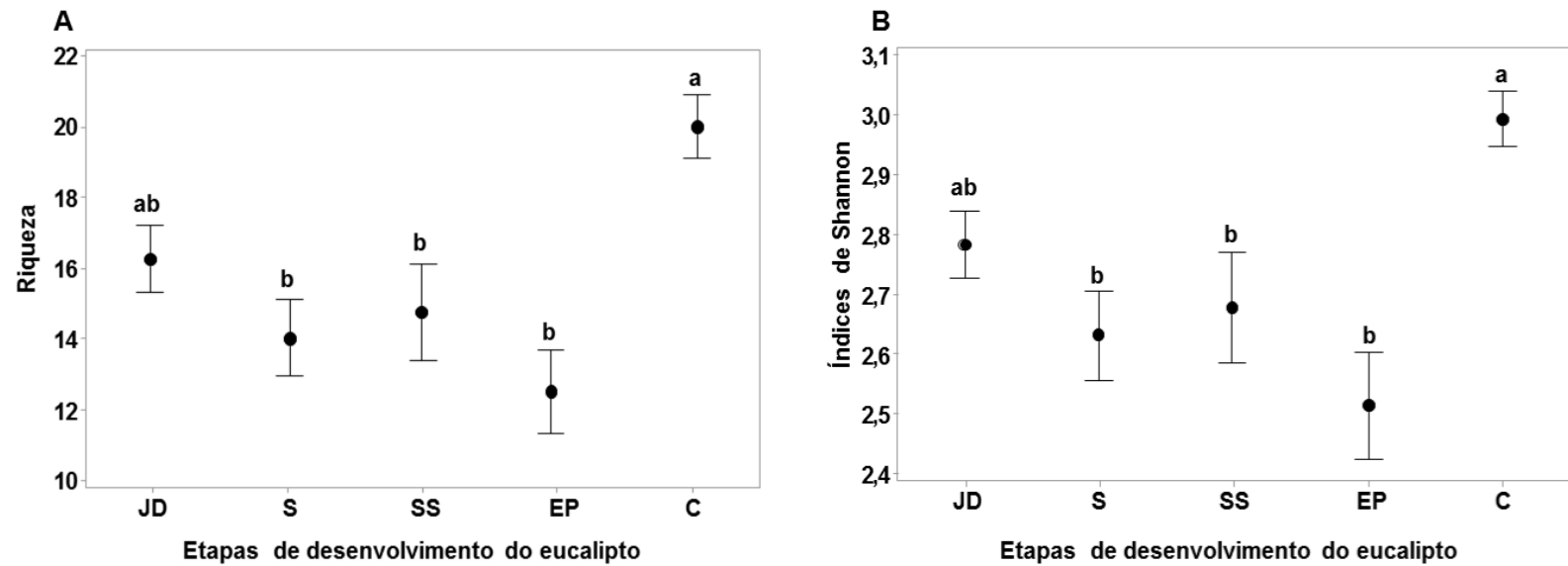


Figura 4: Perfil de Riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas totais provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

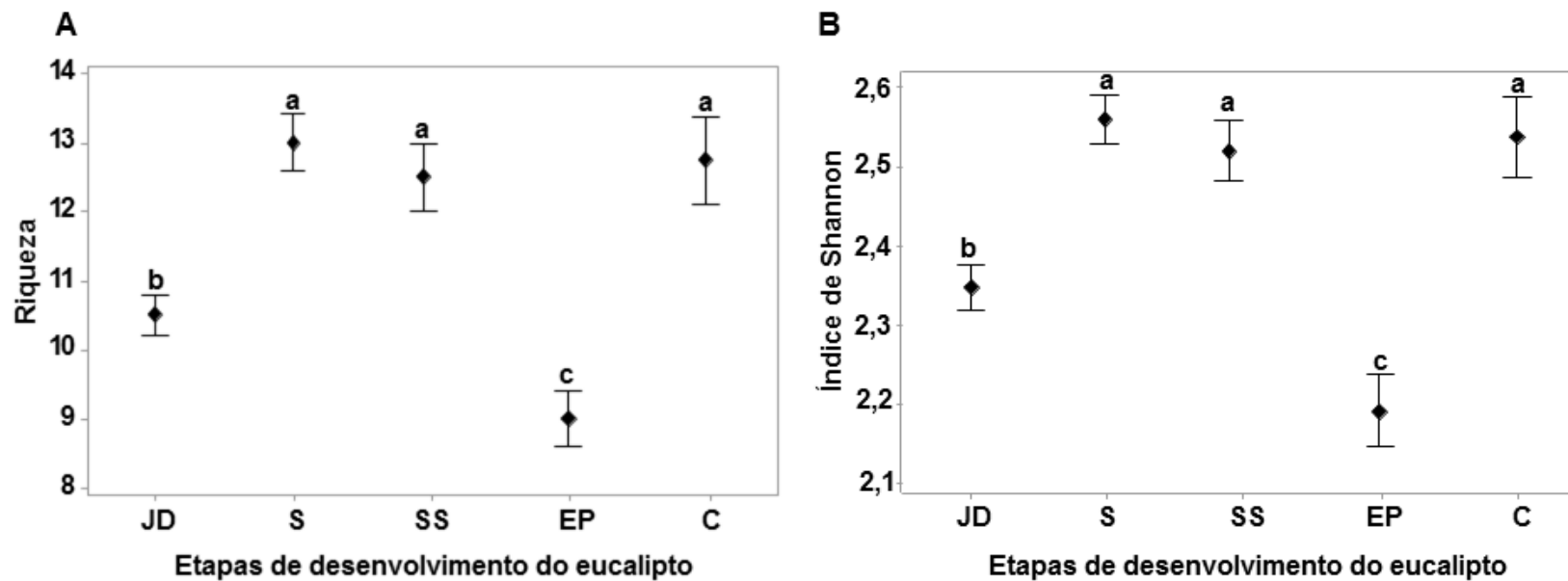


Figura 5: Perfil de riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise filogenética das sequências revelou que a maioria delas pertence ao filo Gammaproteobacteria, em que se destacam os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Firmicutes e Alphaproteobacteria são os filos que apresentaram o maior número de gêneros distintos. Betaproteobacteria foi o filo menos representativo entre os encontrados, sendo o isolado BAC 06 identificado como *Massilia timonae* e próximo filogeneticamente a *Massilia timonae* (Figura 7). Entre os Firmicutes, *Bacillus* foi gênero predominante (Figura 6) com *bootstrap* 99 (Figura 7). *Paenibacillus terrigena* (BAC 33) e *Paenibacillus darwinianus* (BAC 29), colonizadoras exclusivas da expedição e do campo, respectivamente, ainda não foram documentadas em interação endofítica com plantas. *Terrabacter lapilli* (BAC 32) é a única actinobacteria isolada de folhas de eucalipto que ainda não foi registrada como endofítica. Alphaproteobacteria contribui com a presença de muitas bactérias diazotróficas, o que inclui *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium grahamii* e *Rhizobium pusense* (Figuras 6 e 7). O isolado BAC 16, identificado como *Rhizobium pusense* (Figura 6), agrupou com alta sustentação filogenética com *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium pusense* (Figura 7). Nesse filo, *Rhizobium grahami* (BAC 25) e *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) foram pela primeira vez identificadas como endofíticas (Figura 6). Essas duas espécies foram isoladas de mudas de eucalipto recém-saídas do sombreamento, não persistindo as demais fases de desenvolvimento da planta. *Novosphingobium barchamii* apresentou proximidade filogenética com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7). Para a maioria dos isolados essa análise (Figura 7) confirmou a identificação realizada pela comparação com as sequências encontradas no BLAST (Figura 6). Outra espécie acrescida ao universo das endofíticas é a Gammaproteobacteria *Stenotrophomonas panacihumi* (Figuras 6 e 7), isolada de mudas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento (Figura 6). Portanto, as folhas de eucalipto sustentam uma comunidade de bactérias endofíticas diversa e dependente das fases de desenvolvimento dessa planta.

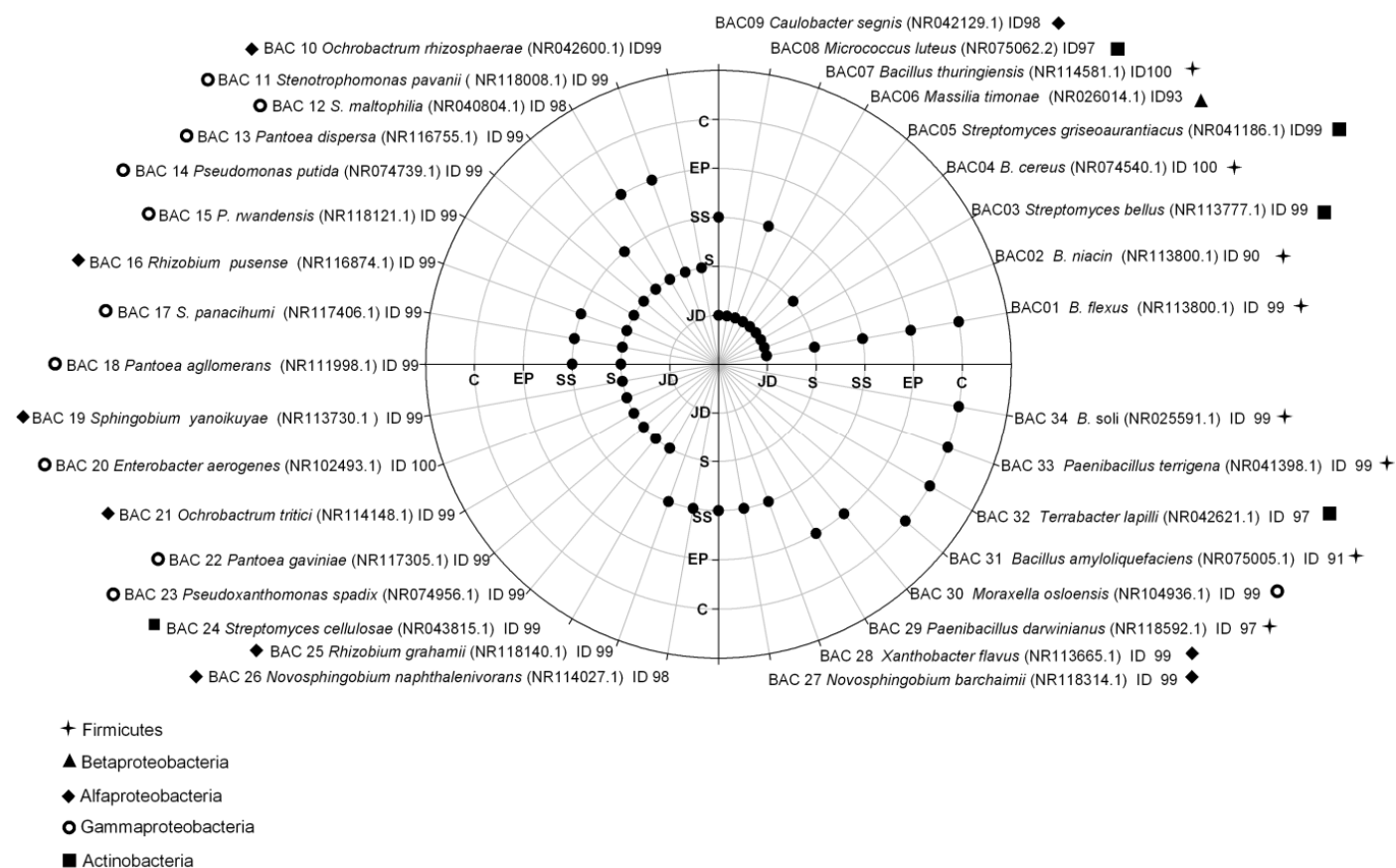


Figura 6: Distribuição das espécies de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; 1, 2, 3 e 4: Repetições. As espécies estão acompanhadas do número de acesso do *GenBank* (NCBI) e dos valores de identidades (ID) em porcentagem.

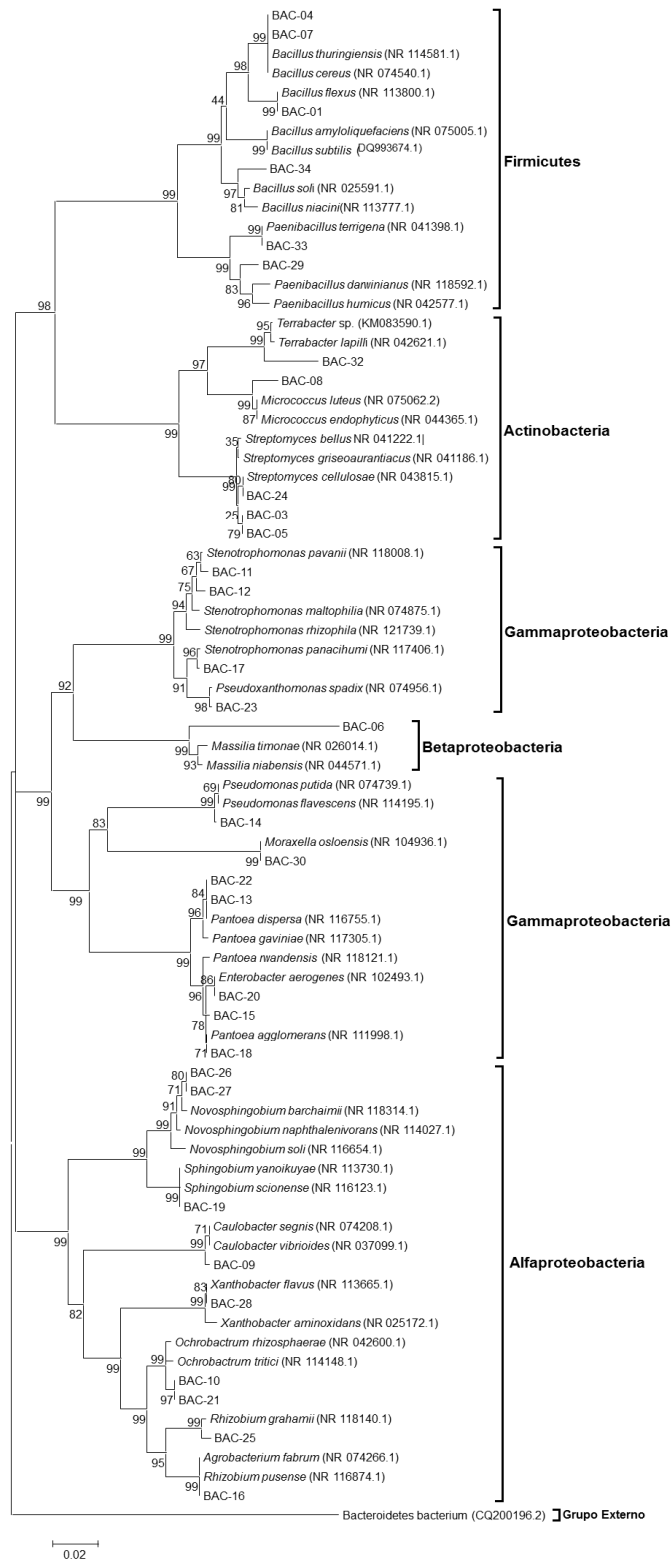


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 16S de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A amplificação do gene rDNA 16S e a separação dos *amplicons* por DGGE mostrou eficiência no acesso à diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto. Através do sequenciamento dos isolados e identificação por busca no NCBI, mais informações sobre essa comunidade foram obtidas. Com essas informações, as sequências e a filogenia foram conhecidas. DGGE é boa escolha para avaliação da diversidade das interações planta-micro-organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2013), sendo o método semiquantativo rápido para descrição de comunidades microbianas complexas (PETERSEN & DAHLLOF, 2005). O estudo dessas interações é importante, uma vez que o interior das plantas é habitat de grande diversidade de micro-organismos endofíticos que desempenham papéis relevantes na sanidade e no desenvolvimento das plantas (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Ao adaptarem-se a esse ambiente e colonizá-lo, os micro-organismos endofíticos expressam potencial metabólico diferenciado dos micro-organismos de vida livre (BRADER *et al.*, 2014).

A análise de agrupamento das bandas de DGGE de fragmentos rRNA 16S exibiu separação eletroforética clara e a formação de grupos distintos. Esses agrupamentos foram menos evidentes na comunidade de bactérias diazotróficas comparada com a de bactérias totais com valores de similaridade inferiores a 30% entre as fases de desenvolvimento do eucalipto. Essas pequenas porcentagens de similaridade (Figura 1) indicam alta variação entre os grupos bacterianos (ALTIMIRA *et al.*, 2012) nas folhas de eucalipto. Entretanto, a comunidade de endofíticas diazotróficas no campo parece recrutar uma microbiota própria, a qual é distinta das outras etapas de desenvolvimento da planta, com similaridade entre 43 e 58% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelos potencialmente diazotróficos presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). O gene *nifH* utilizado na DGGE mostrou ser marcador molecular eficiente em verificar diferenças na diversidade e distribuição da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas em folhas de eucalipto. Essa abordagem consistente proporciona a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes nessa comunidade (Figura 2). Esses resultados mostraram que essas fases modulam a comunidade de bactérias endofíticas, sendo que muitas delas têm potencial para estimular o crescimento vegetal por fixação de nitrogênio. Essa capacidade possibilitaria condições para a melhoria da nutrição das plantas pela presença da enzima nitrogenase (OLDROYD & DIXON, 2014). Este estudo pode,

então, fornecer contribuições para a busca de soluções biotecnológicas para resolver o problema do nitrogênio em plantas.

A diversidade de bactérias endofíticas em árvores é estudada com menor frequência quando comparada a outras plantas (EL-DEEB *et al.*, 2013; KUKLA *et al.*, 2014; MIGUEL *et al.*, 2013). Em *Eucalyptus*, pouco se conhece sobre as interação planta-bactéria, e os estudos existentes enfatizam o solo (DA SILVA *et al.*, 2014), a rizosfera e as raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010), os caules (PROCÓPIO *et al.*, 2009) e as sementes (FERREIRA *et al.*, 2008).

A modulação da composição das comunidades de bactérias endofíticas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto é evidenciada pelos maiores índices de riqueza e diversidade nas folhas provenientes do campo (Figura 4). Embora o perfil de diversidade da comunidade endofítica diazotrófica seja distinto, pois as maiores médias dos índices foram obtidas em folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo, as etapas de desenvolvimento da planta também modulam essa comunidade (Figura 5). As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas do que as de bactérias totais.

Índices de diversidade são essenciais nesse tipo de abordagem entre comunidades (MOHAMMAD & RAWASHDEH, 2015), e as mais diversas apresentam maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2011). Os índices encontrados neste estudo estão entre aqueles comumente citados na literatura (Figura 4), que mostram valores variando entre 1,5 e 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). As diferenças na diversidade de bactérias endofíticas podem ser atribuídas às concentrações distintas de açúcares encontradas nesse ambiente, aliada às variações catabólicas encontradas na maioria das bactérias heterotróficas filogeneticamente próximas (RODIONOV *et al.*, 2010). A fixação de nitrogênio requer a utilização de fontes de carbono e energia, e os gêneros que apresentam essa capacidade podem ser distintos em tempo de geração, taxa de crescimento e quantidade consumida de carboidratos (NAHER *et al.*, 2008). Em cianobactérias a clivagem da sacarose é essencial no metabolismo do carbono e fixação do nitrogênio (FIGUEROA *et al.*, 2013). Assim, em etapas com concentrações superiores de sacarose pode haver predomínio de bactérias diazotróficas que, à semelhança de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, utilizariam sacarose como fonte de energia (VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto é composta pelos filos Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta-, e Gamma) e Actinobacteria. As

bactérias endofíticas isoladas e identificadas por sequenciamento do rRNA 16S, em sua maioria, mostraram identidades superiores a 97% com as sequências depositadas NCBI, e somente dois isolados, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores inferiores a esse (Figura 6). Em geral, identidades acima de 97% são adotadas em estudos de filogenia como padrão para conceituação de organismos da mesma espécie (AL-BATAYNEH *et al.*, 2011), embora autores reconheçam que valores entre 98,5 e 99% são mais desejáveis e consistentes (STACKEBRANDT & EBERS, 2006). A confiabilidade dos alinhamentos foi confirmada utilizando-se o *e-value* (dados não mostrados), o qual indica a probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de bases, outro alinhamento com escore igual ou superior (KERFELD & SCOTT, 2011). Os isolados com identidades inferiores a 97% foram classificados em nível de gênero, após alinhamentos das sequências obtidas por sequenciamento do rDNA 16S com sequências correspondentes do NCBI (Figura 6).

O principal filo encontrado em plantas sombreadas e recém-saídas do sombreamento foi Proteobacteria, classes Alfa-, Beta- e Gamma (Figura 6). Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria apresentam habilidade em catabolizar carboidratos simples e complexos (LI *et al.*, 2014), o que facilita a adaptação ao habitat endofítico. A análise da diversidade da comunidade de folhas por meio das sequências de rRNA 16S, em abordagens dependentes e independentes de cultivo tem mostrado a dominância de Proteobacteria (BULGARELLI *et al.*, 2013). Entre os micro-organismos encontrados, muitos são potencialmente diazotróficos (Figura 6) (KÖBERL *et al.*, 2013), com a presença do gene *nifH*, o qual está relacionado à fixação de nitrogênio (WEBER *et al.*, 2013). Bactérias pertencentes à Firmicutes geralmente predominam na rizosfera (BODENHAUSEN *et al.*, 2013); porém, muitas de suas espécies apresentam boa adaptação ao estilo de vida endofítico (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa colonização frequentemente tem origem na infecção de bactérias do solo nas junções das raízes laterais e na rápida disseminação pelos espaços intercelulares do sistema radicular (CHEN & ZHU, 2015). Entretanto, a maioria das bactérias endofíticas isoladas das diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto demonstrou interação etapa-específica, com poucas delas colonizando mais de uma etapa (Figura 6).

A presença de espécies específicas em cada etapa na comunidade endofítica indica que parte dela pode não ser originária do solo, e sim alcançar o interior da folha pelos estômatos, ferimentos, ou outras portas de entrada (ROMERO *et al.*, 2014). Nesse novo habitat, Proteobacteria pode ter crescido e

proliferado mais rapidamente em fontes de carbono mais prontamente disponíveis (LEFF *et al.*, 2014) no sombreamento e na saída do sombreamento (capítulo 2). Assim, a comunidade de endofíticas pode ser influenciada pela composição e concentração de açúcares e aminoácidos. Plantas mais jovens e em sombreamento apresentam maiores conteúdos de aminoácidos (CHEN & POLAND, 2009; STEINBAUER *et al.*, 2013). Muitos gêneros de Proteobacteria utilizam preferencialmente ácidos orgânicos ao invés de açúcares (PORTAIS & DELORT, 2002), o que também pode ter contribuído para a predominância de Proteobacteria nessas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figura 6).

O predomínio de Firmicutes nas folhas oriundas do campo (Figura 6) pode ser atribuído às maiores concentrações de açúcares (capítulo 2) acompanhadas dos menores teores de aminoácidos (STEINBAUER, 2013). Entretanto, *Bacillus flexus* mostrou-se abundante em todas as fases de desenvolvimento (Figura 6), podendo o início da colonização desse gênero ocorrer no jardim clonal, evidenciado pela ocorrência de algumas de suas espécies em mais de uma fase de desenvolvimento das mudas (Figura 6). A colonização e permanência de *Bacillus flexus* indica a existência de maquinaria genética específica para colonização e persistência em folhas de eucalipto, sendo um endofítico competente (HARDOIM *et al.*, 2008), generalista e com maior capacidade competitiva. Folhas são um habitat mais dinâmico em comparação com a rizosfera e a comunidade microbiana em interação com ela está mais sujeita a variações de temperatura, umidade e radiação durante o dia e a noite, fatores que mudam a comunidade microbiana e a fisiologia da planta (TURNER *et al.*, 2013).

A versatilidade metabólica de bactérias do gênero *Bacillus* confere maior resistência e resiliência desses micro-organismos em vários ambientes com temperaturas, concentrações de sais e pH variáveis (AQEL *et al.*, 2012). Durante as etapas de desenvolvimento do eucalipto ocorrem mudanças na fisiologia da planta (MANKESSI *et al.*, 2010), as quais podem ser responsáveis por modificar a comunidade de bactérias endofíticas. Essas mudanças permitem às bactérias endofíticas multiplicarem-se rapidamente e predominarem em condições favoráveis, mantendo latência em condições menos propícias ao crescimento e proliferação. Bactérias endofíticas em interação com eucalipto podem ser relevantes para a fisiologia da planta e proporcionar tolerância a fatores bióticos e abióticos. Essas características aumentam a sobrevivência e o crescimento da planta em condições adversas e em competição com patógenos (GAIERO *et al.*, 2013). Acrescente-se, ainda, a produção de grande variedade de reguladores de crescimento como

giberelinas, ácido abscísico e auxinas (GAIERO *et al.*, 2013).

A análise filogenética das sequências de rRNA 16S confirmou que a comunidade de endofíticas em folhas de eucalipto está incluída em Firmicutes, Proteobacteria (Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria pela formação de clados distintos (Figura 7). Os *bootstraps* acima de 95 (Figura 7) na maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007). Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Esses gêneros são fixadores de nitrogênio e produtores e excretadores de AIA e aminoácidos (LIBA *et al.*, 2006). Esses metabólitos liberados pelos endofíticos podem ser utilizados pela planta e aumentar sua taxa de crescimento (KEMBEL *et al.*, 2014). A fixação de nitrogênio é amplamente difundida entre bactérias e essa capacidade pode proporcionar uma oportunidade para melhorar a nutrição de plantas (OLDROYD & DIXON, 2014). Entre as Proteobacterias fixadoras de nitrogênio estão dois isolados de *Rhizobium* (Figura 6), com alta identidade e *bootstrap*, geneticamente relacionados com *Agrobacterium*, *Ochrobactrum rhizosphaerae* e *Ochrobactrum tritici* (Figura 7).

Ochrobactrum rhizosphaerae foi descrita recentemente no solo com capacidade de utilizar sacarose e frutose como fontes de carbono (KAMPFER *et al.*, 2008), sendo neste estudo descrita aqui como endofítica em eucalipto. *Xantobacter flavus* é outra fixadora de N descrita há 36 anos com sistema similar a *Azotobacter* e utiliza muitos ácidos orgânicos. A maioria dos carboidratos é utilizada por esses micro-organismos após incubação prolongada (MALIK & CLAUS, 1979). Essas bactérias formam um clado distinto com alto *bootstrap*, o que garante a proximidade filogenética entre elas. Os genes de fixação de nitrogênio presentes podem ser uma das características que as aproximam filogeneticamente.

A maioria dos Firmicutes isolados das várias fases de desenvolvimento do eucalipto pertencente ao gênero *Bacillus* e o filo Alfaproteobacteria foi o que contribuiu com o maior número de gêneros distintos (Figura 6). *Bacillus* geralmente é a bactéria endofítica mais encontrada, sendo fonte de várias enzimas com grande potencial biotecnológico, como amilases, proteases, celulasas e lipases (KANNAN *et al.*, 2015). Essas enzimas parecem ser fundamentais para o início da colonização endofítica (SEO *et al.*, 2010). Esses micro-organismos são capazes de produzir auxinas e giberelinas, em adição à fixação de nitrogênio, e secretar substâncias importantes no controle biológico de patógenos (BACON *et al.*, 2015).

O filo Betaproteobacteria foi o menos representativo entre os isolados e BAC 06 foi identificado como *Massilia timonae* (Figuras 6 e 7). Essa espécie é

colonizadora da rizosfera, raízes (OFEK *et al.*, 2012) e folhas (JACKSON *et al.*, 2013) e promotora de crescimento pela produção de AIA, sideróforos em várias espécies de planta. A sensibilidade de *Massilia timonae* à competição (OFEK *et al.*, 2012) pode ser a causa da incapacidade dela em manter-se em outras fases de desenvolvimento do eucalipto, fato que pode ter ocorrido também com outras espécies (Figura 6). Essa comunidade bacteriana endofítica em eucalipto é diversa e dependente dessas fases. Muitas delas são potencialmente diazotróficas e podem contribuir para a fixação de nitrogênio e promoção de crescimento (Figura 6).

A comunidade bacteriana endofítica em eucalipto *Eucalyptus* difere de acordo o órgão de isolamento, área geográfica do cultivo e a espécie de planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). Os poucos estudos existentes envolvendo essa planta mostraram a presença de *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp, *Curtobacterium* sp, *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* (CASTELLANOS *et al.*, 2010).

As espécies isoladas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto ainda não foram registradas em interação endofítica com essa planta. Este estudo, portanto, contribuiu com a inclusão de novas endofíticas em *Eucalyptus*, inclusive aquelas com potencial para fixação de nitrogênio (Figuras 6 e 7). O gênero *Novosphingobium* já foi descrito como endofítico (CASTRO *et al.*, 2014); entretanto, esse é o primeiro registro da espécie *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) como endofítica. Essa espécie está filogeneticamente relacionada com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7) e apresenta maquinaria genética que possibilita a adaptação em diversos habitat como solo, sedimentos e ambientes aquáticos (ADDISON *et al.*, 2007). O interior das folhas de eucalipto recém-saídas do sombreamento é outro importante habitat ocupado por *Novosphingobium barchamii* (Figura 6 e 7). Essa espécie utiliza glicose, sacarose e ramnose como fontes de carbono sendo isolada de solos contaminados com o inseticida hexaclorociclohexano (NIHARIKA *et al.*, 2013). *Rhizobium grahamii*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*

e *Terrabacter lappili* são outras novas espécies endofíticas isoladas de folhas de eucalipto (Figuras 6 e 7). Os altos valores de identidade e *bootstrap* confirmam a identificação dessas espécies como endofíticas (Figura 7). *Rhizobium* é comumente citado como endofítico em várias plantas, porém, a literatura consultada não aponta *Rhizobium grahami* como um deles. Essa bactéria pertence a um novo grupo filogenético de rizóbio, juntamente com *Rhizobium mesoamericanum* e outros (ALTHABEGOITI *et al.*, 2014). A presença de *Stenotrophomonas panacihumi* em interação com plantas é inédita (Figura 6), sendo até o momento encontrada apenas em solos cultivados com plantas medicinais (YI *et al.*, 2010). *Stenotrophomonas panacihumi* mostrou proximidade filogenética com *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas pavani* e *Stenotrophomonas maltophyla* (Figura 7), sendo essas duas últimas isoladas como endofíticas fixadoras em cana-de-açúcar (RAMOS *et al.*, 2014). *P. darwinianus* e *Panibacillus terrigena* são espécies incluídas em Firmicutes, o filo mais abundante entre os grupos bacterianos no ambiente como solos da Antártica (DSOUZA *et al.*, 2014), e rizosfera de bambú (HAN *et al.*, 2009). A habilidade de bactérias desse gênero em colonizar vários ambientes é atribuída à diversidade fisiológica pela formação de endósporos resistentes a estresse, à secreção de enzimas extracelulares e a compostos antimicrobianos. A presença dessas enzimas garante a hidrólise de uma variedade de carboidratos (PRIEST, 2009). A colonização inédita de *Panibacillus darwinianus* e *Panibacillus terrigena* em eucalipto ocorreu em plantas oriundas da expedição e campo, respectivamente (Figura 6). O filo actinobacteria é pouco explorado como fonte de novas bactérias endofíticas. Entretanto, mais recentemente, o número de relatos vem aumentando em várias plantas (BODENHAUSEN *et al.*, 2013; MIGUEL *et al.*, 2013; ROMERO *et al.*, 2014; LEFF *et al.*, 2014). Neste estudo, *Terrabacter lappili*, isolada de folhas de eucalipto em campo, é mais uma actinobacteria incluída entre as endofíticas (Figuras 6 e 7).

A comunidade bacteriana endofítica é parte importante do microbioma de eucalipto. Entre as bactérias que compõem essa comunidade estão as endofíticas diazotróficas, que podem contribuir com o nitrogênio necessário ao crescimento dessa planta. Entretanto, novas abordagens envolvendo a expressão de genes *nifH*, responsáveis pela fixação de N fazem-se necessárias. A descrição da diversidade desses micro-organismos em diferentes fases de desenvolvimento possibilita melhor compreensão sobre a dinâmica da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de bactérias endofíticas é etapa importante para determinar outros possíveis benefícios da interação endofítico-eucalipto e

determinar o papel ecológico que elas têm nessa interação.

CONCLUSÕES

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio. A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou-se distinta em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria. Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas*, e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento. A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.

REFERÊNCIAS

- ADDISON, S. L., FOOTE, S. M., REID, N. M & LLOYD-JONES, G. *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2467-2471, 2007.
- AL-BATAYNEH, K. M., JACOB, J. H & HUSSEIN E. I. Isolation and molecular identification of new thermophilic bacterial strain of *Geobacillus pallidus* and

Anoxybacillus flavithermus. **International Journal Integrative Biology**. v. 11, p. 39-43, 2011.

ALTHABEGOITI, M. J., ORMEÑO-ORRILLO, E., LOZANO, L., TEJERIZO, G. T., ROGEL, M. A., MORA, J & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Characterization of *Rhizobium grahamii* extrachromosomal replicons and their transfer among rhizobia. **BMC Microbiology**, 14, p. 1-14, 2014.

ALTIMIRA, F., YÁÑEZ, C., BRAVO, G., GONZÁLEZ, M., ROJAS, L. A & SEEGER, M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-12, 2012.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.

AQEL, H., AL-QUADAN, F & BOULENOUAR, N. Effects of temperature, pH-values and sodium chloride concentrations on the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by thermotolerant *Bacillus* strains. **Journal Bioscience Biotechnology**, v. 1, p. 57-65, 2012.

BACON, C. W., PALENCIA, E. R & HINTON, D. M. (2015). Abiotic and Biotic Plant Stress-Tolerant and Beneficial Secondary Metabolites Produced by Endophytic *Bacillus* Species. In: **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets** (pp. 163-177). Springer India.

BLACKWOOD, C. B., OAKS, A & BUYER, J. S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6193-6198, 2005.

BODENHAUSEN, N., HORTON, M. W & BERGELSON, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

BONIEK, D., FIGUEIREDO, D., PYLRO, V. S & DUARTE, G. F. Characterization of bacterial strains capable of desulphurisation in soil and sediment samples from Antarctica. **Extremophiles**, v. 14, p. 475-481, 2010.

BONITO, G., REYNOLDS, H., ROBESON, M. S., NELSON, J., HODKINSON, B. P., TUSKAN, G., SCHADT, C. W & VILGALYS, R. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3356-3370, 2014.

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

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 13, p. 79-148, 2000.

BULGARELLI, D., SCHLAEPPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de Bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CASTRO, R. A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., BATISTA, B. D., LUVIZOTTO, D. M., MARCON, J., FERREIRA, A., MELO, I. S & AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springer Plus**, v. 3, p. 1-10, 2014.
- CHEN, Y & POLAND, T. M. Interactive influence of leaf age, light intensity, and girdling on green ash foliar chemistry and emerald ash borer development. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 806-815, 2009.
- CHEN, C & ZHU, H. Are common symbiosis genes required for endophytic rice-rhizobial interactions? **Plant Signaling & Behavior**, v 8, p. 1-4, 2013.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-Fixing Bacteria in *Eucalyptus globulus* Plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- DSOUZA, M., TAYLOR, M. W., TURNER, S. J & AISLABIE, J. Genome-Based Comparative Analyses of Antarctic and Temperate Species of *Paenibacillus*. **PloS One**, v. 9, p. e108009, 2014.
- EL-DEEB, B., FAYEZ, K & GHERBAWY, Y. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 1, p. 56-64, 2013.
- FERREIRA, A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., ODA, S., AZEVEDO, J. L & ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, p. 8-14, 2008.
- FIGUEROA, C. M., DIEZ, M. D. A., KUHN, M. L., MCEWEN, S., SALERNO, G. L., IGLESIAS, A. A & BALLICORA, M. A. The unique nucleotide specificity of the sucrose synthase from *Thermosynechococcus elongatus*. **FEBS Letters**, v. 587, p. 165-169, 2013.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. D. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting

- switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, p.19-27, 2011.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.
- HAN, J., XIA, D., LI, L., SUN, L., YANG, K & ZHANG, L. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Microbial Ecology**, v. 58, p. 363-373, 2009.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16, p. 463-471, 2008.
- HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K & WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.
- JACKSON, C. R., RANDOLPH, K. C., OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- KÄMPFER, P., SESSITSCH, A., SCHLOTTER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J & SCHOLZ, H. C. *Ochrobactrum rhizosphaerae* sp. nov. and *Ochrobactrum thiophenivorans* sp. nov., isolated from the environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1426-1431, 2008.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMBEL, S. W., O'CONNOR, T. K., ARNOLD, H. K., HUBBELL, S. P., WRIGHT, S. J & GREEN, J. L. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 13715-13720, 2014.
- KERFELD, C. A & SCOTT, K. M. Using BLAST to Teach “e-value-evolutionary” Concepts. **PLoS Biology**, v. 9, p. 1-4, 2011.
- KÖBERL, M., SCHMIDT, R., RAMADAN, E. M., BAUER, R & BERG, G. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-9, 2013.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p.
- KUKLA, M., PŁOCINICZAK, T & PIOTROWSKA-SEGET, Z. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. **Chemosphere**, v. 117, p. 40-46, 2014.

- LEFF, J. W., DEL TREDICI, P., FRIEDMAN, W. E & FIERER, N. Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees. **Environmental Microbiology**, p. 1-10, 2014.
- LI, X.; RUI, J., XIONG, J., LI, J., HE, Z., ZHOU, J., YANNARELL, A. C., RODERICK, I. & MACKIE, R. I. Functional Potential of Soil Microbial Communities in the Maize Rhizosphere. **PloS One**, v. 9, p. 1-9, 2014.
- LIBA, C. M., FERRARA, F. I. S., MANFIO, G. P., FANTINATTI-GARBOGGINI, F.,

ALBUQUERQUE, R. C., PAVAN, C., RAMOS, P. L., MOREIRA-FILHO, C. A

& BARBOSA, H. R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated

from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate

and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1076-1086, 2006.
- MALIK, K. A & CLAUS, D. Xanthobacter flavus, a new species of nitrogen-fixing hydrogen bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 29, p. 283-287, 1979.
- MANKESSI, F., SAYA, A. R., BOUDON, F., GUÉDON, Y., MONTES, F., LARTAUD, M., VERDEIL, J. L & MONTEUUIS, O. Phase change-related variations of dome shape in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems. **Trees**, v. 24, p. 743-752, 2010.
- MAPELLI, F., MARASCO, R., ROLLI, E., BARBATO, M., CHERIF, H., GUESMI, A., OUZARI, I., DAFFONCHIO, D & BORIN, S. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- MOHAMMAD, I & ALRAWASHDEH, I. Genetic Diversity Determination for Peganum Harmala Species using Shannon's, Simposn, Eveness, Density and Richness Parameters In Jordan. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 5, n. 2, p. 1-5, 2015.

- NAHER, U. A., RADZIAH, O., HALIMI, M. S., SHAMSUDDIN, Z. H & RAZI, I. M. Specific growth rate and carbon sugar consumption of diazotrophs isolated from rice rhizosphere. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 1008 – 1014, 2008.
- NIHARIKA, N., MOSKALIKOVA, H., KAUR, J., SEDLACKOVA, M., HAMPL, A., DAMBORSKY, J., PROKOP, Z & LAL, R. *Novosphingobium barchaimii* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 667–672, 2013.
- OFEK, M., HADAR, Y & MINZ, D. Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). **PloS One**, v. 7, p. e40117, 2012.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- PETERSEN, D. G & DAHLLÖF, I. Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 339-348, 2005.
- POLY, F., RANJARD, L., NAZARET, S., GOURBIÈRE, F & MONROZIER, L. J. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2255-2262, 2001.
- PORTAIS, J. C & DELORT, A. M. Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can ¹³C-NMR tell us? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 375-402, 2002.
- PRIEST, F. G (2009) Genus I. *Paenibacillus*. In: DE VOS. P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W *et al.*, editors. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Firmicutes**. 2nd ed. New York, USA: Springer. pp. 1422.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- RAMOS, P. L., VAN TRAPPEN, S., THOMPSON, F. L., ROCHA, R. C., BARBOSA, H. R., DE VOS, P & MOREIRA-FILHO, C. A. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 926-931, 2014.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 14, P. 435-443, 2011.

- RODIONOV, D. A., YANG, C., LI, X., RODIONOVA, I. A., WANG, Y., OBRAZTSOVA, A. Y., ZAGNITKO, O. P., OVERBEEK, R., ROMINE, M. F., REED, S., FREDRICKSON, J. K., NEALSON, K. H & OSTERMAN, A. L. Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. **BMC Genomics**, v. 11, p. 494, 2010.
- ROMERO, F. M., MARINA, M & PIECKENSTAIN, F. L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, p. 187-194, 2014.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, v. 33, p. 152-155, 2006.
- STEINBAUER, J. Shoot feeding as a nutrient acquisition strategy in free-living psyllids. **PloS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.

- VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M., CRUZ-VÁZQUEZ, F., TREJO-CONTRERAS, M. J., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., BRAVO-PATÍÑO, A., CAJERO-JUÁREZ, M., CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P. & VALDEZ-ALARCÓN, J. J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 137-149, 2011.
- VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J & LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209-216, 2010.
- YI, H., SRINIVASAN, S & KIM, M. K. *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **The Journal of Microbiology**, v. 48, p. 30-35, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou-se eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de bactérias, fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade. Os fungos e leveduras dos filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica e de leveduras endofíticas.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilêmáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

A excisão, a eluição e o sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostraram ser boas técnicas para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto. Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto.

Em eucalipto, a relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a de levedura, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto.

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio.

A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto variou em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL

DIVERSIDADE E MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M635d Miguel, Paulo Sérgio Balbino, 1981-
2015 Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto /
Paulo Sérgio Balbino Miguel. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 125f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

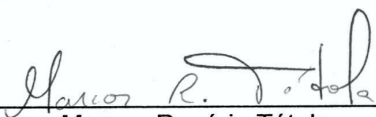
1. Eucalipto - Microbiologia. 2. Fungos.
3. Bactérias endofíticas. 4. Leveduras. 5. Filogenia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

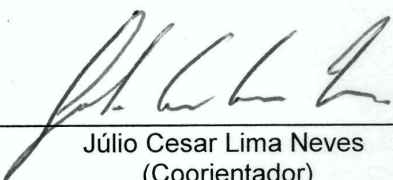
CDD 22 ed. 634.973766

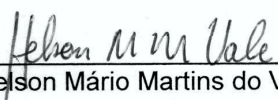
DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO

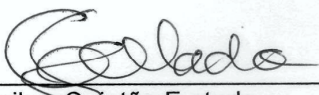
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de maio de 2015.


Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)


Júlio Cesar Lima Neves
(Coorientador)


Helson Mário Martins do Vale


Gleiber Quintão Furtado


Maurício Dutra Costa
(Orientador)

A Deus.

*À minha esposa,
à minha mãe e ao meu irmão.*

Dedico.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; mas os insensatos
desprezam a sabedoria e a instrução”. (Prov.1:7)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor e consumidor da minha fé.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pela orientação e pela confiança.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pela orientação no início deste trabalho.

Aos professores Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves, pela coorientação.

À minha amada esposa Mara, que me incentivou todos os dias com seu amor, dedicação, paciência, confiança e compreensão.

À minha mãe, D. Aparecida, que sempre lutou e me sustentou em oração.

Ao meu irmão Fábio, um grande amigo e incentivador.

Aos amigos Julio Delvaux, Marcelo Nagem e Bruno Coutinho Moreira, pelo apoio, pela amizade e pelo auxílio neste trabalho.

Aos irmãos da Igreja Metodista Wesleyana de Viçosa, pelas orações feitas pela minha vida.

A todos que de alguma forma me ajudaram na condução deste trabalho.

BIOGRAFIA

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL, filho de Francisco de Oliveira Miguel e de Aparecida de Fátima Balbino Miguel, nasceu em Astolfo Dutra – MG, no dia 19 de junho de 1981.

Em dezembro de 2008 graduou-se em Ciências Biológicas pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. Em fevereiro de 2011, obteve o título de *Magister Science* em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, e, em março do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da mesma instituição, submetendo-se à defesa da tese de doutorado em maio de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
CAPÍTULO 1.....	04
INTRODUÇÃO.....	05
REVISÃO DE LITERATURA	06
Endofíticos	06
Colonização da planta.	08
Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos	11
Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos.....	13
Eucalipto	16
Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto	18
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2.....	29
RESUMO	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
Área de estudo.....	32
Amostragem	33
Descontaminação superficial das folhas de eucalipto	34
Extração de DNA metagenômico em folhas e exsudatos xilemáticos.....	34
Análises da diversidade de fungos endofíticos	35
Análise filogenética	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 3.....	57
RESUMO	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS	60
Áreas de estudo	60

Amostragem	61
Descontaminação superficial de folhas.....	61
Extração de DNA metagenômico em folhas.....	62
Extração de açúcares	62
Análise da diversidade de fungos e leveduras	63
Análise filogenética	65
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
CAPÍTULO 4	90
RESUMO	91
INTRODUÇÃO	92
MATERIAL E MÉTODOS	93
Área de estudo	93
Amostragem	94
Descontaminação superficial de folhas	94
Extração de DNA metagenômico	95
Análise da diversidade de bactérias endofíticas totais e diazotróficas.....	96
Isolamento de bactérias endofíticas.....	97
Extração de DNA de culturas puras	97
BOX-PCR.....	98
Amplificação e Sequenciamento do rRNA 16S	98
Análise filogenética	99
RESULTADOS	99
DISCUSSÃO	110
CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS.....	117
CONCLUSÕES GERAIS.....	124

RESUMO

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2015. **Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Marcos Rogério Tótola e Júlio César Lima Neves.

Árvores pertencentes ao gênero *Eucalyptus* estão entre as mais cultivadas em todo o mundo. O rápido crescimento do eucalipto e a sua adaptabilidade a vários ambientes podem ser compreendidos pelo estudo da comunidade microbiana presente nessa planta. Essa comunidade é composta por micro-organismos endofíticos e epifíticos. Endofíticos colonizam os tecidos internos de plantas saudáveis sem causar sintomas ou efeitos negativos à planta. Neste estudo, foram avaliadas a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de plantas de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco. Avaliou-se, também, a diversidade de bactérias, fungos e leveduras em plantas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo. A diversidade microbiana foi relacionada à concentração de açúcares. Após extração de DNA de folhas e exsudatos xilemáticos, os *amplicons* obtidos por amplificação das subunidades do rRNA 16S, 18S e 26S foram utilizados na DGGE e as bandas eluídas dos géis foram sequenciadas. A avaliação da composição da comunidade bacteriana em folhas do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo também foi comprovada pelo isolamento e sequenciamento do rRNA 16S das colônias. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela idade das plantas e pela sazonalidade. A análise filogenética mostrou a dominância de fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota. Neste estudo, foi apresentado o relato inédito de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos em plantas. No viveiro, a colonização endofítica da parte aérea de eucalipto foi dependente das fases de desenvolvimento da planta. Neste estudo, foi relatada pela primeira vez a presença das leveduras dos gêneros *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia* e das espécies *Rhodosporidium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* como endofíticas em eucalipto. Bactérias dos filos Firmicutes, Proteobacteria, classes Alfa, Beta e Gamma, e Actinobacteria foram identificadas

na comunidade investigada. Nessa comunidade, as espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* foram identificadas pela primeira vez como endofíticas. Proteobacteria foi o filo mais representativo em folhas de mudas nas fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento; e Firmicutes, em plantas a campo. Observaram-se correlações negativas entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de diversidade e riqueza microbianas. A distribuição das espécies de fungos, leveduras e bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento da planta. Algumas espécies bacterianas encontradas apresentam potencial para fixação de nitrogênio.

ABSTRACT

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, May, 2015. **Endophytic microbial diversity in Eucalypts**. Adviser: Maurício Dutra Costa. Co-advisers: Marcos Rogério Tótola and Júlio César Lima Neves.

Plants belonging to the *Eucalyptus* genus are among the most cultivated in the world. Eucalypts are fast-growing plants and their ability to adjust to a variety of environments can be understood by studying the associated microbiome. Eucalypt microbiome is composed by endophytic and epiphytic microorganisms. Endophytes colonize the internal tissues of healthy plants without causing symptoms or negative effects. In this study, the endophytic fungal diversity and distribution were evaluated in leaf and xylematic exudates from 18- and 72-month-old eucalypt plants in the beginning of the rainy season, in the rainy season and in the dry season. The bacterial, fungal, and yeast diversity in plants from different developmental stages was also evaluated: clonal garden, shading, post-shading, expedition and field. The microbial diversity was correlated with the sugar concentration in leaves. Following DNA extraction from leaf and xylematic exudates, amplicons generated by the amplification of 16S, 18S, and 26S rRNA subunits were submitted to DGGE, and the bands excised were sequenced. Bacterial community composition in leaves from the clonal garden, shading, post-shading, expedition, and field was also evaluated and confirmed by isolating bacteria and sequencing the 16S rRNA from bacterial colonies. Endophytic fungal community in leaves was affected by plant age and seasonality. Phylogenetic analyses revealed the dominance of Basidiomycota and Ascomycota phyla during the development stages studied. In this work, the first report of *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi*, and *Teratosphaeriaecea* sp. as inhabitants of the xylematic exudates in plants is provided. In the nursery, endophytic colonization of eucalypt shoots was dependent on the plant developmental stages. In this study, the yeasts *Pichia* sp., *Candida*, *Nilaparvata*, *Saturnispora* sp., *Malassezia*, *Bensingtonia*, *Rhodosporidium fluviale*, and *Aureobasidium pullulans* were described as endophytic for the first time. Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, and Gamma- classes) and Actinobacteria were identified in the endophytic community. *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, and *Terrabacter lappili* were identified as endophytic for the first time. Proteobacteria was the most represented phylum in

leaves from the shading and post-shading stages, while Firmicutes was the main phylum found in leaves of plants in the field. Negative correlations were observed between the glucose, fructose, and sucrose contents in leaves and the microbial diversity and richness indices measured. The distribution of endophytic fungal, yeast, and bacterial species in eucalypt revealed to be distinct and specific to the developmental stage of eucalypt plants. Some of the bacterial species found in eucalypt leaves show the potential for nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade de adaptação das plantas ao ambiente envolve interações com diferentes espécies de micro-organismos. Dentre essas, as interações endofíticas são amplamente conhecidas pelos benefícios proporcionados ao hospedeiro, os quais incluem o estímulo ao crescimento pela fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), a síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e a supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006). Os micro-organismos endofíticos encontram-se associados a plantas saudáveis, sem causar sintomas de doença ou danos. Podem melhorar o estado sanitário (CLARKE *et al.*, 2006) e o desenvolvimento da planta (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012), o que justifica o grande volume de pesquisas sobre esses micro-organismos (BRADER *et al.*, 2014).

O eucalipto está entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta e a sua elevada produção de biomassa demandam alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004). Muitos desses nutrientes podem ser absorvidos mais eficientemente quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Portanto, estudos envolvendo essas comunidades podem proporcionar melhor compreensão das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento das plantas (BRADER *et al.*, 2014). O entendimento da diversidade dos endofíticos em associação com as plantas pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

O acesso à diversidade microbiana pode ser obtido por abordagens moleculares por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos, proporcionando novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; DA SILVA *et al.*, 2014). Este estudo compreende quatro capítulos. O capítulo 1 teve como objetivo revisar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração e colonização e os métodos de identificação de micro-organismos na planta. No capítulo 2 foi estudada a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilêmáticos em plantas

de eucalipto com 18 e 72 meses de idade. No capítulo 3 foi avaliada a diversidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento e relacionada à concentração de açúcares. No capítulo 4 foi investigada a diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto em plantas provenientes do jardim clonal, do sombreamento, recém-saídas do sombreamento, da expedição e do campo e relacionadas à concentração de açúcares.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS:
COLONIZAÇÃO, BENEFÍCIOS, IDENTIFICAÇÃO E
DIVERSIDADE EM EUCALIPTO**

INTRODUÇÃO

As plantas sustentam diversidade variável de micro-organismos, que podem influenciar o seu desenvolvimento (SUMAN *et al.*, 2005). Parte dessa diversidade é composta por bactérias (MIGUEL *et al.*, 2013), fungos (DESHMUKH *et al.*, 2006), arqueas e leveduras (OLIVEIRA *et al.*, 2013) endofíticos, os quais interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença (BULGARELLI *et al.*, 2013). Esses micro-organismos têm alto potencial de adaptação e muitos deles persistem ao longo de vários estádios de desenvolvimento da planta (HARDOIM *et al.*, 2008). Quando em interação, eles são responsáveis por estimular o crescimento por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de hormônios de crescimento (WAQAS *et al.*, 2012) e pela supressão de doenças (CLARKE *et al.*, 2006).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, sendo de grande valor econômico e alternativa viável para a indústria madeireira (FAO, 2015). As espécies e híbridos de eucalipto estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, e a madeira é usada para a produção de celulose em função da rápida taxa de crescimento, da adaptação a várias condições ecológicas e pela qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). O rápido crescimento dessa planta demanda alta disponibilidade de nutrientes (SMETHURST *et al.*, 2004), os quais podem ser melhor acessados quando a planta está em interação com micro-organismos de vida livre, epifíticos e endofíticos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo das comunidades microbianas associadas ao eucalipto pode proporcionar melhor entendimento das interações planta-micro-organismo durante o desenvolvimento vegetal (BRADER *et al.*, 2014).

O acesso à diversidade microbiana pode ocorrer por métodos moleculares que dependem (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou não de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A diversidade microbiana em eucalipto é pouco documentada (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), malgrado a importância econômica da cultura para o país, que é o maior produtor mundial. O objetivo desta revisão foi levantar os principais aspectos da interação endofítica, enfatizando os processos de penetração, colonização e os métodos de identificação desses micro-organismos na planta, com base em dados atuais sobre o assunto.

REVISÃO DE LITERATURA

Endofíticos

Micro-organismos são essenciais para a manutenção da vida na Terra, mas pouco se sabe sobre a diversidade microbiana presente no solo, nos oceanos, na atmosfera, nos seres humanos e nas plantas (TURNER *et al.*, 2013). No interior das raízes, nas folhas e em outras partes da planta, comunidades microbianas distintas proporcionam melhor acesso da planta aos nutrientes e auxiliam na supressão de diversas doenças (SMITH, 2014). O termo endofíticos se refere a micro-organismos que, em alguma fase de seu ciclo de vida, vivem em associação com plantas saudáveis, sem causar sintoma de doença ou prejuízo ao hospedeiro. Esses micro-organismos adaptam-se ao habitat específico representado pelo corpo das plantas, apresentando potencial metabólico distinto da microbiota do solo (BRADER *et al.*, 2014).

No contexto da interação endofítica, as bactérias que se destacam são pertencentes aos filos Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma), Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (BACON & HINTON, 2007). Já os fungos endofíticos estão distribuídos, em sua maioria, nos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011). A detecção dos micro-organismos endofíticos é realizada por métodos culturais ou moleculares (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A densidade populacional de micro-organismos endofíticos é variável e depende das espécies endofíticas, do genótipo da planta, do estágio de desenvolvimento, das condições ambientais (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO 2006), da localização do cultivo (FISHER *et al.*, 1993) e da parte da planta em associação (MAGNANI *et al.*, 2010). As associações endofíticas podem, ainda, mostrarem-se dependentes de muitos fatores, incluindo o tipo de hospedeiro, a densidade de plantas no local, a disponibilidade de nutrientes no solo e as interações com outros micro-organismos (PORRAS-ALFARRO & BAYMAN, 2011).

O sucesso da colonização endofítica depende da expressão de genes cujos produtos serão importantes para a entrada e a sobrevivência do micro-organismo no interior do hospedeiro (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). A planta que abriga associações endofíticas compartilha recursos com os parceiros microbianos, codificando diversos transportadores no genoma que permitem a transferência de carbono de si para a microbiota associada (TAGHAVI *et al.*, 2010).

A interação endofítica pode impactar a nutrição, a adaptação e o desenvolvimento vegetal (SUMMAN *et al.*, 2005; WAQAS *et al.*, 2012) e, por meio

da competição, suprimir patógenos e melhorar a sanidade das plantas (CLARKE *et al.*, 2006; SATHISH *et al.*, 2012). Os micro-organismos endofíticos podem também beneficiar a planta pelo aumento da resistência a estresses abióticos (NAGABHYRU *et al.*, 2013).

A existência da interação planta-micro-organismo endofítico tem sido constatada em frutos (MIGUEL *et al.*, 2013), caules, folhas (PROCÓPIO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2008; TUPPAD & SHISHUPALA, 2014), raízes (TUPPAD & SHISHUPALA, 2014) e em outras partes da planta. Hipotetiza-se que a entrada de micro-organismos endofíticos seja controlada pela planta e pelas condições ambientais (HARDOIM *et al.*, 2008). Algumas evidências sugerem que a planta tem papel ativo na seleção de certos micro-organismos para a vida endofítica. No entanto, os mecanismos pelos quais isso é feito ainda não são conhecidos (HARDOIM *et al.*, 2008). Micro-organismos endofíticos que ocupam o mesmo nicho em diferentes plantas podem ser muito distintos taxonomicamente (TURNER *et al.*, 2013).

A capacidade de micro-organismos endofíticos de colonizarem os tecidos internos das plantas pode conferir vantagens ecológicas quando esses são comparados aos micro-organismos epifíticos. O habitat representado pelo ambiente interno do corpo das plantas é mais protegido de variações extremas de temperatura, do potencial osmótico, da radiação ultravioleta e da competição com outros micro-organismos (HALLMAN *et al.*, 1997).

Em relação ao ciclo de vida, os micro-organismos endofíticos podem ser obrigatórios ou facultativos. Micro-organismos endofíticos obrigatórios são estritamente dependentes da associação com a planta para o crescimento e a sobrevivência. Em contrapartida, os facultativos apresentam ciclo de vida bifásico, alternando entre a planta e o ambiente (HARDOIM *et al.*, 2008). O estilo de vida facultativo é o mais comum. Os micro-organismos endofíticos obrigatórios, em face da menor competição com outros micro-organismos no interior da planta, podem apresentar arsenal químico menos rico em relação àqueles da rizosfera e da filosfera. Entretanto, os micro-organismos endofíticos podem produzir metabólitos mais específicos que podem sustentar a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014). Os colonizadores facultativos, por sua vez, têm de ser capazes de sobreviver na rizosfera antes de adentrar a planta, podendo produzir metabólitos inibitórios a outros micro-organismos ou que facilitem a interação com o hospedeiro (BRADER *et al.*, 2014).

Colonização da planta

A rizosfera corresponde ao volume de solo influenciado pelas raízes da planta. A diversidade microbiana rizosférica é alta por ser esse ambiente rico em fontes de energia prontamente disponíveis (BRADER *et al.*, 2014), provenientes da rizodeposição de mucilagens e exsudatos (PHILIPPOT *et al.*, 2013). A relação entre micro-organismos endofíticos e rizosféricos é bastante próxima. Muitos deles penetram o hospedeiro pelas raízes (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009) e colonizam novos habitat, escapando da competição intensa vigente na rizosfera (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Entretanto, existem características distintas entre os micro-organismos rizosféricos e os endofíticos, uma vez que nem todas as populações microbianas da rizosfera podem adentrar a planta, modificar seu metabolismo e adaptar-se ao ambiente interno dos tecidos vegetais (TURNER *et al.*, 2013). Muitos micro-organismos competentes na rizosfera podem, coincidentemente, tornarem-se endofíticos após entrarem na planta via raiz, mas a falta de genes-chave para o sucesso ecológico daqueles em endofitismo não permite a persistência no hospedeiro. A competência endofítica é adquirida pela expressão de genes que devem contribuir para a persistência e para o sucesso da colonização dos espaços internos da planta (HARDOIM *et al.*, 2008).

A rizosfera é região de elevada competição entre as populações microbianas aí presentes. Proteobactérias de rápido crescimento, denominadas estrategistas-r, são capazes de se instalar no solo rizosférico e de utilizar ampla diversidade de compostos de carbono derivados das raízes. Não somente bactérias prosperam rapidamente na rizosfera rica em nutrientes, mas também fungos, oomicetos, vírus e arqueas (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Os pontos de emergência de raízes laterais e a zona de diferenciação e alongamento das raízes são locais proeminentes para ingresso ativo de micro-organismos. Nesses locais, os tecidos não completamente diferenciados podem facilitar a penetração microbiana (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Os espaços intercelulares da epiderme, das regiões corticais e das células vegetais lisadas são os principais locais de colonização, com densidades de até 10^{10} células/cm³ (CHI *et al.*, 2005). Os tecidos vasculares e as células do xilema também podem ser invadidos, embora, muitas vezes, em densidades mais baixas (COMPANT *et al.*, 2010). No caso específico de fungos, geralmente, a infecção endofítica nas folhas ocorre horizontalmente por meio de esporos trazidos pelo ar (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

A colonização endofítica bacteriana pode ocorrer em três etapas. Na primeira, ela move-se em direção às raízes da planta passivamente, através do fluxo de água do solo, ou ativamente, por meio da atividade flagelar induzida por compostos liberados pelo hospedeiro (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008), em mecanismo de quimiotaxia. Em *Azospirillum*, por exemplo, a quimiotaxia é induzida por açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outros compostos (COMPANT *et al.*, 2005). Para tal, genes envolvidos no reconhecimento dos compostos e quimiotaxia devem ser ativados. A expressão de genes envolvidos na quimiotaxia em *Pseudomonas aeruginosa*, a exemplo de *cheY*, *cheA* e *pctA*, que codificam, respectivamente, um regulador de resposta de dois componentes, um regulador de resposta de quimiotaxia e uma proteína quimiostática, é regulada negativamente pelos exsudados de uma cultivar de beterraba, mas não por exsudados de outra cultivar. Assim, a composição dos exsudados depende da cultivar, da exposição da planta ao estresse e do estágio de desenvolvimento, o que pode resultar em diferenças na comunidade bacteriana rizosférica e, consequentemente, da endofítica (COMPANT *et al.*, 2010).

Numa segunda etapa, a adsorção não específica da bactéria às raízes, seguida pelo ancoramento das mesmas, vai ocorrer (SPRENT & DEFARIA, 1988). Uma vez ligadas às raízes, as bactérias sofrem várias divisões celulares e se estabelecem em microcolônias (HARDOIM *et al.*, 2008). Por fim, as bactérias endofíticas podem alcançar o interior da planta por meio de tecidos danificados que surgem naturalmente como resultado do crescimento vegetal, pelos radiculares, por junções epidérmicas ou, ainda, via ferimentos (SPRENT & DEFARIA, 1988. HARDOIM *et al.*, 2008). Dentro da planta, a colonização pode ser sistêmica, pela migração através do sistema vascular e do apoplasto, ou local, como nos tecidos do córtex e do xilema (HALLMANN *et al.*, 1997).

Em bactérias gram-negativas, o antígeno-O da camada LPS pode contribuir para a colonização radicular, processo dependente da espécie bacteriana envolvida. Outra estrutura importante na colonização é o pílus do tipo IV, o qual é essencial para o estabelecimento de microcolônias de *Azoarcus* nas raízes de gramíneas (DÖRR *et al.*, 1998).

A colonização bem sucedida inclui genes envolvidos na quimiotaxia, formação de flagelos e pili, além de várias vias metabólicas e sistemas de transporte (COMPANT *et al.*, 2010). A análise do genoma de *Klebsiella pneumoniae* demonstrou que essa espécie apresenta características típicas de bactérias diazotróficas, anaeróbias facultativas e endofíticas, com a presença de genes

envolvidos na degradação de carboidratos, de compostos aromáticos e celulolíticos, na ciclagem de nutrientes e de carbono e na capacidade de formar associações endofíticas (FOUNTS *et al.*, 2008).

A penetração de fungos endofíticos dá-se por hifas de penetração ou apressórios pela parte basal dos pelos radiculares. A ramificação das hifas formam muitos clamidóporos preenchendo todo o pelo radicular (ERNST *et al.*, 2003; DESHMUKH *et al.*, 2006). Essa penetração pode dar-se de maneira semelhante em outras partes da planta, como folhas e caules, e, também, por ferimentos, incluindo os causados por herbivoria e outros mecanismos. Fungos endofíticos não penetram as células das plantas e, geralmente, se abrigam nos espaços intercelulares, enquanto utilizam baixos níveis de nutrientes nos fluidos intercelulares, não proporcionando danos ao hospedeiro (GAO *et al.*, 2005). As sementes podem funcionar como veículo de transporte de propágulos fúngicos para a próxima geração de hospedeiros (ERNST *et al.*, 2003).

A colonização endofítica é possível pela grande diversidade de enzimas produzidas pelo micro-organismo, tais como celulasas, pectinases e xilanasas (SEO *et al.*, 2010; KANNAN *et al.*, 2015). A degradação enzimática da parede celular tem sido observada no momento da colonização da epiderme radicular, mas não nos espaços intercelulares do córtex; porém, muito pouco é conhecido sobre a regulação desses processos. Entretanto, sabe-se que a liberação constitutiva de hidrolases não é desejada, uma vez que poderia resultar em patogenicidade (HALLMAN *et al.*, 1997). Os níveis de enzimas degradadoras da parede celular produzidas por bactérias diferenciam as endofíticas, com baixos níveis, das patogênicas, com níveis altos e danosos (HARDOIM *et al.*, 2008).

A colonização das folhas é afetada por estruturas, como vasos condutores, pelos e estômatos. A comunidade residente no interior da planta, quando comparada ao exterior, está em habitat sujeito a maiores flutuações de temperatura, umidade e radiação (TURNER *et al.*, 2013). Esses fatores alteram a fisiologia da planta e, aliados a outros, como estágio de crescimento, tipo de solo, regime hídrico, manejo e densidade de bactérias, podem promover a mudança na estrutura da comunidade endofítica (HARDOIM *et al.*, 2012). Outro fator que diferencia as comunidades endofíticas é a idade das plantas, com as mais jovens apresentando maior densidade que as mais maduras (TURNER *et al.*, 2013).

A complexidade da interação endofítica e a sua contribuição para as plantas justificam novos estudos. O rápido avanço nas tecnologias de sequenciamento de nova geração e no processamento e interpretação dos dados gerados possibilita o

conhecimento da amplitude da diversidade microbiana nesse ambiente (KEMLER *et al.*, 2013). A abordagem metabolômica possibilita o acesso a informações mais amplas sobre a composição dos metabólitos produzidos pelas plantas (JORGE *et al.*, 2014). A interação de plantas com bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio necessita ser mais bem compreendida e caracterizada (CARVALHO *et al.*, 2014b). O acesso à diversidade desses micro-organismos é a etapa inicial e relevante para esse entendimento (TAGHAVI *et al.*, 2010), e estudos da expressão de genes podem possibilitar a identificação das diversas vias metabólicas envolvidas nessas associações (CARVALHO *et al.*, 2014b).

Benefícios da presença de micro-organismos endofíticos

A interação entre micro-organismos endofíticos e plantas contribui para a adaptação a diversos nichos e para a produção de vários metabólitos que podem ser importantes na aquisição de nutrientes pela planta (BRADER *et al.*, 2014).

A disponibilidade de nitrogênio é um dos fatores que mais limitam o crescimento vegetal, requerendo a adição do elemento ao solo em altos níveis para a manutenção da produtividade agrícola (OLDROYD & DIXON, 2014). A fixação biológica é importante fonte de nitrogênio na agricultura e representa alternativa promissora à fertilização química. Bactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (SUMMAN *et al.*, 2005; OLDROYD & DIXON, 2014), e os endofíticos podem contribuir significativamente para o sucesso de abordagens biotecnológicas visando o suprimento de nitrogênio às culturas.

A capacidade de fixar nitrogênio é encontrada nos principais grupos filogenéticos bacterianos (OLDROYD & DIXON, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas são geneticamente diversas, sendo identificadas principalmente entre as Proteobacterias (Alfa-, Beta- e Gamma), a exemplo dos gêneros *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Esses micro-organismos possuem o complexo enzimático da nitrogenase (ARAÚJO *et al.*, 2014), sendo a maquinaria de fixação e de regulação do processo muito similar à de *Rhizobium* (CARVALHO *et al.*, 2014a). Interações planta-bactérias diazotróficas ocorrem em diferentes níveis, podendo apresentar especificidade em relação ao hospedeiro (ARAÚJO *et al.*, 2014). Bactérias endofíticas diazotróficas podem expressar os genes *nifH*, além de outros, importantes ao processo de fixação biológica, podendo contribuir com quantidades significativas de N para a planta (TURNER *et al.*, 2013).

Bactérias, leveduras e fungos endofíticos podem produzir fitormônios, principalmente ácido indol acético (AIA) (WAQAS *et al.*, 2012; HOFFMAN *et al.*, 2013; NUTARATAT *et al.*, 2014). Além do AIA, as giberelinas, as citocininas e o ácido abscísico podem também ser sintetizados por esses micro-organismos e disponibilizados para as plantas (KHAN *et al.*, 2012; GAIERO *et al.*, 2013). As auxinas e as citocininas estão envolvidas nos processos regulatórios que determinam a arquitetura da raiz. Já as giberelinas são importantes nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, promovendo o aumento do crescimento caulinar e radicular e da densidade dos pelos radiculares (CARVALHO *et al.*, 2014a). Os fitormônios são os principais agentes que regulam a resposta da planta frente às mudanças ambientais (MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2009). Além disso, podem atuar como antimicrobianos, a exemplo do ácido fenil-acético, produzido por *Azospirillum brasiliense*, com atividade antagonica a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011).

A microbiota endofítica pode melhorar a sanidade vegetal por meio da produção de moléculas antagonistas a patógenos (FRIESEN *et al.*, 2011). A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, pode ser controlada pela secreção de substâncias antimicrobianas que impedem a germinação dos uredósporos (SHIOMI *et al.*, 2006). Os melhores resultados com esse tipo de controle são obtidos com o uso de *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Klebsiella pneumoniae* (SHIOMI *et al.*, 2006).

A proteção da planta por bactérias endofíticas pode ocorrer pela perturbação do *quorum-sensing*, mecanismo necessário para a virulência em alguns patógenos. Esse mecanismo geralmente é mediado pelas *N*-acil homoserina lactonas (AHLs). A produção de lactonases degradadoras de AHLs por bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Klebsiella* pode interferir na comunicação patógeno-patógeno e impedir a expressão de genes de virulência (FRIESEN *et al.*, 2011).

A produção de alcalóides por fungos endofíticos pode reduzir a herbivoria, resultando na diminuição do consumo de folhas e sementes por animais (FRIESEN *et al.*, 2011). Da mesma forma, o uso de endofíticos pode ser estratégia interessante no controle biológico (TURNER *et al.*, 2013). Leveduras endofíticas produzem enzimas hidrolíticas, a exemplo das celulases, quitinases, glucanases e proteases, que degradam quitina, β -1,3-glucana, manoproteínas e celulose, componentes da parede celular de vários fungos fitopatogênicos (NATURAT *et al.*, 2014).

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* são reconhecidamente produtoras de antibióticos, compostos voláteis, substâncias antifúngicas, antivirais e inseticidas (TURNER *et al.*, 2013). Já alguns fungos, principalmente os representantes do filo Ascomycota, são eficientes produtores de compostos antibacterianos (DESHMUKH *et al.*, 2014) e de compostos oxidantes durante a colonização vegetal. A produção de antioxidantes está ligada ao aumento da tolerância ao estresse em plantas hospedeiras (WHITE-JÚNIOR & TORRES, 2010).

Os micro-organismos endofíticos são, portanto, fontes de novos produtos naturais, com potencial biotecnológico. Dada a capacidade dos mesmos de degradar compostos orgânicos, são importantes na biorremediação e na fitorremediação (RYAN *et al.*, 2008). Com a utilização de técnicas de engenharia genética, podem ainda ser melhorados no que concerne ao potencial de degradação de compostos xenobióticos (BARAC *et al.*, 2004).

Métodos para a identificação de micro-organismos endofíticos

O critério para distinguir micro-organismos endofíticos requer a desinfestação da superfície da planta pela utilização de álcool 70%, hipoclorito de sódio 3% e água esterilizada, em tempos variáveis a depender do tecido vegetal utilizado. Essa etapa visa à eliminação de epifíticos presentes na filosfera (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Após a desinfestação das partes vegetais desejadas, a diversidade microbiana endofítica pode ser acessada pela utilização de análises moleculares das comunidades por métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) ou independentes de cultivo (WEST *et al.*, 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A comprovação da natureza endofítica dos micro-organismos extraídos das plantas pode ser obtida pelo plaqueamento da última água de lavagem do procedimento de desinfestação da planta, ou pela incubação de partes do material vegetal submetido à desinfestação superficial (SAKIYAMA *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). O tempo de incubação e o meio de cultura utilizado são dependentes do micro-organismo que se deseja estudar.

A análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) é um dos métodos dependentes de cultivo utilizados como discriminadores taxonômicos para a identificação de espécies em comunidades microbianas (HILL *et al.*, 2000). Esse método consiste na esterificação dos lipídeos extraídos da amostra, seguida da

separação e identificação por cromatografia gasosa desses compostos. A identificação é baseada nos tempos de retenção da amostra na coluna cromatográfica, comparados aos tempos de retenção de padrões submetidos ao mesmo processo (KIRK *et al.*, 2004). Esse método é utilizado para se estudar a composição das comunidades microbianas, bem como as mudanças nas populações em razão da presença de contaminantes químicos no ambiente (SICILIANO & GERMIDA, 1998) ou, ainda, para a identificação de isolados de bactérias endofíticas de plantas (VEGA *et al.*, 2008; MIGUEL *et al.*, 2013).

A identificação de isolados bacterianos desconhecidos de uma amostra também pode ser realizada pelo sequenciamento do gene rDNA 16S e subsequente comparação da sequência obtida com as depositadas nos bancos de dados, como o *Genbank* (National Center for Biotechnology Information) (TEMMERMAN *et al.*, 2004). O gene rRNA 16S é alvo de estudos de diversidade porque está presente em todos os organismos procariotos, sendo pouco sujeito à transferência horizontal (KIRK *et al.*, 2004). A sequência do gene rRNA 16S contém regiões variáveis espécie-específica, o que permite a identificação dos isolados bacterianos em nível de espécie (CAI *et al.*, 2003). Esse gene é, portanto, o de escolha para a construção de *primers*, reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e alinhamento de sequências (HARDOIM *et al.*, 2012; MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Com esse tipo de análise, é possível conhecer os gêneros bacterianos em mais de 90% dos casos e as espécies entre 65 a 83% (JANDA & ABBOTT, 2007). Quando o poder discriminatório não é suficiente, a análise filogenética exclui outros gêneros e espécies. Assim, os dados de sequenciamento são mais apurados em razão das relações filogenéticas disponíveis (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). Uma limitação considerável da técnica ocorre quando duas espécies bacterianas distintas compartilham sequência rRNA 16S muito similares (WOO *et al.*, 2008).

O sequenciamento do gene rRNA 16S origina dados não ambíguos e reprodutíveis, mesmo para isolados raros (DRANCOURT *et al.*, 2000), tendo se tornado método de referência para a taxonomia e a identificação bacterianas (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). O uso de sequências do rRNA 16S tem levado à reclassificação e à renomeação de gêneros e espécies bacterianas, além de permitir a classificação de micro-organismos não-cultivados e facilitar a descoberta e a classificação de novas espécies (WOO *et al.*, 2008).

A identificação de espécies fúngicas e de leveduras é obtida pela sequência de DNA do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA 18S ou pelo fragmento rRNA

18S (NILSSON *et al.*, 2008). ITS é uma região multicópia que nos eucariotos é compreendida por uma região não codificante, uma codificadora e outra não codificante. A variabilidade dessa região proporciona resolução suficiente para identificação de fungos e leveduras (ARNOLD, 2007). Já a região D1/D2 do gene rRNA 26S e o sequenciamento desse domínio têm proporcionado a identificação de espécies de leveduras de forma rápida e precisa (HESHAM *et al.*, 2014).

A análise do perfil fisiológico das comunidades é outro método dependente de cultivo para análise da diversidade microbiana. Através dele é possível determinar a capacidade do micro-organismo em utilizar diferentes fontes de carbono *in vitro*. Essa metodologia é baseada no uso de microplacas contendo 190 fontes alternativas de carbono. A técnica é importante quando se avalia a diversidade metabólica potencial de comunidades microbianas em diferentes ambientes (KIRK *et al.*, 2004; BOCHNER, 2009). A abordagem polifásica é baseada na combinação entre características morfológicas e bioquímicas das espécies de micro-organismos com informações de sequências e reconstrução filogenética, sendo a escolha para estudos de caracterização da comunidade microbiana (VANDAMME *et al.*, 1996), por tornar as análises mais robustas (STACKEBRANDT & EBERS, 2006).

Diferentemente das endossimbioses ou dos sistemas patogênicos bem estudados, as bases moleculares das interações endofíticas ainda não são bem compreendidas (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Análises genômicas comparativas poderão fornecer melhor compreensão da dinâmica da comunidade, sinalização e funções nas associações endófito-planta (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011).

Estudos dependentes de cultivo são importantes; entretanto, não permitem o acesso à totalidade da diversidade microbiana. A utilização de tecnologias de sequenciamento *high-throughput* nos últimos anos tem permitido a identificação de milhares a milhões de sequências nas amostras, revelando, inclusive, espécies raras. A abordagem metagenômica revela a diversidade da comunidade microbiana em interação com a planta (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação do metagenoma pode ser realizada por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), o qual é satisfatório para avaliação da diversidade, mas limitado para detecção de espécies (DAVID *et al.*, 2014). Os fragmentos de DNA de mesmo tamanho, amplificados por PCR, são submetidos à eletroforese em gel com gradiente desnaturante, geralmente de formamida e ureia, e utilizados para análise da estrutura da comunidade microbiana (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013). Essa técnica

permite a identificação de populações de menor e maior abundância em comunidades rizosféricas e endofíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014) e contribui para elucidar mudanças na estrutura da comunidade microbiana em resposta a determinados fatores ao longo do tempo (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

A tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilita o sequenciamento do DNA de amostras ambientais em plataformas que geram informação em milhões de pares de bases em corrida única. Nessa abordagem é possível a identificação de táxons microbianos com alta resolução (PHILIPPOT *et al.*, 2013). O princípio da NGS é a geração de sequências curtas abundantes que podem ser montadas em elementos contíguos maiores para sequenciar todo o genoma. A técnica requer material genético de alta qualidade, limpo e concentrado (YOCKTENG *et al.* 2013). Essa metodologia é utilizada para se estimar a diversidade em comunidades complexas, permitindo análise mais robusta dos ambientes estudados. Entretanto, a grande quantidade de dados gerados proporciona grandes desafios, especialmente no que diz respeito à bioinformática (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013).

Eucalipto

Florestas são o ecossistema terrestre dominante na Terra, cobrindo cerca de 4,03 bilhões de hectares, o que significa aproximadamente 30% da área terrestre total do planeta (PAN *et al.*, 2013). Elas contribuem para a biodiversidade e fornecem inumeráveis bens e serviços ambientais, sendo responsáveis pela sustentação de imensa variedade de indústrias, empregos e renda em todo o mundo (FAO, 2015).

As espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos estão entre as principais fontes mundiais de biomassa lenhosa, sendo a madeira do tronco utilizada como matéria-prima para a produção de celulose e madeira, devido à sua rápida taxa de crescimento, à adaptação a várias condições ecológicas e pela boa qualidade da fibra produzida (PAIVA *et al.*, 2011). Nativa da Austrália, a planta está distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais, contando até o momento com cerca de 700 espécies descritas (HUDSON *et al.*, 2015). Em muitos países, é a escolha para geração de bioenergia (BAUHUS *et al.*, 2010).

As espécies de *Eucalyptus* mostram alta diversidade de genes para metabólitos especializados, como terpenos, que atuam como defensivos químicos (MYBURG *et al.*, 2014). Espécies desse gênero apresentam ainda grande

diversidade e altas concentrações de óleos de importância ecológica e médica (CHEEWANGKON *et al.*, 2009), e, em razão da grande relevância dessa planta, o genoma de *Eucalyptus grandis* foi recentemente sequenciado (MYBURG *et al.*, 2014). Pela importância econômica que apresentam, as espécies de eucalipto são muito utilizadas em estudos de melhoramento genético (HUDSON *et al.*, 2015).

No Brasil, 72% dos 7,6 milhões de hectares de florestas plantadas são eucalipto e pinus. A maioria dessa área (54,2%) está concentrada na região sudeste, sendo Minas Gerais o estado que mais contribui para essa atividade. A maior concentração dos plantios nas regiões Sul e Sudeste do país é justificada pela localização das principais indústrias de papel e celulose, de painéis de madeira, siderurgia a carvão vegetal e madeira processada mecanicamente (IBA, 2014).

O significado social e econômico do setor florestal em 2013 pode ser avaliado pelo número de empregos gerados, mais de 4,4 milhões, pelos 6,4 bilhões de reais obtidos com os produtos exportados e pela contribuição para o Produto Interno Bruto de cerca de 56 bilhões de reais, além de 8,8 bilhões de dólares em impostos arrecadados (IBA, 2014).

A produtividade das áreas plantadas é garantida com a utilização de fertilizantes, os quais mantêm ou restauram a fertilidade dos solos, aumentando o rendimento e a qualidade das plantas cultivadas. O manejo tem sido progressivamente melhorado para reduzir custos e impactos negativos ao ambiente. O plantio de eucalipto é realizado em áreas onde os solos são ácidos, havendo necessidade de adição de quantidades significativas de nutrientes. Entretanto, essa planta apresenta baixa resposta à adubação nitrogenada (GAMA-RODRIGUES *et al.*, 2005).

A propagação clonal de eucalipto por miniestaquia alia a qualidade da muda à redução dos custos da produção. Com essa metodologia obtém-se melhor desempenho de enraizamento, sistema radicular com maior qualidade, maior velocidade de emissão das raízes e redução das atividades operacionais (HOPPE *et al.*, 2004). Após o enraizamento em casa de vegetação, por cerca de 30 dias, as mudas são transferidas para aclimação em casa de sombra, com 50% de incidência de luz, por um período de aproximadamente 10 dias. Nessa etapa, geralmente as plantas recebem uma dose de fertilizante NPK 5-17-3 de 0,25 g/muda. Após esse período, as plantas sem brotos são colocadas a pleno sol para rustificação, sem a utilização de qualquer defensivo agrícola, a menos que haja incidência de doenças, fato que raramente ocorre. Nessa fase, a umidade deve ser

controlada de acordo com o teor de água do substrato. Posteriormente, as mudas são classificadas de acordo com porte apresentado (pequeno, médio e grande) e preparadas para envio ao plantio, sempre considerando o tamanho médio do lote de mudas (HOPPE *et al.*, 2004).

Comunidades microbianas distintas vivem no interior de raízes, folhas e outras partes da planta. Essas interações proporcionam às plantas acesso a nutrientes e auxílio na supressão de doenças, sendo importantes na agricultura (SMITH, 2014). O estudo das comunidades microbianas pode, portanto, contribuir para compreender sua relação com a adaptabilidade do eucalipto a vários ambientes, com sua sanidade e o desenvolvimento dessa planta.

Diversidade de micro-organismos endofíticos em eucalipto

Endofíticos estão em interação com várias espécies de plantas e compõem a comunidade microbiana de várias espécies de eucalipto (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Esses micro-organismos têm potencial para reduzir a incidência de doenças (CLARKE *et al.*, 2006) e aumentar a produtividade (PAZ *et al.*, 2012), o que pode resultar em práticas de manejo mais sustentáveis e economicamente mais viáveis.

A comunidade e a densidade bacteriana endofítica em eucalipto variam de acordo com o órgão e a localização na planta, a área geográfica do cultivo, as condições ambientais, a espécie e o genótipo da planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). As comunidades endofíticas bacterianas em eucalipto reportadas até o momento são compostas por *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia* e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* em raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010). Essa comunidade distinta pode ser transferida das sementes para as mudas e, quando inoculados em sementes ou em mudas, as características benéficas dos micro-organismos podem ser expressas no hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2008).

Árvores tropicais sustentam grande abundância de fungos endofíticos em suas folhas. Essa comunidade fúngica presente (ARNOLD, 2005) afeta a estrutura e a diversidade dos organismos associados às plantas, além da sua adaptabilidade

e evolução (OMACINI *et al.*, 2001). À semelhança do que ocorre em outras plantas, fungos endofíticos também se associam ao eucalipto, e a diversidade deles nessa planta mostra dominância de Ascomycota (KEMLER *et al.*, 2013). Essa interação parece ser dependente da espécie de planta (LUPO *et al.*, 2001; KHARWAR *et al.*, 2010) e do local do cultivo (FISHER *et al.*, 1993). Muitos deles são antagonistas a diversos patógenos (KHARWAR *et al.*, 2010), pela produção de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (SATHISH *et al.*, 2012). A produção desses compostos por esses micro-organismos pode proporcionar maior capacidade competitiva no interior da planta.

A colonização de fungos endofíticos ocorre mais frequentemente pela penetração das hifas de fungos epifíticos na superfície da planta, seguida pela adaptação ao novo habitat (KHARWAR *et al.*, 2010). Entretanto, nem todos epifíticos podem adentrar a planta, modificar o metabolismo e adaptar-se a esse habitat (TURNER *et al.*, 2013). A avaliação da comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é geralmente baseada em metodologias dependentes de cultivo (FISHER *et al.*, 1993; LUPO *et al.*, 2001), que subestimam a diversidade desses micro-organismos. Abordagens metagenômicas se fazem necessárias a fim de se elucidar a presença de representantes mais raros presentes nessa comunidade.

Para se compreender como a comunidade microbiana endofítica do eucalipto pode afetar a adaptabilidade a vários ambientes, a sanidade e o desenvolvimento, a avaliação da diversidade de endofíticos é etapa importante. Entretanto, pouco é conhecido sobre esse aspecto em eucalipto, sendo que a maioria dos relatos enfatiza o isolamento desses micro-organismos. Portanto, torna-se necessária a investigação desses micro-organismos em outras partes da planta, bem como em outras áreas de cultivo, e a utilização de metodologia independente de cultivo para melhor elucidar a dinâmica dessa interação.

O sequenciamento de nova geração através das diversas plataformas disponíveis permite a maior cobertura de uma amostra individual. Essa maior cobertura aumenta a possibilidade de detecção de maior número de representantes de filos microbianos, o que é de extrema importância em estudos ecológicos (SIQUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2012). Os avanços das técnicas moleculares como RT-PCR e RNA-Seq (VARGAS *et al.*, 2014) permitem o estudo da expressão de genes envolvidos na fixação de nitrogênio e síntese de hormônios de crescimento vegetal (BRUTO *et al.*, 2014; VARGAS *et al.*, 2014). Com essas técnicas é possível a investigação simultânea do perfil de transcrição de vários genes da planta e do

hospedeiro (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2013). Assim, é possível realizar uma análise detalhada do perfil de genes dos micro-organismos e das modificações que ocorrem na planta em resposta a mudanças ambientais ou a condições impostas (BERTHRONG *et al.*, 2009). Esses avanços, aliados ao estudo da diversidade dos micro-organismos por sequenciamento de genes extraídos de diferentes partes do sistema solo-planta, suportam a ideia de que micro-organismos endofíticos podem ser alternativa para se melhorar a aquisição de nutrientes em plantas importantes, como eucalipto, aumentando a produtividade da planta e sustentabilidade do processo de produção.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. O., VITORINO, A. C. T., MERCANTE, F. M & OLIVARES, F. L. Biological nitrogen fixation by diazotrophic bacteria in association with grasses of economic importance. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 2898-2903, 2014.
- ARNOLD, A. E. 2005. **Diversity and Ecology of fungal endophytes in tropical forests**. Current Trends in Mycological Research (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.
- BACON, C. W & HINTON, D. M. **Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility**. In: GNANAMANICKAM, S. S. 1 ed. Plant-Associated Bacteria. Netherlands: Springer. 2007, p. 155-195.
- BARAC, T., TAGHAVI, S., BORREMANS, B., PROVOOST, A., OEYEN, L., COLPAERT, J. V., VANGRONVELD, J & VAN DER LELIEL, D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water- soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**. v. 22, p. 583–588, 2004.
- BAUHUS, J., VAN DER MEER, P., KANNINEN, M (Ed.). **Ecosystem goods and services from plantation forests**. Routledge, 2010.
- BERTHRONG, S. T., SCHADT, C. W., PINEIRO, G & JACKSON, R. B. Afforestation alters the composition of functional genes in soil and biogeochemical processes in South American grasslands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6240-6248, 2009.
- BOCHNER, B. R. Global phenotypic characterization of bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p.191–205, 2009.
- BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F & SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.
- BRUTO, M., PRIGENT-COMBARET, C., MULLER, D & MOËNNE-LOCCOZ, Y. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-

- promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-10, 2014.
- BULGARELLI, D., SCHLAEPPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L. & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.
- CAI, H., ARCHAMBAULT, M. & PRESCOTT, J. F. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 465-469, 2003.
- CAMILIOS-NETO, D., BONATO, P., WASSEM, R., TADRA-SFEIR, M. Z., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., VALDAMERI, G., DONATTI, L., FAORO, S., WEISS, V. A., CHUBATSU, L. S., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M, Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, v. 15, p. 378, 2014.
- CARVALHO, T. L. G., BALSEMÃO-PIRES, E., SARAIVA, R. M., FERREIRA, P. C. G & HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 2014, p. 1-12, 2014a.
- CARVALHO, T. L. G., PIRES, E., SARAIVA, R., VARGAS, L., BOMFIM, A. C. J., BALLESTEROS, H & HEMERLY, A. S. Nitrogen fixation in grasses-gluconacetobacter activates genes in sugarcane. **BMC Proceedings**, v. 8, p. -20, 2014b.
- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CHEEWANGKON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**. V. 23, p. 55-85, 2009.
- CHI, F., SHEN, S. H., CHENG, H. P., JING, Y. X., YANNI, Y. G., DAZZO, F. B, Ascending migration of endophytic Rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7271-7278, 2005.
- CLARKE, B. B., WHITE JR, J. F., HURLEY, R. H., TORRES, M. S., SUN, S & HUFF, D. R. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. **Plant Disease**, v. 90, p. 994-998, 2006.
- COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT C & AIT BARKA, E. 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, 2005.
- COMPANT, S., CLÉMENT, C & SESSITSCH, A, Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization,

mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

DAVID, V., TERRAT, S., HERZINE, K., CLAISSE, O., ROUSSEAU, S., TOURDOT-MARÉCHAL, R & ALEXANDRE, H. High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 811-821, 2014.

DESHMUKH, S., HÜCKELHOVEN, R., SCHÄFER, P., IMANI, J., SHARMA, M., WEISS, M & KOGEL, K. H. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 18450-18457, 2006.

DESHMUKH, S. K., VEREKAR, S. A & BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-43, 2014.

DÖRR, J., T., HUREK & B. REINHOLD-HUREK. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 7-17, 1998.

DRANCOURT, M., BOLLET, C., CARLIOZ, A., MARTELIN, R., GAYRAL, J. P & RAOULT. D. 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3623–3630, 2000.

ERNST, M., MENDGEN, K. W & WIRSEL, S. G. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 580-587, 2003

FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.

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

FISHER, P. J.; PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**. v. 45, p. 338-345, 1993.

FOUNTS, D. E., TYLER, H. L., DEBOY, R. T., DAUGHERTY, S., REN, Q., BADGER, J. H., DURKIN, A. S., HUOT, H., SHRIVASTAVA, S., KOTHARI, S., DODSON, R. J., MOHAUD, Y., KHOURI, H., ROESCH, L. F. W., KROGFELT, K. A., STRUVE, C., TRIPLETT, E. W & METHE, B. A. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella*

- pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 7, p. 1-18, 2008.
- FRIESEN, M. L., PORTER, S. S., STARK, S. C., VON WETTBERG, E. J., SACHS, J. L. & MARTINEZ-ROMERO, E. Microbially mediated plant functional traits. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 23-46, 2011.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S. & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAMA-RODRIGUES, E. D., BARROS, N. D., GAMA-RODRIGUES, A. D. & SANTOS, G. D. A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 893-901, 2005.
- GAO, X. X., ZHOU, H., XU, D. Y., YU, C. H., CHEN, Y. Q., & QU, L. H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology letters**, v. 249, p. 255-266, 2005.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HARDOIM, P. R., HARDOIM, C. C., VAN OVERBEEK, L. S. & VAN ELSAS, J. D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS One**, v. 7, p. e30438, 2012.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HESHAM, A. E. L., WAMBUI, V., JO, H. O & MAINA, J. M. Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8 S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, p. 37-43, 2014.
- HILL, G. T., MITKOWSKI, A., ALDRICH-WOLFE, L., EMELEA, L. R., JURKONIE, D. D., FICKE, A., MALDONADO-RAMIREZA, S., LYNCHA, S. T & NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 25-36, 2000.
- HOFFMAN, M. T., GUNATILAKA, M. K., WIJERATNE, K., GUNATILAKA, L., & ARNOLD, A. E. Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. **PloS one**, v. 8, p. e73132, 2013.
- HOPPE, J. M., & BRUN, E. (2004). Produção de sementes e mudas florestais. Caderno didático, v.1, 388p.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N: Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**. v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUDSON, C. J., FREEMAN, J. S., MYBURG, A. A., POTTS, B. M & VAILLANCOURT, R. E. Genomic patterns of species diversity and divergence in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, v. 2015, p. 1-15, 2015.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- JACKSON, C. R.; RANDOLPH, K. C.; OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- JANDA, J. M & ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2761–2764, 2007.
- JORGE, T. F., RODRIGUES, J. A., CALDANA, C., SCHMIDT, R., VAN DONGEN, J. T., THOMAS-OATES, J & ANTÓNIO, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: metabolite responses to abiotic stress. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 2015, p. 1-30, 2015.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHAN, A. L., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., JUNG, H. Y., LEE, J. H & LEE, I. J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-14, 2012.
- KHARWAR R. N., GOND S. K., KUMAR A & MISHRA A. A. Comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KIRK, J., BEAUDETE, L., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIROMONOS, J., LEE, H & TREVORS, J. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.

- MAGNANI, G. S., DIDONET, C. M., CRUZ, L. M., PICHETH, C. F., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Journal Genetics and Molecular Research**, v. 9, n.1, p.250-258, 2010.
- MALHOTRA, M & SRIVASTAVA, S. Stree-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 73–80, 2009.
- MIGNARD, J. P & FLANDROIS, S. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 574–581, 2006.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- MYBURG, A. A., GRATTAPAGLIA, D., TUSKAN, G. A., HELLSTEN, U., HAYES, R. D., GRIMWOOD, J *et al.* The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-362, 2014.
- NAGABHYRU, P., DINKINS, R. D., WOOD, C. L., BACON, C. W., & SCHARDL, C. L. Tall fescue endophyte effects on tolerance to water-deficit stress. **BMC Plant Biology**, v. 13, p.127, 2013.
- NILSSON, R. H., KRISTIANSSON, E., RYBERG, M., HALLENBERG, N., & LARSSON, K. H. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics online**, v. 4, p. 193, 2008.
- NUTARATAT, P., SRISUK, N., ARUNRATTIYAKORN, P & LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, p. 683-694, 2014.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, p. 78-81, 2001.
- PAIVA, J. A.; PRAT, E.; VAUTRIN, S.; SANTOS, M. D.; SAN-CLEMENTE, H.; BROMMONSCHENKEL, S.; FONSECA, P. G. S.; GRATTAPAGLIA, D.; SONG, X.; AMMIRAJU, J. S. S.; KUDRNA, D. WING, R. A.; FREITAS, A. T.; BERGÈS, H.; PETTENATI, J. G & GRIMA-PETTENATI, J. Advancing *Eucalyptus* genomics: identification and sequencing of lignin biosynthesis

- genes from deep-coverage BAC libraries. **BM Genomics**, v. 12, p. 1-13, 2011.
- PAN, Y., BIRDSEY, R. A., PHILLIPS, O. L & JACKSON, R. B. The structure, distribution, and biomass of the world's forests. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 44, p. 593-622, 2013.
- PAZ, I. C. P., SANTIN, R. C. M., GUIMARÃES, A. M., ROSA, O. P. P., DIAS, A. C. F., QUECINE, M. C & MATSUMURA, A. T. S. *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 11, p. 3711-3720, 2012.
- PHILIPPOT, L., RAAIJMAKERS, J. M., LEMANCEAU, P & VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789-799, 2013.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T, Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, p. 14:435–443, 2011.
- RINCON-FLOREZ, V. A., CARVALHAIS, L. C & SCHENK, P. M. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. **Diversity**, v. 5, p. 581-612, 2013.
- RODRIGUEZ, R. J., WHITE JR, J. F., ARNOLD, A. E & REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 82, p. 314e330, 2009.
- ROSENBLUETH, M & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.
- RYAN, R. P., GERMAINE, K., FRANKS, A., RYAN, D. J & DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SATHISH, L., PAVITHRA, N., & ANANDA, K. Antimicrobial activity and biodegrading enzymes of endophytic fungi from *Eucalyptus*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 2574, 2012.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against

- pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SHIOMI, H. F., SILVA, H. S. A., MELO, I. N. S., NUNES, F. V., BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, n.1, p.32-39, 2006.
- SICILIANO, S. D & GERMIDA, J.J. Biolog analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that *Pseudomonad* inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1717–1723, 1998.
- SIQUEIRA-JÚNIOR, J. F., FOUAD, A. F & RÔCAS, I. N. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, P. 1-15, 2012.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- SMITH, P. A. Foliage Friendships. **Scientific American**, v. 311, n. 2, p. 24-25, 2014.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. “Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards,” **Microbiology Today**, v.33, p. 152-155, 2006.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TAGHAVI, S., DER LELIE, D. V., HOFFMAN, A.; ZHANG, Y. B., WALLA, M. D.; VANGRONSVELD, J., NEWMAN, N & MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter sp.* 638. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2010.
- TEMMERMAN, R., HUYS, G & SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.348–359, 2004.
- TUPPAD, D, S & SHISHUPALA, S. Evaluation of endophytic fungi from *Butea monosperma* for antimicrobial and enzyme activity. **Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 4, p. 38-45, 2014.
- TURNER, T. R.; JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.

- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., VOS, P., KERSTERS, K & SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407–438, 1996.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VARGAS, L., SANTA BRÍGIDA, A. B., MOTA FILHO, J. P., DE CARVALHO, T. G., ROJAS, C. A., VANEECHOUTTE, D.; VAN BEL, M.; FARRINELLI, L.; FERREIRA, P. C. G.; VANDEPOELE, K & HEMERLY, A. S. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PloS One**, v. 9, p. e114744, 2014.
- VEGA, F. E., PAVA-RIPOLL, M., POSADA, F & BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal Basic Microbiology**, v 45, p371–380, 2005.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209–216, 2010.
- WHITE, J. F & TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. **Physiologia Plantarum**, v. 138, 440-446, 2010.
- WOO, P. C. Y., LAU, S. K. P., TENG, J. L. L., TSE, H & YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p. 908-934, 2008.
- YOCKTENG, R., ALMEIDA, A. M., YEE, S., ANDRE, T., HILL, C & SPECHT, C. D. A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next-generation sequencing and gene expression analyses. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, p. 1300070, 2013.

CAPÍTULO 2

COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NAS FOLHAS E EXSUDATOS XILEMÁTICOS DE EUCALIPTO

RESUMO

As espécies de eucalipto estão entre as mais cultivadas e mais valorizadas economicamente em todo o mundo. No Brasil, apresentam grande importância ambiental e econômica pela geração de milhares de empregos e por ser alternativa à utilização de madeira de florestas nativas. Em ecossistemas florestais, a parte aérea das plantas é considerada habitat comum para vários micro-organismos, e a família Myrtaceae é fonte relevante de biodiversidade de fungos. Entretanto, muito pouco é conhecido sobre a diversidade e a distribuição da microbiota em folhas e exsudatos xilemáticos em eucalipto. O objetivo desse estudo foi mostrar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade. As folhas e os exsudatos xilemáticos foram coletados no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A diversidade foi obtida empregando-se extração de DNA, amplificação da subunidade rRNA 18S, DGGE e sequenciamento das bandas eluídas. A comunidade de fungos endofíticos foi afetada pela localidade das plantas e pela sazonalidade entre as épocas de coleta. Mudanças observadas na distribuição dos grupos filogenéticos encontrados nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos indicam que a composição da comunidade endofítica em eucalipto é dependente da posição das folhas na copa das árvores e do local de cultivo. A análise filogenética mostrou a dominância dos filos Basidiomycota e Ascomycota nos ambientes estudados. Esse é o primeiro relato da presença de *Marasmius alliaceus*, *Ganoderma boninense*, *Alloclavaria purpurea*, *Coniophora puteana*, *Boletus rubropunctus*, *Dichomitus squalens*, *Fusarium solani*, *Wallemia sebi* e *Teratosphaeriaeceae* sp. como habitantes dos exsudatos xilemáticos de uma planta.

Palavras-chave: diversidade, fungos endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

As espécies de eucalipto estão entre as mais utilizadas em florestas plantadas, em razão de suas características de crescimento, adaptabilidade a condições de clima e solo distintos e valor de sua madeira (FAO, 2015). A madeira do eucalipto pode ser utilizada de várias maneiras, incluindo a produção de papel e celulose, de painéis, de madeira processada mecanicamente e na siderurgia a carvão vegetal (IBA, 2013). Além disso, também pode fornecer fonte rentável de lignocelulose para a produção de energia e biocombustíveis avançados (ROCKWOOD *et al.*, 2008). No Brasil, as plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) apresentam crescimento uniforme e alta produção de celulose, características que impulsionaram o crescimento das florestas plantadas a partir da década de 1990 (IGLESIAS-TRABADO & WILSTERMANN, 2008).

As partes aéreas das plantas são habitat comum para vários micro-organismos (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015), sendo a interação com elas importante na manutenção do equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos, dos fluxos de gases e de outros processos determinantes no ecossistema (LINDOW & BRANDL, 2003). Assim, os significados agrônomo e ambiental dos micro-organismos que habitam a parte aérea da planta podem ser expressos na adaptabilidade de populações de plantas e também na qualidade e produtividade das culturas (TURNER *et al.*, 2013). Em escala global, a diversidade de fungos tem se mostrado maior em florestas tropicais, onde a diversidade de plantas terrestres também é maior; porém, a verdadeira escala de diversidade dos endofíticos associados ainda não é bem conhecida (LUO *et al.*, 2014).

Fungos endofíticos estão presentes nas plantas terrestres e são especialmente abundantes e diversos em folhas de várias árvores tropicais. Esses micro-organismos são considerados componentes importantes da biodiversidade em escala global (ARNOLD, 2005). A diversidade de fungos endofíticos na estrutura da comunidade fúngica pode afetar a adaptabilidade e evolução da planta no ambiente em que se encontra (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015).

A caracterização da comunidade microbiana associada às plantas do eucalipto em florestas comerciais brasileiras, além de contribuir para o conhecimento da interação planta-micro-organismo, é de suma importância quando se pretende maximizar a produtividade e o manejo de uma cultura de grande expressão para a economia do país. A maioria dos trabalhos sobre a diversidade de fungos endofíticos têm sido realizados com métodos dependentes de cultivo desses

micro-organismos, o que permite acesso a apenas uma pequena fração dessa diversidade (TORSVIK & OVREAS, 2002). A investigação da diversidade microbiana pode ser realizada analisando-se o DNA total da microbiota extraído diretamente da planta para o processamento por técnicas de eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade de micro-organismos e proporcionado novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (HOSHINO & MATSUMOTO, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição e a diversidade da comunidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto no início do período chuvoso e durante os períodos chuvoso e seco.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

As duas áreas de estudo foram as florestas plantadas com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) situadas nos municípios de Catas Altas (Área 1 – Projeto Catas Altas I) e Santa Bárbara (Área 2 – Projeto Serra do Pinho), Minas Gerais, Brasil, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A floresta correspondente a Catas Altas está no sétimo ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1970, e a de Santa Bárbara está no terceiro ciclo de cultivo, com implantação em dezembro de 1989. A produtividade média das duas áreas é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos (Tabela 1) e os solos são altamente intemperizados, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o Latossolo Amarelo.

Tabela 1: Georreferenciamento das áreas das florestas plantadas de eucalipto, classe de solo predominante, ano do primeiro plantio e produtividade média da floresta (m³ ha⁻¹)/rotação.

Área/ Projeto	Latitude (w)	Longitude (s)	Altitude (m)	Classe Solo	Implantação/ plantio de eucalipto	Produtividade (m ³ ha ⁻¹)/ rotação
I (Catas Altas)	43° 24' 54"	19° 57' 32"	750	LAd1	1970	340
II (Serra do Pinho)	43° 24' 28"	20° 4' 30"	750	LAW2	1989	340

A vegetação natural dessas áreas era de floresta estacional semidecidual, a qual foi substituída pela cultura do café e por pastagens, respectivamente. Posteriormente, áreas de floresta nativa e extensas áreas de pastagens, em sua maioria compostas por áreas degradadas, foram ocupadas com a cultura do eucalipto (CENIBRA). A idade das plantas à época da amostragem era de 18 meses em Catas Altas (área 1) e de 72 meses em Santa Bárbara (área 2).

Nas duas áreas, o clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão (Tabela 2). As médias de temperaturas máxima, média e mínima nos últimos anos foram de 26,4; 16,9 e 21,6°C, respectivamente, a umidade relativa de 67% e a precipitação e o déficit hídrico de 122,9 e 15,3 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Tabela 2: Histórico de precipitação na região estudada (Catatas Altas/Santa Bárbara).

Ano	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
-----mm ³ -----												
2011	243	123,4	329,5	93,7	21,3	8,9	1,8	1	8,9	231,4	431	664,2
2012	328,3	28,7	166,1	21,8	138,6	16,5	0	5,3	36,8	-	-	-

Amostragem

Após o corte de uma árvore de cada área avaliada, foram coletadas amostras de exsudato xilemático e de folhas em terços equidistantes da copa (superior, médio e inferior). As coletas foram realizadas no início do período chuvoso (outubro de 2011), no período chuvoso (dezembro de 2012) e no período seco (abril de 2012). Cerca de 50 folhas sem sintomas de doenças (150 g) dos terços superior, médio e inferior da parte da copa foram coletadas separadamente. O exsudato xilemático foi coletado após o corte do tronco da árvore em porções de aproximadamente 1 m de comprimento, utilizando motosserra desinfestada em álcool 70%. Após 30 segundos de exsudação, o líquido foi coletado em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL. As amostras foram acondicionadas em caixa contendo gelo para o transporte ao Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. No LEM, as amostras foram estocadas em freezer a - 20°C por cerca de um mês até o processamento.

Descontaminação superficial das folhas de eucalipto

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço das copas das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato ($0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, e individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 μL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas e exsudatos xilemáticos

As folhas amostradas de cada terço das copas que se mostraram superficialmente esterilizadas após a incubação em meio R2A foram maceradas em nitrogênio líquido, e o macerado, transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL. Aos eppendorfs contendo as amostras maceradas foram adicionados tampão de extração composto de [(2% (p/v) brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), $1,4 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl, 20 mmol.L^{-1} EDTA, 100 mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH 8,0 e 1g de polivinilpirrolidona e 0,2% (v/v) de β -mercaptoethanol]. As amostras de exsudatos xilemáticos foram inicialmente homogeneizadas em vórtex e uma alíquota de 500 μL transferida para tubos de polipropileno com capacidade para 2 mL. Aos tubos foram adicionados 1000 μL de tampão de extração, 0,5 g de *beads* de 106 μm , 50 μL de SDS 4% (dodecil sulfato de sódio) e 400 μL de fenol-clorofórmio (1:24). A mistura foi submetida a agitação em homogeneizador por 10 min, e colocada em banho-maria a 60°C durante 10 min. Os tubos foram centrifugados a $15000g$, e o sobrenadante, transferido para tubos contendo 400 μL de fenol-clorofórmio, seguindo-se nova centrifugação a $15000g$ por 5 min. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 0,6 volumes de isopropanol, seguindo-se a centrifugação a $15000g$ por 20 min. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% e ressuspenso em 100 μL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram

comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc).

Análise da diversidade de fungos endofíticos

Para se examinar a diversidade de fungos endofíticos de folhas e exsudatos xilemáticos foram utilizadas a DGGE e a estratégia Nested-PCR. Para isso, em uma primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram utilizados para a primeira reação. Os fragmentos gerados foram utilizados como molde para uma segunda PCR, e a região V7-V8 foi amplificada utilizando-se os *primers* FF390 (VAINIO & HANTULA, 2000) e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000), contendo grampo GC incorporado à região *forward* desse oligonucleotídeo.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µM de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 µM do *primer* NS1, 0,16 µmol do *primer* EF3, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72° C e extensão final a 72°C durante 10 min. A segunda PCR foi realizada utilizando-se 1,0 µL da primeira reação como molde e substituição dos *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC. Nessa reação, as condições foram: desnaturação inicial a 94° C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50° C por 1 min, extensão por 1 min a 72° C e extensão final a 72°C durante 10 min.

Os *amplicons* resultantes foram submetidos a DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermophilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo, para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8% (p/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma), em gel com gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ de Tris–HCl, pH 8 e 20 mmol·L⁻¹ de ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ de EDTA,

pH 8,0), 0,09% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina) e 0,7% (p/v) de persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ de ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis foram registradas sob luz UV (300 nm) utilizando um equipamento Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise da comunidade fúngica endofítica, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, eluídas em tubos de polipropileno contendo 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos a 4°C *overnight*. Uma alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1 (sem o grampo GC). Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência foi realizada busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando-se o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença de uma banda correspondente a uma unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de diversidade foram realizadas utilizando-se o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software SigmaPlot 13.0.

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank* utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97% foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S obtidas no NCBI, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados

manualmente e o cálculo para análise filogenética baseada no alinhamento dessas sequências foi feito pelo Método de *Neighbor Joining*. A robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram determinados pela análise de *bootstrap* com 1000 réplicas, e os valores acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

O protocolo de extração de DNA e a amplificação do gene rRNA 18S resultaram em *amplicons* e migração distintos no perfil eletroforético, comprovando a eficiência para acessar a diversidade de fungos endofíticos por DGGE em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2).

O perfil eletroforético na DGGE mostrou bandas mais intensas na mesma posição relativa e número expressivo de UTOs detectadas nas folhas analisadas. A presença de UTOs de menor e maior intensidade é um indicativo de que a Nested-PCR propiciou a resolução necessária às análises de diversidade (Figuras 1 e 2). Os fragmentos de DNAs nas bandas excisadas em diferentes posições do gel da DGGE foram identificados como de membros pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota. Embora outros autores não tenham obtido resultados satisfatórios com a utilização da técnica de excisão de bandas (LIANG *et al.*, 2008), essa estratégia foi bem sucedida no acesso à diversidade de fungos endofíticos de eucalipto no presente trabalho (Figuras 1 e 2).

A análise dos fragmentos do gene rRNA 18S de fungos presentes em folhas e nos exsudatos xilemáticos revelou uma comunidade fúngica distinta, de acordo com as áreas de cultivo. O número e a densidade das bandas de fungos no gel dos exsudatos xilemáticos foram menores em relação aos das folhas, embora nas duas áreas avaliadas, a similaridade delas seja pouco mais de 30% e com o perfil distinto (Figuras 1, 2 e 3). A DGGE permitiu discriminar diferenças entre as comunidades endofíticas em eucalipto cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 2).

Nas folhas de eucalipto coletadas na região de Catas Altas, a análise por UPGMA gerou cinco grupos distintos, sendo o maior valor de similaridade (52,3%) o correspondente à coleta realizada no início do período chuvoso em folhas da parte inferior da copa da árvore (Figura 3A). A maior similaridade encontrada na região de Santa Bárbara foi 55,3%, em período seco, também na parte inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs (23 e 22) nas folhas de eucalipto independe do período de coleta. Outras UTOs exibem flutuações entre os períodos

de coleta, a exemplo da maior incidência de UTOs específicas no período chuvoso em Catas Altas, enquanto na localidade de Santa Bárbara esse fato se deu no período seco (Figura 4).

Os índices de diversidade de Shannon em Catas Altas variaram entre 2,56 a 3,02, e os de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3). Em Santa Bárbara, essa variação foi menor, com índices de diversidade entre 2,09 e 2,4, e de riqueza, entre 7,5 e 11,3 (Tabela 4). Já os índices de Shannon nos exsudatos xilêmáticos variaram entre 1,8 e 2,5, e os de riqueza, entre 6 e 16 (Figura 2).

A comunidade de fungos endofíticos em folhas de eucalipto na região de Catas Altas é distinta com relação à posição das folhas na copa da árvore e entre os períodos chuvoso e seco. Essa distinção indica que a colonização ou a permanência das espécies de fungos é influenciada pela posição das folhas e pela sazonalidade. Nessa área foram identificadas 14 espécies, sendo o maior número delas encontrado no início do período chuvoso (Tabela 5).

A comunidade endofítica das folhas de Santa Bárbara é composta por sete espécies (Tabela 6), que em sua maioria são as mesmas que as encontradas em Catas Altas (Tabela 6). Entretanto, *Anomoloma albolutescens*, *Rhodotarzetta rosea* e *Rizoctonia solani* foram exclusivas de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6).

A posição das folhas e a sazonalidade influenciaram mais a composição da comunidade de fungos endofíticos de Catas Altas que a de Santa Bárbara (Tabelas 5 e 6). Em Catas Altas, a maior prevalência de endofíticos foi encontrada no início do período chuvoso (Tabela 5), e em Santa Bárbara, no período chuvoso (Tabela 6). Nessa área, das espécies fúngicas identificadas por sequenciamento, apenas *Boletus rubropunctus* foi encontrada em mais de um terço da copa da árvore e em mais de uma época de coleta (Tabela 6). Em eucalipto, existem diferenças na colonização e na persistência de fungos endofíticos em relação à sazonalidade (Tabelas 5 e 6).

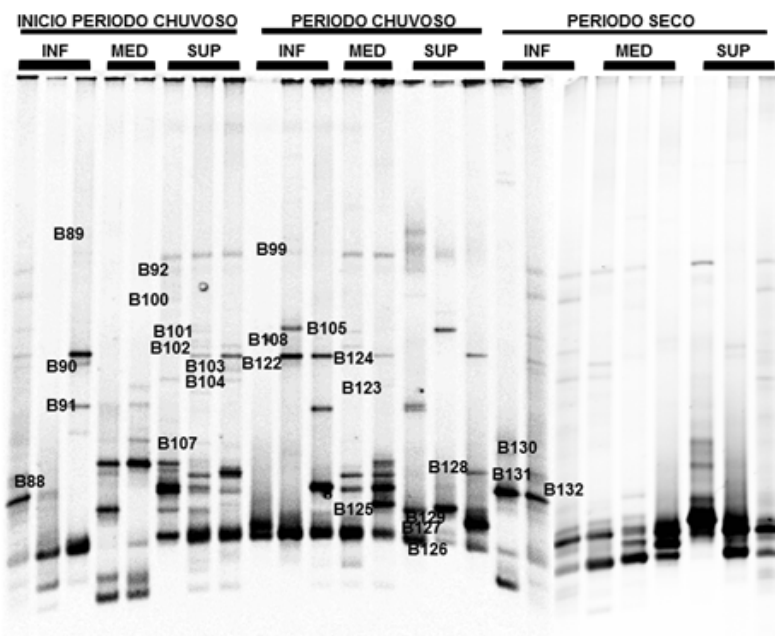
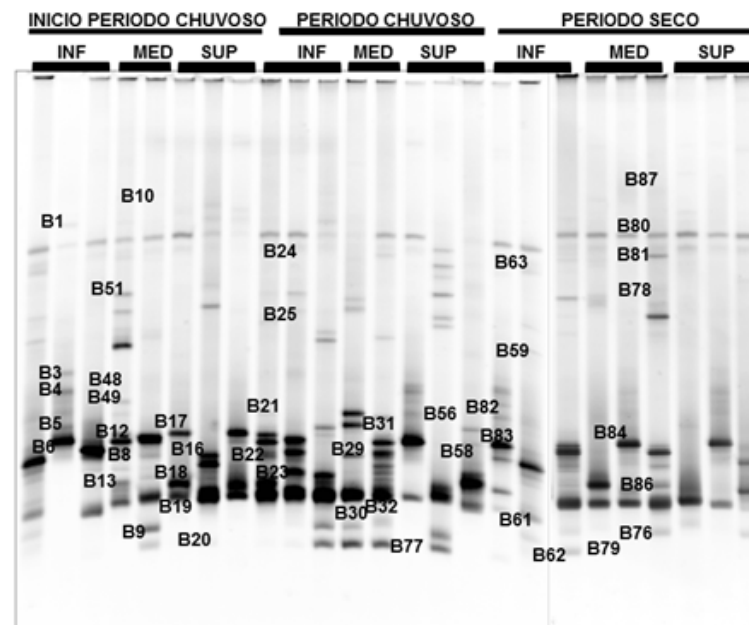
A**B**

Figura 1: Perfis eletroforéticos de DGGE da comunidade de fungos endofíticos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior (em triplicata) da copa das árvores de eucalipto cultivadas em áreas distintas: (A) - Árvores com 18 meses de idade cultivadas no município de Catas Altas, (B) – Árvores com 72 meses de idade cultivadas no município de Santa Bárbara. INF: folhas do terço inferior da copa da árvore; MED: folhas do terço médio da copa da árvore; SUP: folhas do terço superior da copa da árvore. As coletas foram realizadas no início do período chuvoso; período chuvoso e período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas.

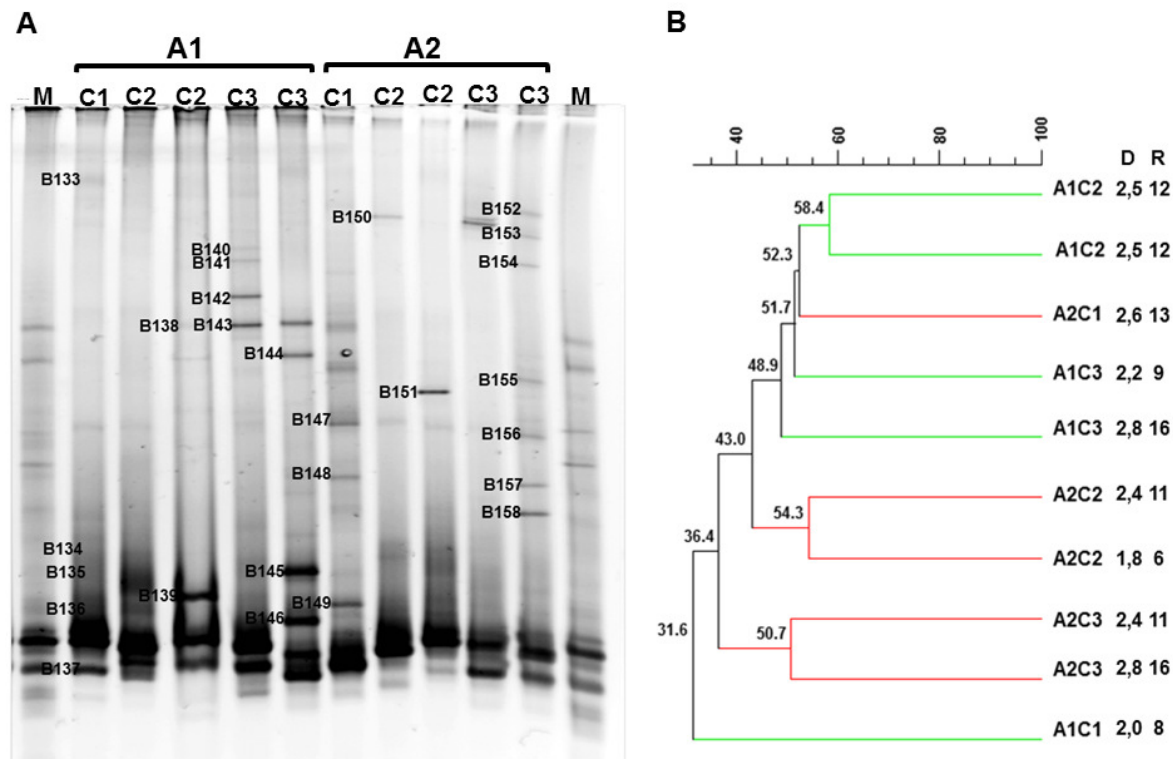


Figura 2: (A) - Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos extraídos dos exsudatos xilemáticos de eucalipto em áreas distintas. A1 - Árvores com 18 meses de idade, cultivadas no município de Catas Altas. A2 – Árvores com 72 meses de idade, cultivadas no município de Santa Bárbara. M: marcador; C1: coleta realizada no início do período chuvoso; C2: coleta realizada no período chuvoso; C3: coleta realizada no período seco. A letra B acompanhada de números arábicos indica a localização da excisão das bandas. (B) Análise de agrupamento a partir do perfil eletroforético da DGGE e índices de diversidade de Shannon (D) e Riqueza (R) das amostras de exsudatos xilemáticos.

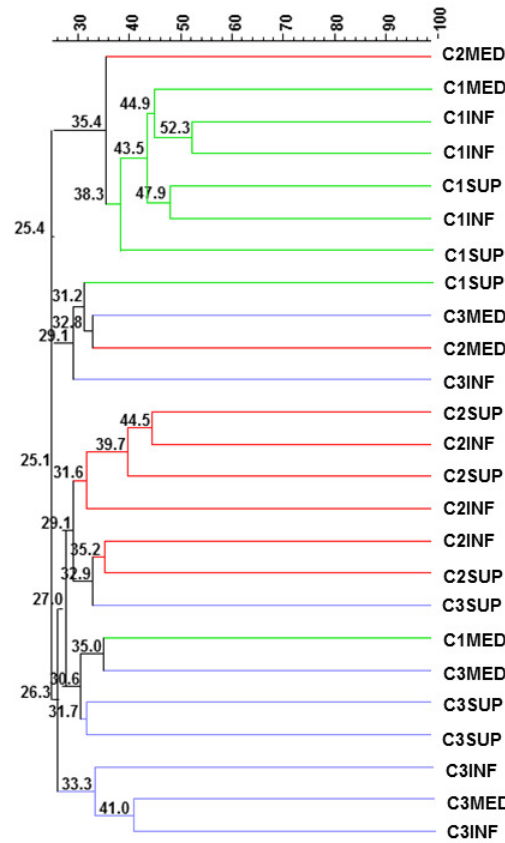
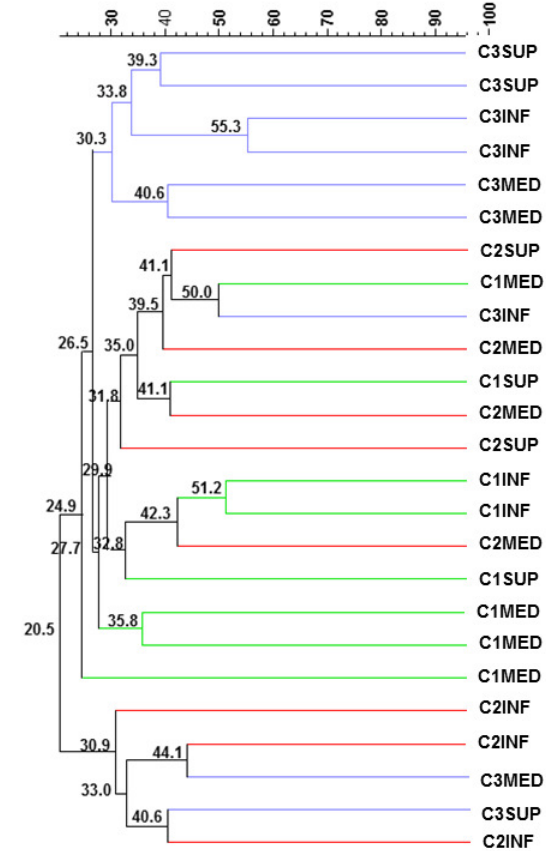
A**B**

Figura 3: Análise de agrupamento e índices de similaridades obtidos a partir do perfil eletroforético da DGGE das amostras de fungos endofíticos extraídos de folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto cultivadas em A - Catas Altas (árvores com 18 meses de idade) e em B - Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade). C1 – Coleta 1 (início do período chuvoso); C2 – Coleta 2 (período chuvoso); C3 – Coleta 3 (período seco). INF – parte inferior da copa; MED – parte média da copa; SUP – parte superior da copa.

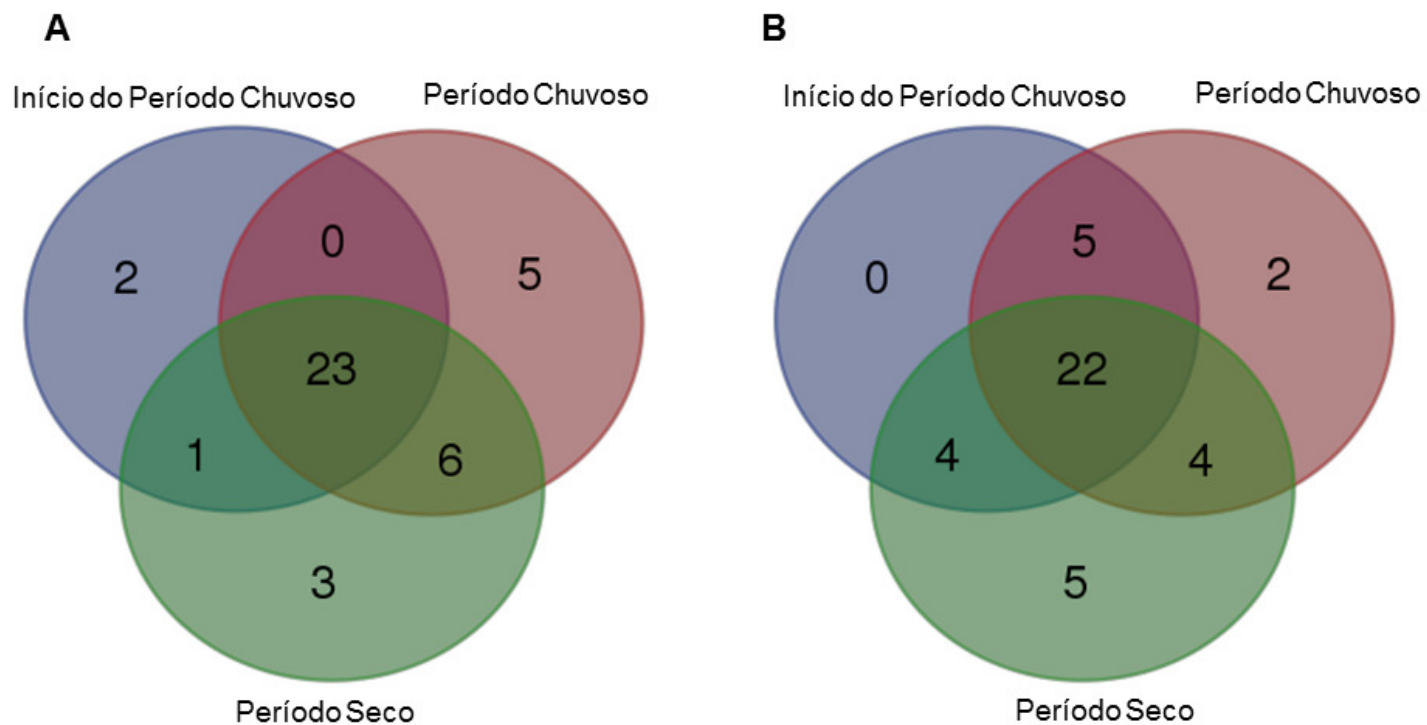


Figura 4: Distribuição de UTOs pelo diagrama de Venn em folhas de eucalipto no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco. A – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Catas Altas (árvores com 18 meses de idade). B – Distribuição das UTOs em folhas coletadas em Santa Bárbara (árvores com 72 meses de idade).

O sequenciamento dos *amplicons* a partir das bandas excisadas dos exsudatos xilemáticos mostrou a presença de oito espécies de fungos endofíticos nesse habitat (Tabela 7), sendo que a maioria delas foi identificada em Santa Bárbara. Entre os fungos endofíticos encontrados, apenas um deles, *Fusarium solani*, foi encontrado em folhas provenientes da região de Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* em Santa Bárbara. Entre as espécies encontradas, cinco são exclusivas de Santa Bárbara, uma de Catas Altas e duas são comuns às duas áreas, indicando que a interação endofítica em exsudatos xilemáticos é moldada pela sazonalidade (Tabela 7). Basidiomycota é o filo de fungo que predomina em folhas e exsudatos de eucalipto (Tabelas 5, 6 e 7). Até o momento, esse é o primeiro relato da presença de fungos em exsudatos xilemáticos.

A análise filogenética das sequências revelou que todas pertencem aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 5). A maioria dos agrupamentos formados apresentou valores de *bootstrap* acima de 70, os quais são considerados entre moderados e fortes, o que confere robustez à análise. Em Catas Altas, as bandas 1 (B1), 4 (B4), B8 (B8), 25 (B25), 62 (B62) e 87 (B87) formaram os agrupamentos com maior sustentação filogenética, com *bootstraps* maiores que 80, a maioria deles entre 98 e 100. Esses *bootstraps* são considerados fortes e proporcionaram robustez à análise filogenética.

As UTOs provenientes dos *amplicons* extraídos das bandas excisadas dos géis referentes às folhas coletadas na região de Santa Bárbara formaram os agrupamentos com maiores *bootstraps* para as bandas 99 (B99) e 101 (B101), com *bootstraps* de 97 e 99, respectivamente. As UTOs agruparam com alta sustentação filogenética e formaram dois clados distintos, ambos pertencentes ao filo Ascomycota. A sustentação da árvore filogenética é garantida pelo valor 99 do nó mais externo a ela (Figura 5), embora alguns dos valores de *bootstrap* sejam considerados moderados e baixos.

A análise filogenética para as bandas excisadas a partir de amostras de exsudatos xilemáticos também demonstrou *bootstrap*, em sua maioria, entre moderados a fortes, sustentados filogeneticamente pelo alto valor do nó mais externo. Nos exsudatos, as bandas que apresentaram maiores *bootstraps* foram a 144 (B144) e a 151 (B151) (Figura 5).

Tabela 3: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços superior, médio e inferior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior
Riqueza	17,3	15,5	15,7	13	19,5	15,7	18,3	21	16
Diversidade	2.84	2.73	2.75	2.56	2.89	2.75	2.9	3.02	2.76

Tabela 4: Riqueza e diversidade de fungos endofíticos no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Índices	Início do Período Chuvoso			Período Chuvoso			Período Seco		
	Terços da copa de eucalipto								
	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Médio	Superior	Inferior	Média	Superior
Riqueza	11,3	7,5	11	10	9,5	8,7	9,3	9,7	8,3
Diversidade	2,35	2,2	2,4	2,3	2,2	2,15	2,22	2,24	2,09

Tabela 5: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terço inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 18 meses de idade cultivadas em Catas Altas

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-Value</i>	Acesso/NCBI
Início do período chuvoso	Inferior	<i>Laetisaria fuciformis</i>	99	1 e ⁻¹⁵³	AY293139.1
		<i>Trametes versicolor</i>	99	1 e ⁻¹⁴³	KM222266.1
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	99	2 e ⁻¹⁵⁵	JQ698926.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	99	5 e ⁻¹⁴²	HQ832428.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	Médio	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832427.1
		<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Acidomyces acidothermus</i>	98	4 e ⁻¹³⁷	JQ172747.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Knufia petricola</i>	98	6 e ⁻¹³⁷	KC988739.1
		<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
Período Chuvoso	Inferior	<i>Aspergillus glaucus</i>	100	1 e ⁻¹⁵³	AY083218.1
	Médio	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Malassezia restricta</i>	99	3 e ⁻⁶¹	AAYY01000016.1
		<i>Marasmius alliaceus</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	NG_013179.1
Período Seco	Inferior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Coniophora puteana</i>	95	48e ⁻¹¹⁵	GU187631.1
		<i>Sistotrema brinkmanni</i>	98	2 e ⁻¹⁴⁶	KM232435.1
	Médio	<i>Coniophora puteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Microdochium nivale</i>	95	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Superior	<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6 e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	98	5 e ⁻¹⁴²	FJ480426.1
		<i>Coniophora pauteana</i>	97	3 e ⁻¹⁴⁵	GU187631.1

Tabela 6: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S no início do período chuvoso, período chuvoso e período seco em folhas dos terços inferior, médio e superior da copa das árvores de eucalipto em plantas com 72 meses de idade cultivadas em Santa Bárbara.

Coleta	Terços da copa	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Início do período chuvoso	Médio	<i>Anomoloma albolutescens</i>	97	8e ⁻¹⁴⁵	GU187618.1
		<i>Malassezia restricta</i>	98	1e ⁻⁶⁰	AAYY01000016.1
		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
Período Chuvoso		<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
		<i>Rhodotarzetta rósea</i>	97	4e ⁻¹⁴⁷	DQ646550.1
		<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	97	6e ⁻¹²⁶	HQ832428.1
	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1
	Superior	<i>Microdochium nivale</i>	97	2e ⁻¹⁴⁹	AF548077.1
		<i>Rizoctonia solani</i>	97	1e ⁻¹⁴³	D85644.1
Período Seco	Médio	<i>Boletus rubropunctus</i>	97	3e ⁻¹⁴⁴	FJ480426.1

Tabela 7: Distribuição, identidade, *e-value* e número de acesso do NCBI das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 18S, nos exsudatos xilemáticos de eucalipto em plantas com 18 e 72 meses de idade cultivadas em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente.

Coleta	Identificação	Identidade (%)	<i>e-value</i>	Acesso/ NCBI
Catatas altas	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Fusarium solani</i>	99	7 e ⁻¹⁵⁷	KM2222302.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
Santa Bárbara	<i>Marasmius alliaceus</i>	94	1 e ⁻⁵⁹	NG_013179.1
	<i>Alloclavaria purpurea</i>	99	6e ⁻¹³¹	DQ437679.1
	<i>Wallemia sebi</i>	98	3e ⁻⁸⁰	KM582658.1
	<i>Coniophora puteana</i>	93	3e ⁻¹⁰⁸	GU187631.1
	<i>Boletus rubropunctus</i>	85	4e ⁻⁶²	FJ480426.1
	<i>Ganoderma boninense</i>	99	3e ⁻¹⁵³	KF925452.1
	<i>Teratosphariacea sp.</i>	99	9e ⁻¹³⁴	GU250359.1

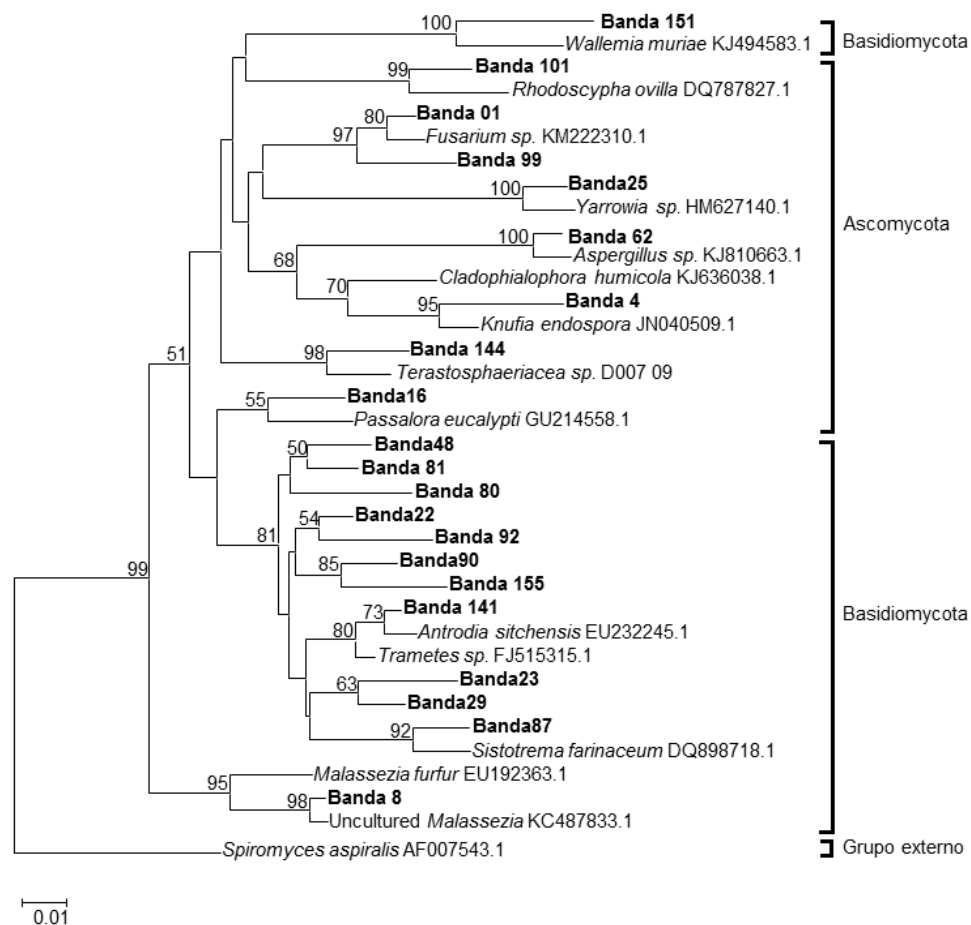


Figura 5: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos identificados em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto com 18 e 72 meses de idade cultivados em Catas Altas e Santa Bárbara, respectivamente. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos endofíticos na parte aérea de eucalipto determinada por Nested-PCR e DGGE, ao revelar número expressivo de UTOs, demonstrou ser apropriada para se avaliar a diversidade de fungos endofíticos em folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto (Figuras 1 e 2). Ressalte-se que esse método foi desenvolvido há mais de 20 anos (MUYZER *et al.*, 1993) e tem sido o de escolha em estudos de diversidade microbiana de vários ambientes, como no solo (BRESOLIN *et al.*, 2010), em plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e em animais (KITTELMANN *et al.*, 2012).

A abordagem Nested-PCR é a recomendada para facilitar a análise por DGGE de diferentes grupos microbianos em comunidades complexas, como, por exemplo, as de frutos de café (OLIVEIRA *et al.*, 2013), uma vez que também revela as populações menos abundantes.

A distribuição dos fungos endofíticos nos cinco grupos distintos gerados pela análise por UPGMA, em que o maior valor de similaridade (52,3%) foi o correspondente à coleta de folhas do terço inferior da copa da árvore no início do período chuvoso na região de Catas Altas. Tal fato indica a existência de mudança na composição da comunidade fúngica endofítica em função da sazonalidade e posição das folhas. Essa mudança é menos acentuada em folhas mais velhas da região de Santa Bárbara onde há menor número de clados distintos (Figura 3B). O maior valor de similaridade encontrado nessa área foi 55,3%, em período seco, no terço inferior da copa da árvore (Figura 3B).

A distribuição da maioria das UTOs nos três períodos de coleta das folhas de eucalipto (23 e 22) é similar; entretanto, existem UTOs específicas, as quais refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos endofíticos. Além disso, também exibem as flutuações dos períodos chuvoso e seco, a exemplo da maior incidência delas no período chuvoso em Catas Altas; ao contrário de Santa Bárbara, onde a maior incidência ocorreu no período seco (Figura 4).

As variações nos índices de diversidade de Shannon em Catas Altas, entre 2,56 a 3,02, e as de riqueza, entre 13 a 21 (Tabela 3), e as de Santa Bárbara em que foram menores, com diversidade entre 2,09 a 2,4 e riqueza entre 7,5 a 11,3 (Tabela 4), foram interpretadas como indicativo de que os terços da copa da árvore e a sazonalidade são fatores que modificam a distribuição de UTOs (Figura 4). A diversidade de espécies é medida em termos de riqueza e uniformidade, e o índice mais comum e amplamente utilizado é o de Shannon-Wiener (H'); os valores usualmente encontrados estão entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Em

virtude disso, comunidades mais diversas tendem a apresentar maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2010), o que explica a discrepância encontrada nos índices de diversidade em folhas das localidades de Catas Altas e Santa Bárbara (Tabelas 3 e 4). Portanto, a sazonalidade molda a diversidade de fungos endofíticos em eucalipto, fato que pôde ser observado pela presença de UTOs comuns e específicas em Catas Altas e Santa Bárbara (Figura 4 – Tabelas 3 e 4). A sazonalidade também pode de influenciar no ganho, na perda, na latência ou na manutenção de uma dada espécie microbiana na comunidade (Tabelas 3, 4 e 5). Embora o significado funcional dessas mudanças na estrutura da comunidade microbiana em função da sazonalidade não tenha sido demonstrado, alguns relatam que elas são influenciadas por fatores, como o antagonismo entre fungos, e por variáveis abióticas, que podem afetar a planta hospedeira e, assim, moldar a dinâmica da microbiota associada (GHIMIRE *et al.*, 2010).

A colonização endofítica é geralmente influenciada pela ontogenia das folhas (ARNOLD *et al.*, 2003). As variações na diversidade e na abundância observadas neste trabalho podem estar associadas com as propriedades nutricionais e de defesa em cada estágio de desenvolvimento desses órgãos (SANCHEZ-AZOFEIFA *et al.*, 2012). Entretanto, as diferenças na diversidade de fungos endofíticos entre as plantas de Catas Altas (mais juvenis) e as de Santa Bárbara (mais velhas), não podem ser atribuídas somente à idade das plantas. Outras variáveis, a exemplo dos ciclos de cultivo e rotação, dos teores de nutrientes e açúcares nas folhas e de outras características, podem, em conjunto, ter influenciado as diferenças entre os índices de diversidade nas duas áreas (Tabelas 5 e 6). Ciclos de cultivo e de rotação podem interferir na comunidade fúngica do solo (ELLOUZE *et al.*, 2014) e, conseqüentemente, na colonização endofítica, já que muitos dos micro-organismos endofíticos presentes em folhas são originários do solo (SPRENT & DEFARIA, 1988; HARDOIM *et al.*, 2008; VAN DER LELIE *et al.*, 2009). Adicionalmente, outros fatores também podem contribuir para as diferenças das comunidades endofíticas, tais como mudanças na fisiologia das folhas e presença de substâncias químicas, a exemplo de compostos fenólicos que podem limitar a riqueza de espécies microbianas. Por serem esses compostos inibidores naturais da colonização fúngica, em especial de representantes do filo Ascomycota, como *Aspergillus* (BANSO & RAI, 2008) e *Fusarium* (KAUR *et al.*, 2011), esses compostos podem ter inibido a presença desses táxons nas plantas mais velhas de Santa Bárbara.

A presença de maior número de UTOs nos terços médio e inferior da copa de plantas da área de Santa Bárbara (Tabela 6) possivelmente resultou de condições abióticas mais favoráveis, como maior umidade e menor incidência de radiação ultravioleta. A quantidade e a qualidade da luz incidente nas folhas, pode ter contribuído para a menor frequência de fungos nos terços superiores da copa bem como para as diferenças observadas entre as árvores de Catas Altas e de Santa Bárbara. Na literatura, há relatos de que as condições de luminosidade podem diminuir a viabilidade de propágulos fúngicos ou causar efeitos deletérios em conídios, especialmente a radiação UV-B (ISAAC, 1995; ARNOLD & HERRE, 2003; POSADAS *et al.*, 2012).

As diferenças na distribuição de fungos endofíticos nos terços superior, médio e inferior da copa das árvores e nos exsudatos xilemáticos (Tabelas 5, 6 e 7), pode indicar que a colonização endofítica seja dependente do local ou órgão da planta amostrado. As espécies *Pachylepyrium carbonicola* e *Malassezia restricta* (Tabela 5), presentes em Catas Altas, e *Boletus rubropunctus* (Tabela 6), observado em Santa Bárbara, podem ocupar diferentes micro-habitats no corpo da planta, indicando comportamento mais generalista (Tabelas 5 e 6). É relatado na literatura que fatores como altitude, umidade, densidade da copa, entre outros fatores, podem influenciar o nível de infecção da planta (QI *et al.*, 2012). O fato de as folhas abrigarem mais espécies fúngicas endofíticas (Tabelas 5 e 6) do que os exsudatos xilemáticos (Tabela 7) pode ser atribuído às diferenças nas barreiras à infecção vigentes nesses dois locais, bem como a capacidade do xilema em selecionar os micro-organismos nesse ambiente (ARNOLD & LUTZONI, 2007).

Os principais colonizadores encontrados nesse estudo (Tabelas 5, 6 e 7) diferem dos encontrados em *Eucalyptus nitens* cultivados na Austrália e Inglaterra (FISHER *et al.*, 1993). Isso pode ser atribuído à espécie da planta e às condições ambientais distintas das do presente trabalho. Além disso, as diferenças encontradas na estrutura da comunidade fúngica endofítica em diferentes espécies de eucalipto podem estar relacionadas à estratégia metodológica utilizada, já que Fisher *et al.* (1993) utilizaram métodos dependente de cultivo. A diversidade de fungos endofíticos nos exsudatos xilemáticos de eucalipto é influenciada pelo local e pela sazonalidade (Tabela 7). Na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre diversidade de fungos em exsudatos xilemáticos de árvores de eucalipto de florestas plantadas. Os exsudatos xilemáticos apresentam compostos nitrogenados e ácidos orgânicos (PFAUTSCH *et al.*, 2009), além de açúcares como sacarose, frutose, glicose, galactose e arabinose em pequenas concentrações

(MATTIELLO *et al.*, 2009). Em razão dessa composição o xilema pode ser considerado como um habitat oligotrófico para o crescimento e desenvolvimento microbiano em várias plantas, incluindo eucalipto (YADETA & THOMMA, 2013).

Os fungos endofíticos mais frequentes observados em eucalipto cultivado em Catas Altas e Santa Bárbara foram *Fusarium solani*, *Malassezia restricta*, *Pachylepyrium carbonicola* e *Boletus rubropunctus* (Tabelas 5 e 6). A alta identidade das sequências obtidas com as do banco de dados do NCBI (Tabelas 5, 6 e 7) foi o critério utilizado para a confirmação dessas espécies como pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (Figura 5). Embora muitas delas sejam patogênicas para algumas plantas, no presente trabalho, mostraram-se como de natureza endofítica. Ressalte-se que a desinfestação da superfície de folhas saudáveis, sem sintomas de infecção, foi comprovada pela ausência de crescimento fúngico em R2A da última água de lavagem. A alta dominância de alguns grupos fúngicos (Tabelas 5, 6 e 7) é uma indicação de que eles possam ter papel relevante na fisiologia da planta. Espécies fúngicas podem produzir ampla variedade de reguladores de crescimento, como giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) e auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012) e também conferir tolerância a fatores bióticos e abióticos adversos (HUBBARD *et al.*, 2014).

Os fungos endofíticos presentes no xilema apresentaram altos *bootstraps* (Figura 5) e similaridade com aqueles que são geralmente encontrados no solo e nas folhas de eucalipto, fato que pode explicar a origem da colonização xilemática. Micro-organismos endofíticos podem colonizar a planta por meio de ferimentos, nos sítios de emergência de raízes laterais (HALLMAN *et al.*, 1997) ou pela liberação de enzimas hidrolíticas (ROBL *et al.*, 2013) que lhes permitem adentrar e colonizar a planta (HALLMAN *et al.*, 1997). Dentro da planta, os exsudatos xilemáticos podem funcionar como meio de transporte para a colonização endofítica, seguindo o fluxo ascendente da seiva do xilema. Tal fato pode explicar a ocorrência de *Fusarium solani* e *Marasmius alliaceus* em folhas e exsudatos xilemáticos de Catas Altas (Figuras 5 e 7) e *Boletus rubropunctus* em folhas e exsudatos de Santa Bárbara (Figuras 6 e 7).

As comunidades fúngicas nas folhas e exsudatos xilemáticos de eucalipto mostraram-se distintas uma da outra. Somente os fungos *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* estavam presentes nas duas comunidades (Tabelas 5, 6 e 7). As espécies de *Fusarium* são relatadas como as mais frequentemente isoladas como endofíticas em plantas tropicais (VEGA *et al.*, 2010). Fungos do gênero *Marasmius* são reconhecidos pela produção de

metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli* (ROSA *et al.*, 2003). Esse grupo já foi descrito como endofítico (NGIENG *et al.*, 2013). Entretanto, na literatura consultada, não foi encontrada relatos de endofitismo para a espécie *Marasmius alliaceus*. O gênero *Boletus* apresenta espécies descritas como endofítica em folhas de *Pinus* sp., (ARNOLD *et al.*, 2007). No entanto, a espécie *Boletus rubropunctus* é relatada aqui como endofítica pela primeira vez.

A presença de *Fusarium solani*, *Marasmius alliaceus* e *Boletus rubropunctus* nos exsudatos xilêmáticos de eucalipto indica que esses micro-organismos podem ser transportados às folhas por meio do fluxo ascendente da seiva do xilema, após adentrarem a planta via raiz. A presença de fungos endofíticos em folhas e exsudatos aqui relatada amplia a compreensão da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de fungos endofíticos nessa importante espécie florestal é etapa importante para o acesso a esse patrimônio genético na busca de metabólitos e processos que possam contribuir para a melhoria no desenvolvimento da planta.

CONCLUSÕES

A DGGE foi eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de fungos endofíticos em eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade.

Os filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica endofítica em eucalipto.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilêmáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W.; MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410. 1990.
- ARNOLD, A. E., HENK, D. A., EELLS, R. L., LUTZONI, F., & VILGALYS, R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v. 99, p. 185-206, 2007.

- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, 88, p. 541–549, 2007.
- BANSO, D. S & RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 81-88, 2008.
- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 391-403, 2010.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. (2014). Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- ELLOUZE, W., ESMAEILI TAHERI, A., BAINARD, L. D., YANG, C., BAZGHALEH, N., NAVARRO-BORRELL, A., HANSON, K & HAMEL, C. Soil fungal resources in annual cropping systems and their potential for management. **BioMed Research International**, 2014.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- FISHER, P. J., PETRINI, O & SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, p. 338-345, 1993.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 19-27, 2011.
- HALLMAN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** v. 4, p. 9, 2001.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 463-471, 2008.

- HOSHINO, Y. T & MATSUMOTO, N. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 53, p. 40–55, 2007.
- HUBRRARD, M., GERMIDA, J. J. & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 109-122, 2014.
- Indústria Brasileira de árvores – IBA, v. 1, 2014. 100p.
- IGLESIAS-TRABADO, G & WILSTERMANN, D. *Eucalyptus universalis*. Global cultivated eucalypt forests map, 2008.
- ISAAC, S. Mycology Answers: Old papers, manuscripts and books often develop brown spots and patches; are these caused by fungi?. **Mycologist**, v. 9, n. 3, p. 138-139, 1995.
- KAUR, S., SINGH, H. P., BATISH, D. R & KOHLI, R. K. Chemical characterization and allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*. **Journal of Plant Interactions**. v. 6, p. 297-302, 2011.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) Suitable for Large-Scale Sequence-Based Community Structure Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LIANG, Z., DRIJBER, R. A., LEE, D. J., DWIEKAT, I. M., HARRIS, S. D & WEDIN, D. A. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 956-966, 2008.
- LINDOW, S. E & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875–1883, 2003.
- LUO, J., WALSH, E., NAIK, A., ZHUANG, W., ZHANG, K., CAI, L & ZHANG, N. Temperate pine barrens and tropical rain forests are both rich in undescribed fungi. **PloS One**, v. 9, p. e103753, 2013.
- MATTIELLO, E. M., RUIZ, H. A., SILVA, I. R. D., SARKIS, J. E. S., NEVES, J. C. L & PUCCI, M. M. Phloem mobility of boron in two eucalypt clones. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1695-1704, 2009.
- MAY, L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 829-841, 2001.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C & UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p.695–700, 1993.

- NGIENG, N. S., ZULKHARNAIN, A., ROSLAN, H. A., & HUSAINI, A. Decolourisation of synthetic dyes by endophytic fungal flora isolated from Senduduk plant (*Melastoma malabathricum*). **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PFAUTSCH, S., GESSLER, A., ADAMS, M. A & RENNENBERG, H. Using amino-nitrogen pools and fluxes to identify contributions of understory *Acacia* spp. overstory *Eucalyptus regnans* and stand nitrogen uptake in temperate Australia. **New Phytologist**, v. 183, p. 1097-1113, 2009.
- POSADAS J. B., MARICEL, A. L., MINI J. I & LECUONA R, E. Natural Tolerance to UV-B and Assessment of Photoprotectants in Conidia of Six Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Griv) Vuillemin. **World Applied Sciences Journal**, v. 20, p. 1024-1030, 2012.
- QI, F., JING, T & ZHAN, Y. Characterization of endophytic fungi from *Acer ginnala* Maxim. in an artificial plantation: media effect and tissue-dependent variation. **PLoS ONE**, v. 7, p. 46785-46785, 2012.
- REASONER, D. J & GELDREICH, E. E A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, p. 1-7, 1985.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C., VICENTE, V. A., PRADELLA, J. G. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v.13, p. 1-12, 2013.
- ROCKWOOD, D. L., RUDIE, A. W., RALPH, S. A., ZHU, J. Y & WINANDY, J. E. Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1361-1378, 2008.
- ROSA, L. H., MACHADO, K. M. G., JACOB, C. C., CAPELARI, M., ROSA, C. A., & ZANI, C. L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 967-974, 2003.
- SANCHEZ-AZOFEIFA, A., OKI, Y., FERNANDES, G. W., BALL, R. A & GAMON, J. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees**, v. 26, p. 291–299, 2012.
- SPRENT, J. I & DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.

- TORSVIK, V & OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p. 240-245. 2002.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.
- VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., MONCHY, S., SCHWENDER, J., MILLER, L., FERRIERI, R., ROGERS, A., WU, X., ZHU, W., WEYENS, N., VANGRONSVELD, J & NEWMAN, L. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- VEGA, F. E., SIMPKINS, A., AIME, M. C., POSADA, F., PETERSON, S. W., REHNER, A., INFANTE, F., CASTILLO, A & ARNOLD, E. A. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, n. 3, p. 122–138, 2010.
- YADETA, K. A & THOMMA, B. P. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-12, 2013.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 3

FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS ENDOFÍTICOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As folhas do eucalipto sustentam diversidade variável de fungos filamentosos e de leveduras que podem exercer influência na sanidade e no desenvolvimento da planta. Endofíticos interagem com a planta sem causar sintomas ou sinais de doença. Fungos simbiossiontes podem utilizar açúcares solúveis simples, como glicose e frutose, os quais podem funcionar como principal fonte de carbono para esses micro-organismos. O eucalipto é cultivado em todo o mundo e é a espécie da família Myrtaceae mais amplamente distribuída e utilizada em plantios comerciais. Neste estudo, a diversidade e a distribuição de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos do híbrido eucalipto urograndis foram determinadas e relacionadas à concentração de açúcares em folhas provenientes de plantas em cinco fases de desenvolvimento, incluindo as mudas de viveiro e plantas em campo. O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Foram identificadas: 15 espécies e dois gêneros de fungos e duas espécies e sete gêneros de leveduras. As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a estrutura da comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em folhas. Muitas das espécies identificadas são específicas de determinada fase de desenvolvimento. Os fungos endofíticos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos de folhas de plantas da fase de jardim clonal; *Chaetomella acutisetula* e *Ascotricha chartarum* de folhas da fase de sombreamento; *Erratomyces patellii* e *Saxomyces* sp. de folhas da fase de saída do sombreamento; *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da fase de expedição, e *Mycosphaerella populicola*, das folhas de plantas do campo. As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* são específicas das folhas das fases de sombreamento e recém-saídas do sombreamento, respectivamente. Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar folhas de plantas provenientes de mais de uma fase de desenvolvimento. O fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem em plantas nas fases de expedição e de campo, e o gênero *Candida*, nas de jardim clonal, sombreamento e saída do sombreamento. Neste estudo é apresentada pela primeira vez a presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

Palavras-chave: diversidade, fungos, leveduras, endofíticos, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

A parte aérea das plantas, especialmente as folhas, é considerada habitat de grande importância agrônômica e ecológica, por hospedar grande diversidade de micro-organismos endofíticos e epifíticos, incluindo fungos e leveduras. Os micro-organismos endofíticos, em particular, já foram encontrados em várias espécies de plantas, sendo importantes componentes da biodiversidade (ARNOLD *et al.*, 2000). *Eucalyptus* spp. são as plantas da família Myrtaceae mais amplamente distribuídas e utilizadas em plantios comerciais em muitos países (FAO, 2015), devido ao seu rápido crescimento, à sua adaptabilidade e ao valor comercial de sua madeira (BROOKER, 2000). A avaliação da diversidade e abundância de fungos filamentosos e de leveduras em eucalipto, com a utilização de metodologia independente de cultivo, reconhecidamente retrata, com maior fidelidade, a complexidade dessas comunidades e suas interações com a planta (KEMLER *et al.*, 2013). Assim, a complexidade da microbiota fúngica endofítica tem sido subestimada até o momento.

As leveduras compreendem o maior grupo de micro-organismos epifíticos em interação com plantas (WHIPPS *et al.*, 2008), enquanto fungos endofíticos são abundantes em folhas assintomáticas de várias árvores tropicais (ARNOLD, 2005). Esses micro-organismos apresentam grande influência sobre a planta, por afetarem a estrutura da comunidade e a diversidade de organismos a ela associados ou a adaptabilidade e evolução do hospedeiro (OMACINI *et al.*, 2001; BRUNDRETT, 2006). Além disso, são fontes de várias enzimas de interesse industrial, como celulasas, xilanases, lacases, pectina liase, hemicelulasas, entre outras, e, por isso, estão entre os micro-organismos de maior interesse para produção de biocompostos industriais (LUMYONG *et al.*, 2002; ROBL *et al.*, 2013).

Endofíticos são organismos que vivem interiormente nos tecidos da planta, não causando sintomas de doenças (ARNOLD *et al.*, 2007), e, em associação com árvores, podem reduzir danos às folhas e as perdas ocasionadas por patógenos (ARNOLD *et al.*, 2003). Apesar de o Brasil ter a maior área de plantio de eucalipto no mundo e da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de fungos nessa planta (CHEEWANGKON *et al.*, 2009; SÁNCHEZ MÁRQUEZ *et al.*, 2011), pouco se conhece sobre a dinâmica das comunidades microbianas endofíticas durante as fases de desenvolvimento da planta em viveiro e no campo. A compreensão do impacto das práticas de produção de mudas em viveiros sobre a estrutura das comunidades microbianas endofíticas é fundamental para a produção de mudas mais saudáveis e resistentes ao transplante para o campo.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de fungos filamentosos e de leveduras endofíticas associados às folhas de eucalipto em fases distintas do desenvolvimento da planta, em viveiros comerciais e em campo, e relacioná-la às concentrações de açúcares foliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Este estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP – etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e a campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato.

Fertilizantes	Doses* (kg/m ³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira

(CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de $340 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ /rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é $19^\circ 24' 54''$, a longitude $42^\circ 25' 56''$ e a altitude 318 m. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulinitico ou caulinitico-oxídico ou gibbsítico-oxídico, hipoférrico ou mesoférrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente; a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56, 39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

Amostragem

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20°C . Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato ($0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi

repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspensionado e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspensionado *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Extração de açúcares

As amostras de folhas de eucalipto foram analisadas quanto ao conteúdo de glicose, frutose e sacarose (LISEC *et al.*, 2006) por metodologia adaptada. O extrato das amostras de folhas de cada uma das cinco fases de desenvolvimento

da planta foi preparado por maceração, em almofariz e pistilo, de cerca de 50 a 60 mg de tecido foliar, seguindo-se a transferência do macerado para tubo de polipropileno e adição de 1000 µL de metanol (100%). Essa mistura foi aquecida a 70°C sob agitação de 950 rpm durante 60 min, seguindo-se a centrifugação a 14000g por 10 min. Cerca de 600 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos contendo 500 µL de clorofórmico e 800 µL de água. Após centrifugação a 12000g por 15 min, a fase polar foi coletada (1000 µL), e os açúcares quantificados por ensaios enzimáticos acoplados, pelo aumento da densidade óptica a 340 nm da razão NADP/NADPH⁺H⁺ detectada (Multiscan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As enzimas utilizadas foram glicose 6-fosfato (0,2 mg/mL), hexoquinase (0,2 mg/mL), fosfoglicose isomerase (0,2 mg/mL) e invertase (1 mg/mL). Sucessivamente, essas enzimas foram adicionadas ao extrato de folhas e as concentrações de glicose, frutose e sacarose expressas em mmol/kg de massa seca. A concentração de sacarose foi estimada como correspondente à metade da concentração de hexose. As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise da diversidade de fungos e leveduras

A diversidade de fungos e de leveduras em folhas de eucalipto foi examinada por DGGE, e a estratégia Nested-PCR foi utilizada. Na primeira PCR, o DNA total foi utilizado como molde para amplificação da região V1-V9 do gene rRNA 18S de fungos e dos domínios D1-D2 de rRNA 26S de leveduras. Os oligonucleotídeos iniciadores NS1 (MAY *et al.*, 2001) e EF3 (OROS-SICHLER *et al.*, 2006) foram os utilizados para amplificação de fungos, e o NL1 (COCOLIN *et al.* 2000) e NL4 (PRAKITCHAIWATTANA *et al.*, 2004), para leveduras. Os fragmentos específicos gerados foram utilizados como molde para segunda PCR, sendo a região V7-V8 amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1GC (VAINIO & HANTULA, 2000) para amplificação de fungos e NL1GC e LS2 (COCOLIN *et al.* 2000) para leveduras. Esses oligonucleotídeos continham grampo GC incorporado à região *forward*.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µmol de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mmol de cloreto de magnésio, 0,16 µmol dos *primers* NS1, EF3, NL1 e NL4, aproximadamente 50 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações para fungos foram realizadas sob as seguintes

condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min, extensão por 2 min a 72°C e extensão final durante 10 min a 72°C. Para a amplificação dos *amplicons* das leveduras a temperatura inicial foi de 95°C e a de anelamento 52°C. A segunda PCR foi realizada com 1,0 µL da primeira como molde, e substituição do *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC e NL1 e NL4 por NL1GC e LS2. Os *amplicons* de fungos filamentosos foram amplificados em desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min, extensão por 1 min a 72°C e extensão final a 72°C durante 10 min. Com os *amplicons* de leveduras, a desnaturação inicial foi a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, 52°C e 72°C durante 2 min para anelamento e extensão, e, extensão final a 72°C por 7 min.

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após a Nested-PCR foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermo-lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização das bandas dos géis com utilização do software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (m/v) (37.5:1, acrilamida – N,N=metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09 % (v/v) TEMED (N,N,N=,N=tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 35%–55% (fungos filamentosos) e 40%-60% (leveduras) ureia/formamida [(100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida)]. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), e as imagens dos géis obtidos por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Para análise das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras, bandas individuais dos géis de poliacrilamida foram excisadas, os *amplicons* eluídos em 30 µL de água Mili-Q esterilizada e mantidos *over night* a 4°C. Uma

alíquota de 7 µL do eluído de cada banda foi utilizada como molde para PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FF390 e FR1. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea, e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). Para cada sequência dos fungos filamentosos e das leveduras foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de fungos filamentosos e de leveduras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e a ausência como zero (0). A estrutura dessa comunidade foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software Sigma plot (Systat Software, Inc. 2008). Foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificar a correlação entre os teores de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e os índices de riqueza e diversidade a 5% de probabilidade (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências de rRNA 18S ou 26S, utilizando-se ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética foi baseado no alinhamento dessas sequências, utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram realizados por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a estrutura da comunidade de fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto em fases distintas de desenvolvimento das plantas foram examinadas por DGGE e sequenciamento do rRNA 18S e 26S. O protocolo de extração de DNA e a amplificação dos genes rRNA 18S e 26S foram eficientes para acessar a diversidade dessas comunidades endofíticas em folhas de eucalipto (Figura 1).

A análise por DGGE mostrou que o número de táxons representados pelas UTOs, é afetado pelas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2), indicando mudança na comunidade de fungos e de leveduras endofíticos em interação com a planta. O padrão obtido pelos *primers* proporcionou a observação de bandas mais e menos intensas no perfil eletroforético (Figuras 1 e 2), permitindo a análise de populações de maior e menor abundância.

O perfil da comunidade de leveduras mostrou maior complexidade (Figura 2) e homogeneidade nas diferentes amostras em comparação ao perfil de fungos (Figura 1), evidente pelo maior número de UTOs e pela maior riqueza e diversidade (Figuras 4 e 5).

A análise de agrupamento hierárquico por UPGMA revelou que os padrões dos perfis entre as etapas de cultivo foram diferentes (Figura 1B e 2B). Os resultados da análise de agrupamento indicam a formação de grupos distintos que compartilham entre 25% (Figura 1) e 35% (Figura 2) de similaridade e subgrupos mais similares que tendem a agruparem juntos. As folhas das plantas oriundas do jardim clonal e das plantas recém-saídas do sombreamento apresentaram composição da comunidade fúngica similar, e as do sombreamento e expedição formaram pelo menos um clado com 43,9% e 64,2% de similaridade (Figura 1). À exceção do subgrupo das folhas em sombreamento, em todas as fases de desenvolvimento das plantas, a comunidade de leveduras foi similar, alcançando valores de mais de 87% de similaridade no jardim clonal (Figura 2).

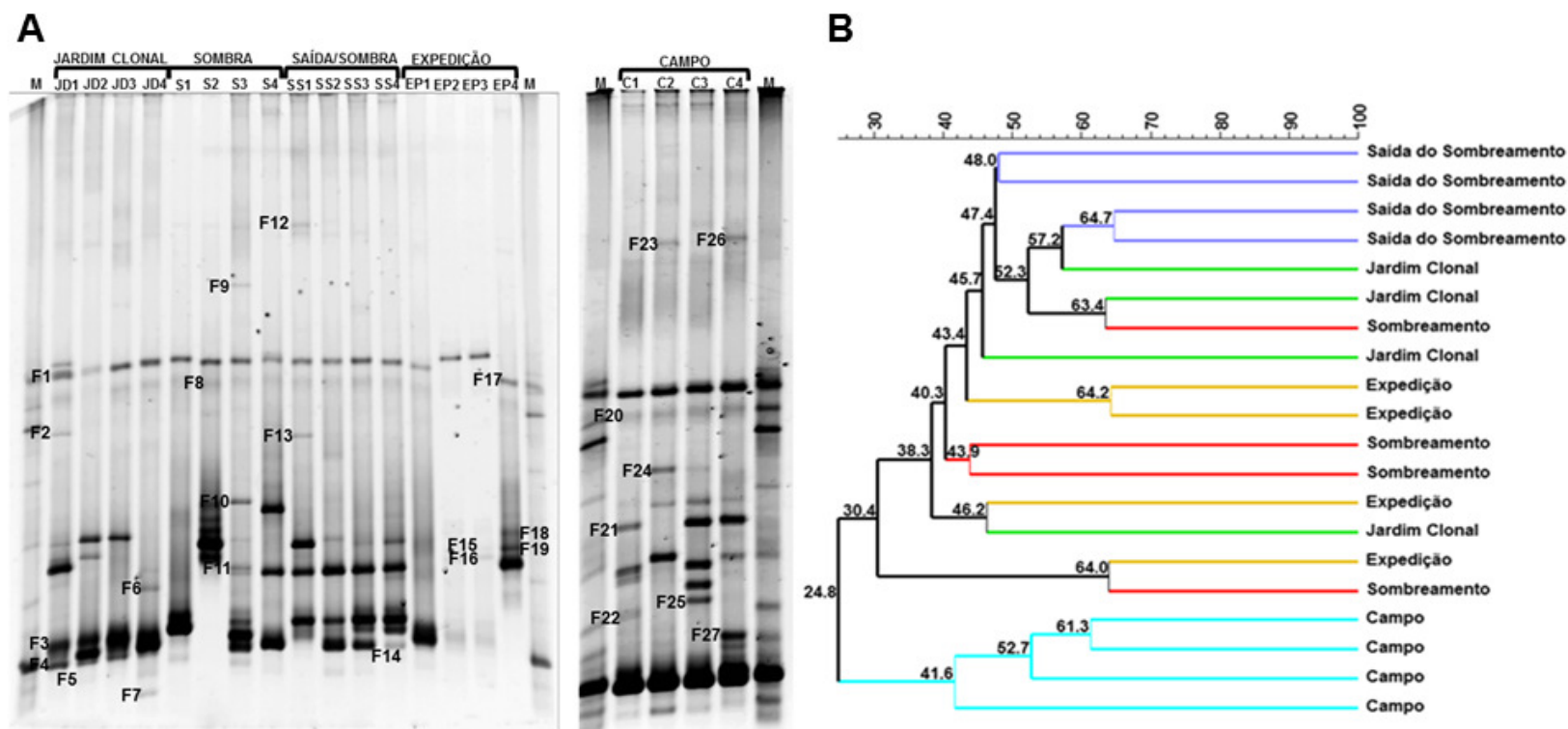


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de fungos endofíticos durante as fases de desenvolvimento do eucalypto. A – Gel a partir da DGGE. As letras F seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalypto em quatro repetições.

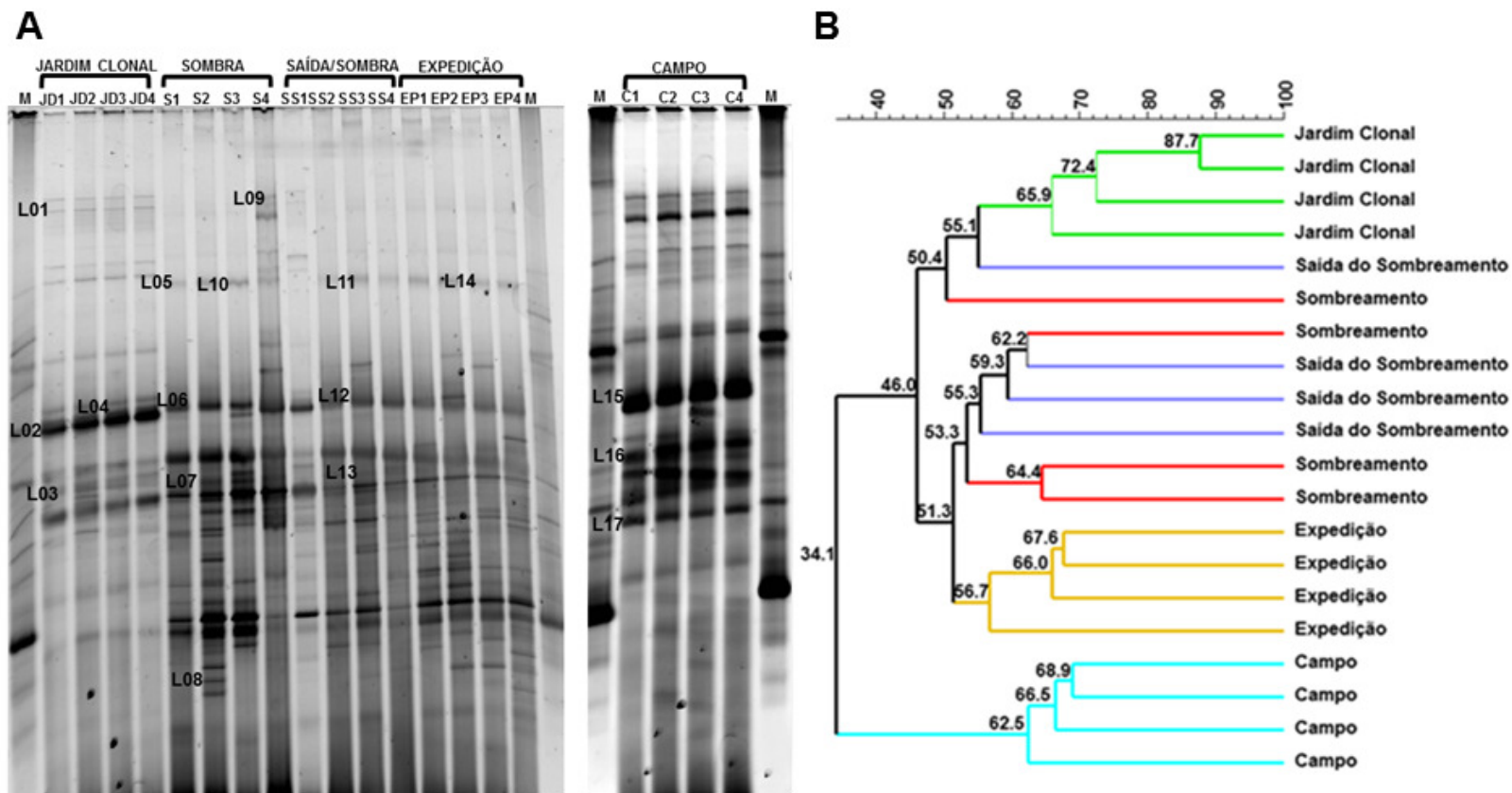


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de leveduras endofíticas durante as fases de desenvolvimento do eucalipto. A – Gel a partir da DGGE. As letras L seguidas de números arábicos indicam a localização da excisão das bandas. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* das amostras de folhas das fases de desenvolvimento do eucalipto em quatro repetições.

Embora a maioria das UTOs (8 e 10) seja comum entre as fases de desenvolvimento das plantas, existem UTOs específicas para cada uma delas, refletindo diferenças na estrutura das comunidades de fungos filamentosos e leveduras. A maior incidência de UTOs específicas de fungos ocorreu nas folhas provenientes do campo, enquanto para leveduras isso ocorreu nas folhas da expedição e campo (Figura 3). Mesmo sendo pequenas, essas mudanças mostraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto modulam a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, fato mais evidente para as leveduras.

A diversidade e a riqueza de fungos endofíticos não foram influenciadas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 4), diferentemente do observado para as leveduras que apresentaram maiores médias desses índices nas amostras das plantas em expedição (Figura 5). As folhas do jardim clonal foram as que mostraram os menores índices de diversidade e de riqueza de leveduras (Figura 5).

A concentração de glicose e frutose variou em relação às folhas provenientes das fases de desenvolvimento das mudas e no campo, enquanto os teores de sacarose foram mais próximos. As maiores concentrações de glicose e frutose foram encontradas nas folhas das plantas em expedição e no campo, enquanto as de sacarose somente em campo (p -valor $< 0,05$) (Figura 6). Entretanto, as correlações entre os teores de glicose, frutose e sacarose e os índices de riqueza e diversidade de Shannon foram moderadamente negativas ($-0,8 < r \leq -0,5$) (p -valor $> 0,05$).

A identificação das UTOs foi realizada pela excisão das bandas do gel da DGGE, sequenciamento do rRNA 18S e 26S e comparação das sequências obtidas pelo algoritmo BLASTn (NCBI). O sequenciamento das UTOs de diferentes posições do gel revelou a presença dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Dentro desses filos, foram identificadas 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos (Figura 7) e duas espécies e sete gêneros de leveduras (Figura 8), em plantas de diferentes idades, em viveiro e em campo.

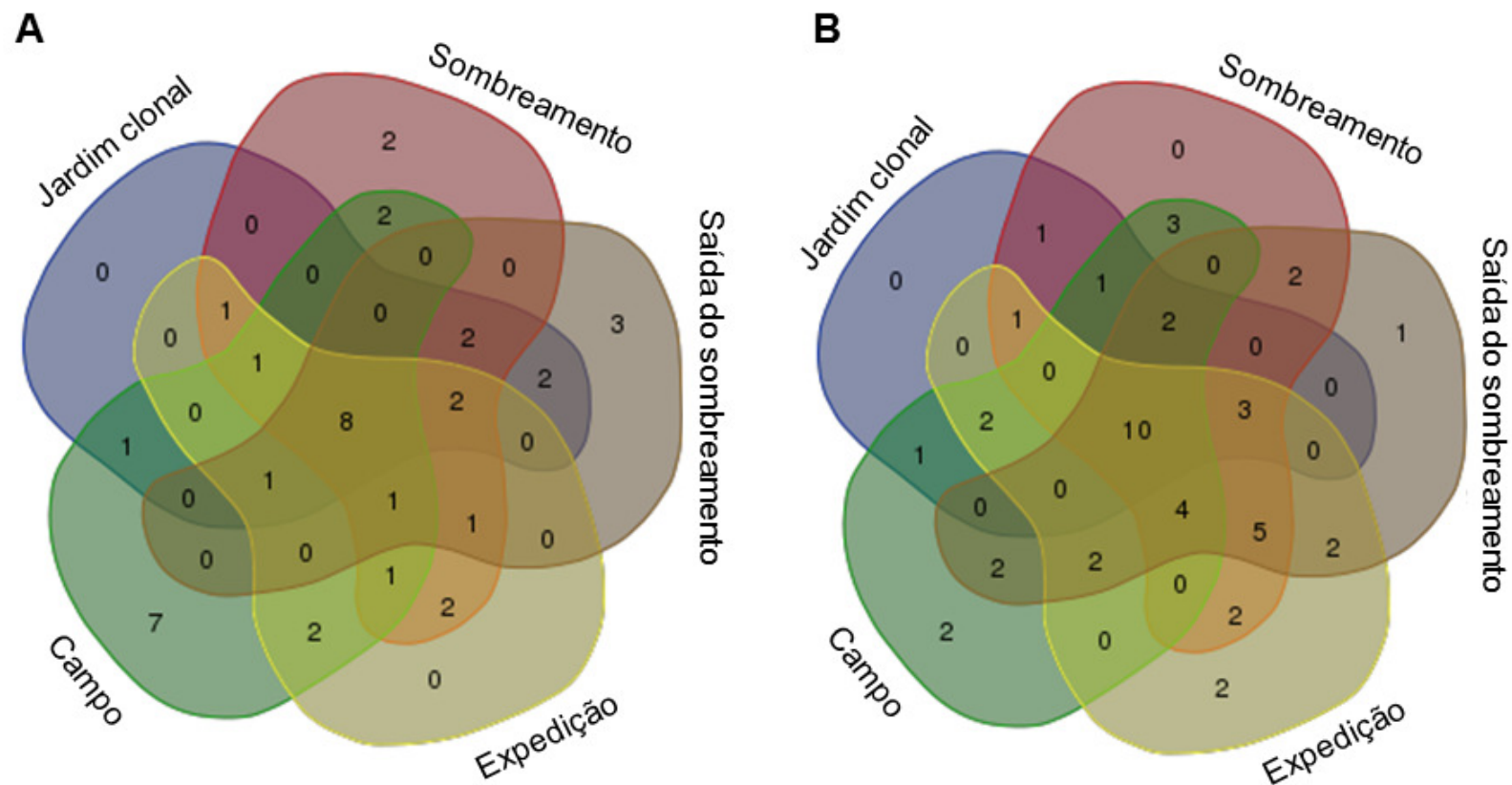


Figura 3: Distribuição de UTOs de fungos (A) e de leveduras (B) pelo diagrama de venn em diferentes etapas de desenvolvimento das folhas de eucalipto: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo.

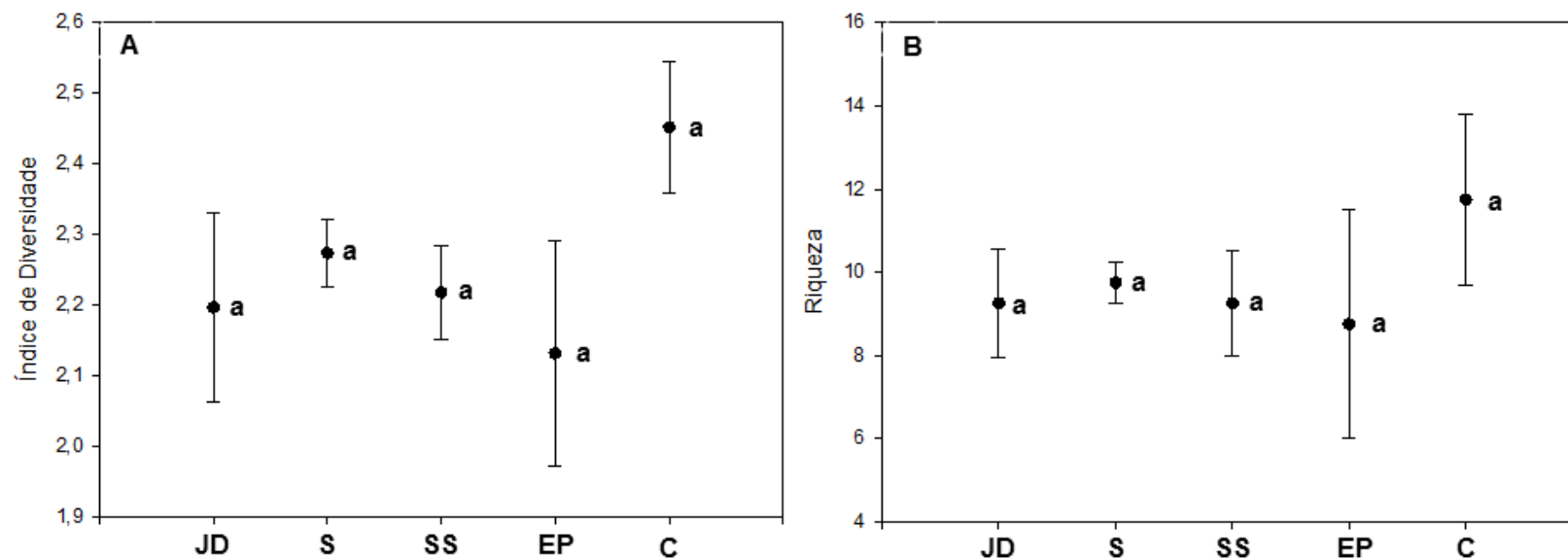


Figura 4: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de fungos endofíticos em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

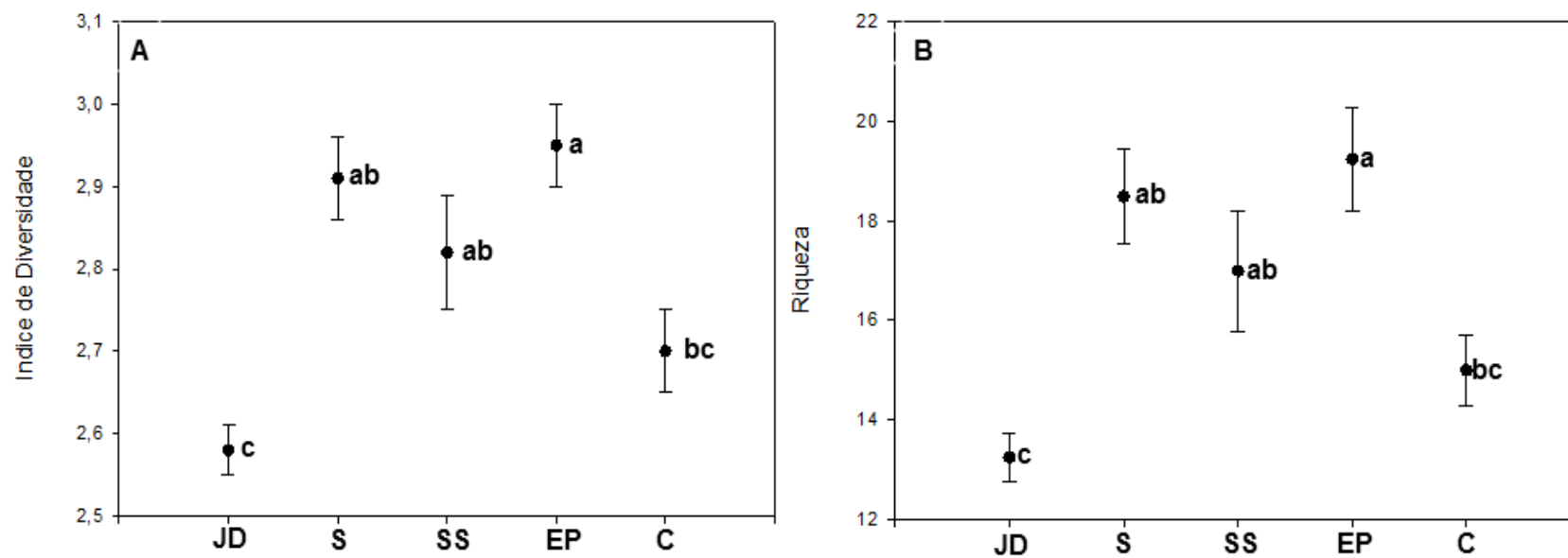


Figura 5: Perfil de diversidade (A) e de riqueza (B) de leveduras endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

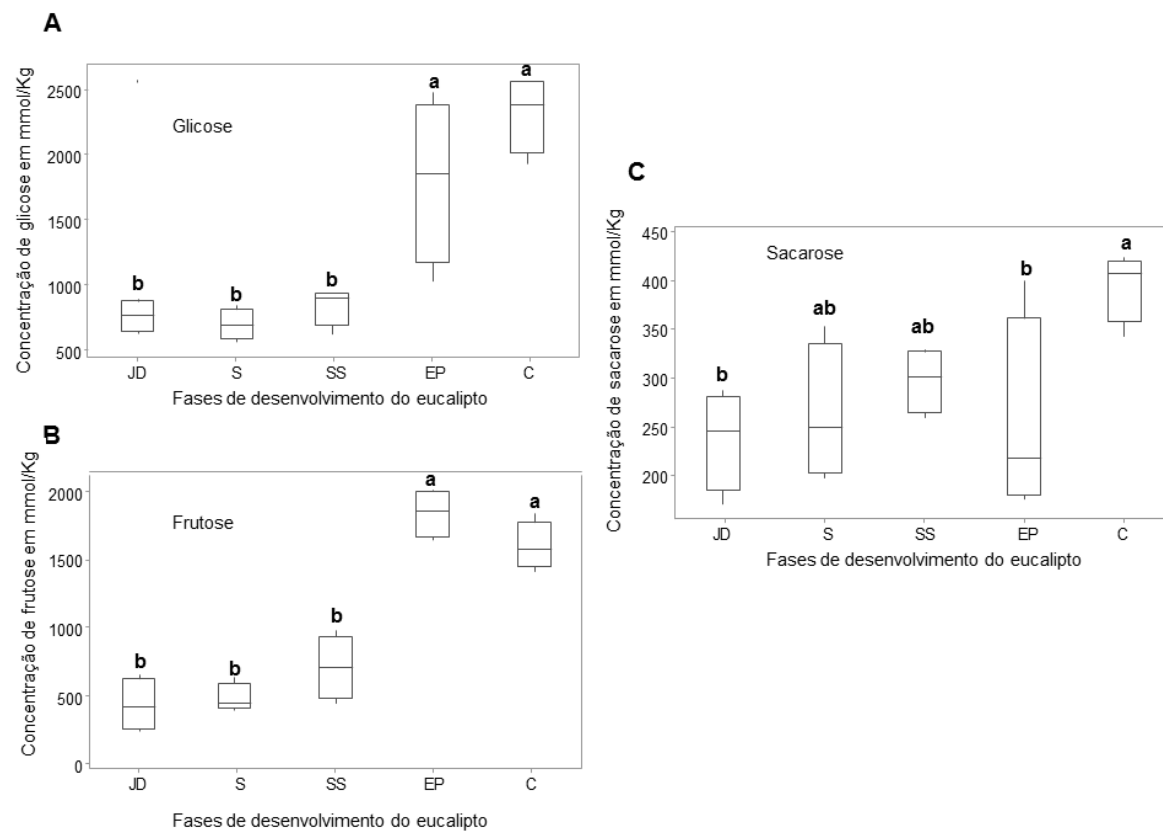


Figura 6: Boxplots mostrando as concentrações de açúcares (glicose, frutose e sacarose) em mmol/kg de folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. (A): glicose (B): frutose e (C): sacarose. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação entre fungos endofíticos e eucalipto é dependente das fases de desenvolvimento da planta, pois a maioria das espécies é fase-específica (Tabela 2). Entretanto, *Cladosporium* sp. e *Teratosphaeria acidotherma*, se mostraram presentes em mais de uma etapa (Tabela 2). Essas diferenças na colonização endofítica em folhas de eucalipto podem indicar a presença de condições mais favoráveis ao estabelecimento de determinadas espécies em dado momento. O menor número de fungos endofíticos identificados pelo sequenciamento do rRNA 18S foram provenientes das plantas sombreadas, todas elas específicas dessa fase de desenvolvimento (Tabela 2).

A comunidade de leveduras em interação com o eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento das plantas foi acessada pela primeira vez em eucalipto e, à semelhança do que ocorre em *Coffea arabica* (MASOUD *et al.*, 2004), é composta por muitos representantes de poucas espécies ou gêneros, distribuídas nos filos Ascomycota e Basidiomycota. A maioria das UTOs sequenciadas foi identificada em nível de gênero por apresentarem identidades abaixo de 97% com as sequências do banco de dados NCBI (Tabela 3). Entretanto, os representantes do filo Basidiomycota *Rhodospodium fluviale* e *Aureobasidium pullulans* apresentaram identidades de 99 e 98%, respectivamente, valores esses que possibilitaram a identificação em nível de espécie. Essas leveduras são específicas das fases de expedição e campo (Tabela 3). Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em folhas de eucalipto. As leveduras endofíticas identificadas em interação com eucalipto mostraram ser dependentes da fase de desenvolvimento em associação com a planta. Tanto fungos quanto leveduras não são persistentes durante o desenvolvimento do eucalipto.

A análise filogenética das sequências de rRNA 18S revelou que a comunidade de fungos endofíticos presente nas folhas de eucalipto pertence aos filos Basidiomycota e Ascomycota, formando clados distintos (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), valores que suportam a análise (Figura 7).

Tabela 2: Distribuição das espécies/gêneros de fungos endofíticos identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade	Acesso/NCBI	Banda	Filo
			(%)			
Jardim Clonal (JD)	<i>Diplomitoporus crustulinus</i>	9 e ⁻¹³⁸	99	AY336770.1	B10	Basidiomycota
	<i>Podosphaera tridactyla</i>	5 e ⁻¹³⁵	99	AB022392.1	B07	Ascomycota
	<i>Aspergillus restrictus</i>	2 e ⁻¹³⁸	99	AB008407.1	B11	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Ascotricha chartarum</i>	6 e ⁻¹⁵⁵	99	AB048283.1	B12	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	3 e ⁻¹³³	99	AY544728.1	B13	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹³⁰	98	AB537894.1	B14	Ascomycota
	<i>Chaetomella acutiseta</i>	7 e ⁻⁹⁹	91	AY544728.1	B15	Ascomycota
Saída do Sombreamento (SS)	<i>Erratomyces patelii</i>	2 e ⁻¹⁰⁸	96	DQ663693.1	B17	Basidiomycota
	<i>Saxomyces</i> sp.	1 e ⁻¹¹⁶	98	KC315864.1	B20	Ascomycota
Expedição (EP)	<i>Lepidostroma</i> sp.	6 e ⁻⁴⁰	99	AB767250.1	B21	Basidiomycota
	<i>Schizophyllum radiatum</i>	5 e ⁻¹¹¹	95	AY705952.1	B22	Basidiomycota
	<i>Mycosphaerella lateralis</i>	7 e ⁻¹³⁹	99	GU214531.1	B25	Ascomycota
	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B26	Ascomycota
Campo (C)	<i>Cladosporium</i> sp.	2 e ⁻¹²⁵	97	KM222206.1	B27	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	1 e ⁻¹⁰¹	92	AB537895.1	B29	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	3 e ⁻¹³²	99	AB537895.1	B30	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	98	GU214618.1	B33	Ascomycota
	<i>Teratosphaeria toledana</i>	1 e ⁻¹⁴⁷	99	GU214618.1	B34	Ascomycota
	<i>Mycosphaerella populicola</i>	8 e ⁻⁹³	92	EU167578.1	B39	Ascomycota

Tabela 3: Distribuição das espécies/gêneros de leveduras endofíticas identificadas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento. As espécies estão acompanhadas do *e-value*, dos valores de identidade (%), do número de acesso do *GenBank* (NCBI), da identificação das bandas e do filo a que pertence o micro-organismo.

Etapa/desenvolvimento	Identificação	<i>e-value</i>	Identidade (%)	Acesso/NCBI	Banda	Filo
Jardim Clonal (JD)	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L01	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	80	EU585764.1	L02	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L03	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	90	EU585764.1	L04	Ascomycota
Sombreamento (S)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L05	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L06	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L07	Ascomycota
	<i>Saturnispora</i> sp.	4e ⁻⁰⁹	95	KC832478.1	L08	Ascomycota
	<i>Pichia</i> sp.	2e ⁻¹²	79	AM397860.1	L09	Ascomycota
	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L10	Ascomycota
Saída da Sombreamento (SS)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L11	Ascomycota
	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L12	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	90	FJ485705.1	L13	Ascomycota
	<i>Malassezia obtusa</i>	6e ⁻⁹⁶	91	EU192365.1	B18	Basidiomycota
	<i>Bensingtonia ingoldii</i>	2e ⁻¹⁰⁶	93	D38234.1	B19	Basidiomycota
Expedição (EP)	<i>Nilaparvata lugens</i>	2e ⁻¹³	79	AF267236.1	L14	Ascomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B23	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B24	Basidiomycota
Campo (C)	<i>Saccharomycete</i> sp.	4e ⁻¹⁰	98	EU585764.1	L15	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L16	Ascomycota
	<i>Candida Tropicalis</i>	8e ⁻¹¹	80	FJ485705.1	L17	Ascomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B28	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	9e ⁻¹³³	99	AB073272.1	B31	Basidiomycota
	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	8e ⁻¹³⁸	99	AB073272.1	B32	Basidiomycota
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9e ⁻¹²⁹	98	AB746215.1	B37	Basidiomycota

Entre os Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Pedospaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. A UTO B10 agrupou com os dois fungos do gênero *Diplomitoporus*, a B17 agrupou com as espécies *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com *Cortinarius*, todos confirmados como Basidiomycota com altos *bootstraps* (Figura 7).

A amplificação e análise de sequências do gene rRNA 18S e 26S revelou que as UTOs estão relacionadas a leveduras pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota, com agrupamentos de alta sustentação filogenética (Figura 8). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram altos *bootstraps* com valores de 99 e 100. Os melhores agrupamentos formados entre os Basidiomycota foram os das bandas 23 e 28, com as espécies *Rhodosporidium toruloides* e *Rhodotorula glutinis* e as do gênero *Aureobasidium* (Figura 8). As leveduras ascomicéticas, por sua vez, mostraram agrupamentos fortes entre si, com os altos *bootstraps* dos nós mais externos, confirmando a proximidade filogenética entre elas e as do banco de dados NCBI (Figura 8).

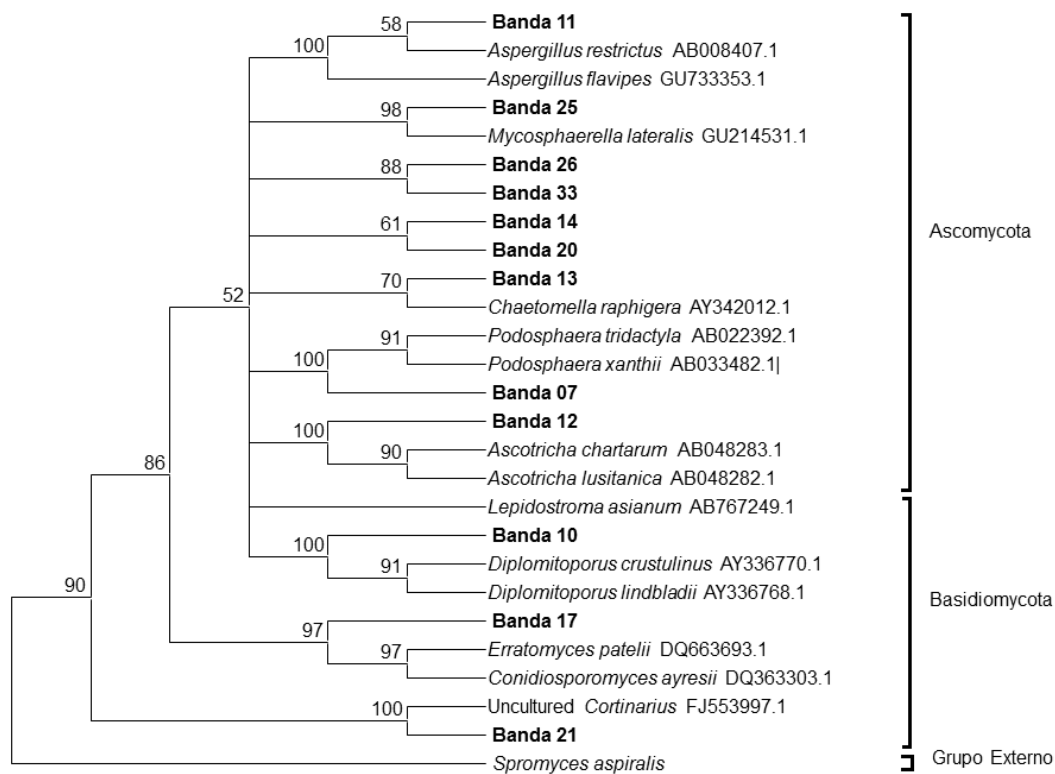


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências do gene rRNA 18S de fungos encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces aspiralis* foi utilizado como grupo externo.

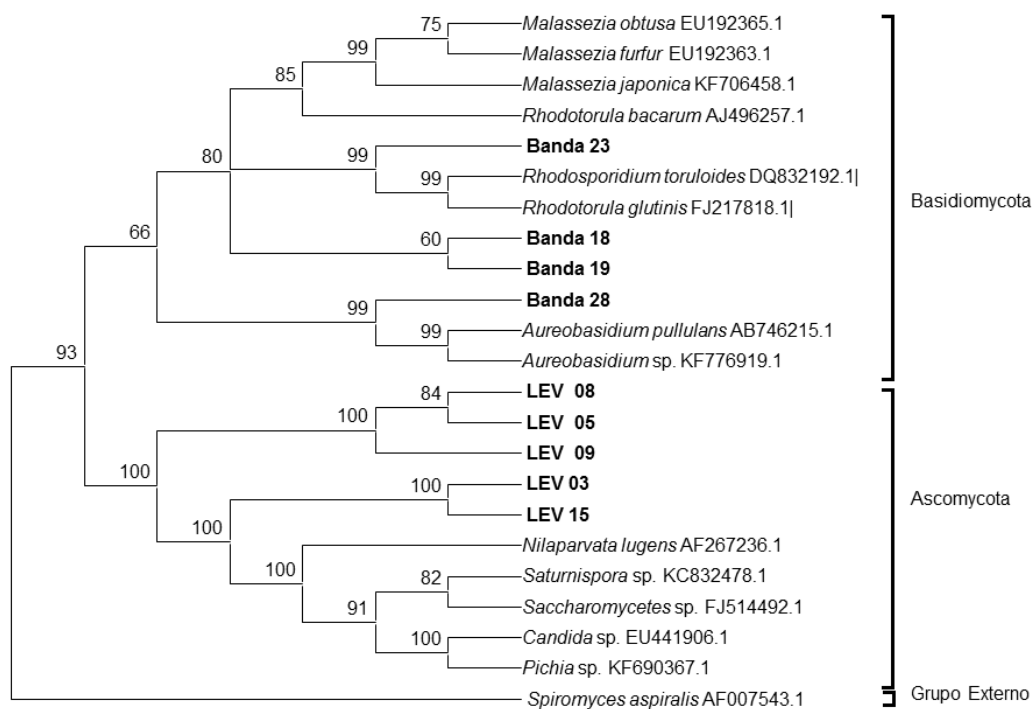


Figura 8: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining*, utilizando sequências dos genes rRNA 18S e 26S de leveduras encontrados em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. *Bootstraps* acima de 50% são mostrados, e *Spiromyces spiralis* foi utilizado como grupo externo.

DISCUSSÃO

A diversidade de fungos e de leveduras endofíticos acessada por DGGE mostrou a presença de UTOs mais e menos intensas no gel, representando populações com abundância distinta (Figuras 1 e 2). Essa técnica é a escolha para avaliação da diversidade microbiana em vários ambientes (BRESOLIN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; KITTELMANN *et al.*, 2012), o que inclui as folhas de eucalipto (Figura 1 e 2). Essa análise mostrou-se mais robusta quando realizada em conjunto com a abordagem Nested-PCR (Figuras 1 e 2) e permite a análise de comunidades microbianas complexas (OLIVEIRA *et al.*, 2013), proporcionando boa resolução de populações menos abundantes.

Nested-PCR-DGGE mostrou ser eficiente em diferenciar a estrutura das comunidades de fungos filamentosos e de leveduras endofíticos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figuras 1 e 2). As mudanças foram mais acentuadas na composição da comunidade de leveduras pela formação de clados mais distintos, com UTOs mais similares em um mesmo agrupamento (Figuras 1 e 2). Essas UTOs, em sua maioria, são compartilhadas entre todas as fases de desenvolvimento (8 e 10). Entretanto, mesmo sendo poucas, as UTOs específicas refletem as diferenças na estrutura das comunidades de fungos e de leveduras (Figura 3) e demonstram que essas comunidades são modeladas pelo desenvolvimento da planta, fato mais acentuado em leveduras (Figura 3).

Enquanto a comunidade de fungos endofíticos não apresenta diferenças significativas na diversidade e na riqueza (Figura 4), a de leveduras mostrou as melhores médias desses índices nas plantas em expedição (Figura 5). Leveduras apresentam sistema de transporte de glicose altamente regulado, podendo absorver eficazmente a glicose em várias concentrações, pela presença de transportadores de alta e baixa afinidade (BARNETT, 2008). Tal fato pode explicar os maiores índices de diversidade e riqueza encontrados (Figura 5). Os valores de riqueza e de diversidade encontrados nesse estudo estão entre aqueles mais comumente encontrados na literatura, entre 1,5 a 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). Mesmo não existindo diferenças significativas nos índices de diversidade e riqueza de espécies de fungos (Figura 4), observou-se a existência de padrões distintos de colonização desses micro-organismos nas diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto (Figura 3 e Tabela 2).

A Comunidade de fungos endofíticos em eucalipto é composta por vários gêneros ao longo das etapas estudadas (Tabela 2), e a de leveduras, por menor quantidade de gêneros e espécies (Tabela 3). Portanto, as folhas dessa planta são

habitat que suportam maior comunidade de fungos em relação à de leveduras. Entretanto, ambas sofrem alterações significativas ao longo do desenvolvimento da planta. Representantes da família Myrtaceae são considerados fonte importante de biodiversidade de fungos, sendo que a maior parte desses fungos está associado às folhas de *Corymbia*, *Eucalyptus* e *Syzygium* spp. (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). As espécies fúngicas em associação com eucalipto relatadas no presente trabalho (Tabela 2) são distintas daquelas descritas na Austrália, Nova Zelândia, Madagáscar e Tailândia (CHEEWANGKOON *et al.*, 2009). Isso indica que essa interação planta-micro-organismo é dependente da espécie de planta em associação, da área de cultivo e da idade da planta associada.

A interação fungo endofítico-planta foi também relatada em outras famílias de plantas como Malvaceae, Cecropiaceae, Lauraceae, Fabaceae, Lecythidaceae e Celastraceae (CANNON & SIMMONS, 2002). Especificamente, no caso de eucalipto, a maioria dos trabalhos publicados até o momento priorizaram os métodos dependentes de cultivo (LUPO *et al.*, 2001; CHEEWANGKOON *et al.*, 2009; KHARWAR *et al.*, 2010), os quais subestimam a diversidade e abundância desses micro-organismos. Esse é o primeiro relato da presença de leveduras endofíticas em eucalipto.

O grande número de UTOs obtidas pelas sequências analisadas por sequenciamento do rRNA 18S e 26S pode ser considerado como indicativo de alto nível de riqueza e diversidade microbiana, considerando-se que o estudo foi realizado com uma única espécie de planta. As fases em expedição e a campo foram as que apresentaram o maior número de fungos e de leveduras distintos (Tabelas 2 e 3). Açúcares solúveis simples, como a glicose e a frutose, podem funcionar como fonte principal de carbono para fungos simbiotes de plantas (BAGO *et al.*, 2000; CHAMBERGO *et al.*, 2002). Além disso, os micro-organismos associados às plantas podem apresentar via metabólica que facilita a absorção e a quebra da sacarose, sendo essa característica vantagem evolutiva e competitiva. A presença de invertases foi descrita em diversos filos fúngicos. As espécies endofíticas apresentam, em geral, diferentes estratégias nutricionais visando à degradação da sacarose (DOIDY *et al.*, 2012).

A maior predominância de algumas espécies de fungos e de leveduras endofíticas na expedição e no campo (Tabelas 2 e 3) pode ser atribuída ao fato de que, nessas etapas, em plantas tropicais, as folhas apresentam concentrações menores de substâncias químicas de defesa, fato que pode permitir maior crescimento desses micro-organismos (ARNOLD *et al.*, 2003).

Outro fator que afeta o crescimento de fungos e contribui para diferenças na densidade e, conseqüentemente, na diversidade microbiana avaliada (Figuras 4 e 5) é a umidade, uma vez que o conteúdo de água próximo à saturação pode afetar a entrada e o crescimento fúngico na planta (RAYNER & BODDY, 1986). As folhas provenientes do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento foram irrigadas diariamente, de acordo com os padrões de umidade apresentados na região, diferente do que ocorreram com as plantas em expedição e a campo, dependentes da precipitação pluviométrica. Esse fato também pode explicar as diferenças na prevalência e frequência de fungos e leveduras nas fases de desenvolvimento do eucalipto.

Ascomycota foi o filo predominante entre as espécies de fungos e leveduras em eucalipto (Tabelas 2 e 3). Entre os fungos endofíticos, *Teratosphaeria acidotherma* e *Cladosporium sp.* e as leveduras do gênero *Candida* e *Nilaparvata* (Figura 9) foram encontrados em mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto (Tabela 2). O predomínio de leveduras do filo Ascomycota pode ser reflexo da adaptação desses micro-organismos às folhas como micro-habitat que favorece o crescimento de espécies fermentativas (POZO et al 2011). Fungos do gênero *Teratosphaeria* foram encontrados em folhas com sintomas de MLD (doença das manchas da folha) em eucalipto na Austrália (ANDJIC et al., 2010). Entretanto, neste estudo, *Teratosphaeria acidotherma* e *Teratosphaeria toledana* (Tabela 2) foram extraídas de folhas saudáveis de eucalipto. Essa observação evidencia que certos micro-organismos podem ser endofíticos em uma planta e patógenos em outras (SAIKKONEN et al. 2004). A diferença entre o estágio endofítico e patogênico pode ser devido a fatores abióticos ou à idade da planta (SAIKKONEN et al., 2004; PORRAS-ALFARO et al., 2011).

Os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* estavam presentes em folhas de plantas provenientes de mais de uma etapa de produção de mudas (Tabelas 2 e 3). Esse comportamento mais generalista indica capacidade de adaptação a condições nutricionais e ambientais distintas. O fungo *Cladosporium sp.* e a levedura *Rhodosporidium fluviale* colonizam e persistem na folhas nas etapas de expedição e campo; já o gênero *Candida* está presente em folhas de plantas do jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento. Esse comportamento indica que elas possuem informações genéticas para colonizar e persistir em folhas de eucalipto em mais de uma etapa de desenvolvimento dessa planta, sugerindo que sejam micro-organismos endofíticos competentes (HARDOIM et al., 2008), com

papéis relevantes na fisiologia da planta.

Os fungos e as leveduras podem beneficiar as plantas, aumentando a tolerância das mesmas a fatores bióticos e abióticos, melhorando o crescimento e a sobrevivência em condições adversas, competindo com patógenos (HUBBARD *et al.*, 2014) e produzindo ampla variedade de reguladores de crescimento, a exemplo das giberelinas (GAs), do ácido abscísico (ABA) e das auxinas (IAA) (YOU *et al.*, 2012). *Candida tropicalis* já foi relatada como tendo capacidade de promoção de crescimento em arroz por meio de alta atividade da ACC deaminase, da produção de ácido indol acético (AIA) e de poliaminas (AMPRAYN *et al.*, 2012). Plantas em estresse produzem altas concentrações de etileno, inibindo o crescimento (GLICK *et al.*, 2007). A ACC deaminase é a enzima responsável pela quebra do precursor do etileno, o aminociclopropano-1-carboxilato – ACC, em amônia e alfa-cetoglutarato. Micro-organismos produtores de ACC-deaminase diminuem os níveis de etileno pelo consumo dos subprodutos da quebra do precursor, ACC, promovendo, ainda, o crescimento vegetal pela síntese de AIA (GLICK, 2014).

Muitas das espécies de fungos filamentosos e leveduras são específicas de algumas fases de desenvolvimento do eucalipto. Os fungos *Diplomitoporus crustulinus*, *Podosphaera tridactyla* e *Aspergillus restrictus* são específicos do jardim clonal, *Chaetomella acutiseta* e *Ascotricha chartarum* do sombreamento, *Erratomyces patelii* e *Saxomyces* sp. das planta recém-saídas do sombreamento, *Lepidostroma* sp. e *Mycosphaerella lateralis* da expedição e *M. populicola* do campo (Tabela 2). As leveduras *Saturnispora* sp. e *Malassezia* estavam presentes apenas nas plantas em sombreamento e nas recém-saídas do sombreamento, respectivamente.

A análise filogenética das sequências de 18 e 26S rDNA confirmou que a comunidade de fungos e leveduras endofíticos, presente nas folhas de eucalipto em diferentes etapas de desenvolvimento, está incluída nos filos Basidiomycota e Ascomycota, pela formação de clados distintos, com altos *bootstraps* (Figura 7). A maioria dos agrupamentos formados apresentaram valores de *bootstrap* entre moderados e fortes (SCHNEIDER, 2007), os quais sustentam a análise filogenética (Figura 7).

Entre os fungos pertencentes à Ascomycota, os melhores agrupamentos foram os das UTOs B07 com fungos do gênero *Podosphaera*, B12 com *Ascotricha* e B25 com *Mycosphaerella lateralis*. Esses agrupamentos com altos *bootstraps* demonstram que essas UTOs pertencem a esses gêneros ou espécies, confirmando a comparação com as sequências encontradas no BLASTn. Já entre

os Basidiomycota, os melhores agrupamentos foram o da UTO B10 com dois fungos pertencentes ao gênero *Diplomitoporus*, a B17 com *Erratomyces patelli* e *Conidiosporomyces ayresii* e B21 com o gênero *Cortinarius*, todos com altos *bootstraps* (Figura 7).

Fungos do gênero *Mycosphaerella* são frequentemente relatados como habitantes da parte aérea das plantas, com algumas de suas espécies hospedeiro-específicas (MAXWELL *et al.*, 2005). *Mycosphaerella lateralis* já foi demonstrada em interação patogênica com eucalipto na Austrália, formando lesões necróticas nas folhas (MAXWELL *et al.*, 2000). No presente estudo, entretanto, esse fungo foi identificado em folhas assintomáticas. Tal fato pode indicar que a interação seja dependente da espécie de planta, da área de cultivo, da idade da planta ou de mecanismos de reconhecimento planta-hospedeiro que podem determinar o comportamento fúngico como patogênico ou endofítico (SAIKKONEN *et al.*, 2004; PORRAS-ALFARO *et al.*, 2011).

A levedura cosmoploita *Aureobasidium pullulans* já foi identificada em várias plantas, sendo considerada como potencial agente de controle biológico de patógenos (ANDREWS *et al.*, 1994). Neste estudo, essa levedura é relatada como endofítica de eucalipto (Figura 8) em plantas de 18 meses de idade, mas não nas demais fases de desenvolvimento (Tabela 3).

Ampla variedade de fungos e leveduras endofíticos foi encontrada em eucalipto nas diferentes fases de desenvolvimento da planta durante a produção de mudas em viveiro. A diversidade microbiana levantada neste trabalho sugere significativa importância dos micro-organismos endofíticos nos sistemas de produção de mudas em escala comercial, abrindo novas avenidas para a elucidação do papel de micro-organismos associativos e simbióticos na nutrição vegetal e na adaptação da planta ao meio.

CONCLUSÕES

A excisão, eluição e sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostrou ser boa técnica para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto.

Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto. Essa comunidade é representada por 15 espécies e dois gêneros de fungos filamentosos e duas espécies e sete gêneros de leveduras, em plantas de diferentes fases de desenvolvimento.

A relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a levedura e eucalipto, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto. Entretanto, os fungos *Teratosphaeria toledana* e *Teratosphaeria acidotherma* e as leveduras dos gêneros *Candida* e *Nilaparvata* foram capazes de colonizar mais de uma fase de desenvolvimento do eucalipto. Já o fungo *Cladosporium* sp. e a levedura *Rhodospiridium fluviale* são persistentes nas etapas de expedição e campo, e o gênero *Candida*, no jardim clonal, sombreamento e recém-saídas do sombreamento.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.
- AMPRAYN, K. O., ROSE, M. T., KECSKÉS, M., PEREG, L., NGUYEN, H. T & KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis*) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.
- ANDJIC, V., WHYTE, G., HARDY, G & BURGESS, T. New *Teratosphaeria* species occurring on eucalypts in Australia. **Fungal Diversity**, v. 43, p. 27-38, 2010.
- ANDREWS, J. H., HARRIS, R. F., SPEAR, R. N., LAU, G. W & NORDHEIM, E. V. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 40, p. 6-17, 1994.
- ARNOLD, A. E. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. **Current Trends in Mycological Research** (S. Deshmukh, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68, 2005.
- ARNOLD, A. E & HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.
- ARNOLD, A. E & LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, p. 541-549, 2007.
- ARNOLD, A. E., MAYNARD, Z., GILBERT, G. S., COLEY, P. D & KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.
- BAGO, B., PFEFFER, P. E & SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.124, p. 949-958, 2000.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. **Yeast**, v. 25, p. 689-731, 2008.

- BRESOLIN, J. D., BUSTAMANTE, M. M. C., KRÜGER, R. H., SILVA, M. R. S. S & PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 391-403, 2010.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**. v. 13, p. 79-148, 2000.
- BRUNDRETT, M. C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editors. **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. 281–293, 2006.
- CANNON, P. F & SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**. v. 94, p. 210-220, 2002.
- CHAMBERGO, F. S., BONACCORSI, E. D., FERREIRA, A. J., RAMOS, A. S., FERREIRA, J. R., ABRAHAO-NETO, J., FARAH, J. P & DORRY, EL- H. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 13983-13988, 2002.
- CHEEWANGKOON, R., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., HYDE, K. D., TO-ANUN, C., & CROUS, P. W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. **Persoonia**, v. 23, p. 55-85, 2009.
- COCOLIN, L., BISSON, L & MILLS, D. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 81–87, 2000.
- DOIDY, J., GRACE, E., KÜHN, C., SIMON-PLAS, F., CASIERI, L & WIPF, D. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. **Trends in Plant Science**. v. 17, p. 413-422, 2012.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable Forest Management.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, p. 30-39, 2014.
- GLICK, B. R., CHENG, Z., CZARNY, J & DUAN, J. **Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria**. In New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research (pp. 329-339). Springer Netherlands, 2007.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T & RYAN, P.D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.

- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16 n.10, p. 463-471, 2008.
- HUBBARD, M., GERMIDA, J. J & VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology*, v. 116, n.1, p. 109-122, 2014.
- KEMLER, M., GARNAS, J., WINGFIELD, M. J., GRYZENHOUT, M., PILLAY, K. A & SLIPPERS, B. Ion torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PloS One**, v. 8, p. e81718, 2013.
- KHARWAR, R. N., GOND, S. K., KUMAR, A & MISHRA, A. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1941-1948, 2010.
- KITTELMANN, S., NAYLOR, G. E., KOOLAARD, J. P & JANSSEN, P. H. A proposed taxonomy of anaerobic fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1-13, 2012.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p. .
- LISEC, J., SCHAUER, N., KOPKA, J., WILLMITZER, L & FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387–396, 2006.
- LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E. H & HYDE, K. D: Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. **Canadian Journal Microbiol**, v. 48, p. 1109-1112, 2002.
- LUPO, S., TISCORNIA, S & BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, 38-41, 2001.
- MASOUD, W., BJØRG CESAR, L., JESPERSEN, L & JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East África determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**. v. 21, p. 549-556, 2004.
- MAXWELL, A., HARDY, G. E. STJ., WINGFIELD, M. J. & DELL, B. First record of *Mycosphaerella lateralis* on *Eucalyptus* in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 29, p. 279, 2000.
- MAXWELL, A., JACKSON, S. L., DELL, B., & HARDY, G. E. S. J. PCR-identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. **Mycological Research**, v. 109, p. 992-1004, 2005.

- MAY L. A., SMILEY B & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 829-841, 2001.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594, 2013.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- OMACINI, M., CHANETON, E. J., GHERSA, C. M & MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, v. 409, 78–81, 2001.
- OROS-SICHLER, M., GOMES, N. C. M., NEUBER, G & SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 63–75, 2006.
- PORRAS-ALFARO, A & BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.
- POZO, M. I., HERRERA, C. M & BAZAGA, P. Species richness of yeast communities in floral nectar of southern Spanish plants. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 82-91, 2011.
- PRAKITCHAIWATTANA, C. J., FLEET, G. H & HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, v.4, p. 865–877, 2004.
- RAYNER, A. D. M & BODDY, L. Population structure and the infection biology of wood-decay fungi in living trees. **Advance Plant Pathology**, v. 5, p. 119–160, 1986.
- ROBL, D., DA DELABONA, P., MERGEL, C. M., ROJAS, J. D., DOS COSTA, P., PIMENTEL, I. C & PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- SAIKKONEN, K., WALI, P., HELANDER, M & TAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 275-280, 2004.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.

- SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S., BILLS, G. F & ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal species diversity in juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus* from plantations affected by *Mycosphaerella* leaf disease. **Annals of Applied Biology**, v. 158, p. 177-187, 2011.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- VAINIO E. J & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.
- WHIPPS, J. M., HAND, P., PINK, D & BENDING, G. D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 1744-1755, 2008.
- YOU, Y. H., KANG, S. M., CHOO, Y. S & LEE, J. M. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1549-1556, 2012.

CAPÍTULO 4

DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DO EUCALIPTO

RESUMO

As associações de plantas com bactérias endofíticas contribuem significativamente para a fitossanidade e produtividade das culturas. Bactérias endofíticas adaptaram-se à vida no interior dos tecidos vegetais, podendo contribuir positivamente para processos-chave para nutrição das culturas, a exemplo da fixação biológica de nitrogênio. O *Eucalyptus* é um dos gêneros de plantas mais cultivados e valorizados economicamente no mundo. A caracterização da comunidade microbiana associada às espécies deste gênero pode proporcionar novas ferramentas biotecnológicas para o cultivo sustentável e mais econômico dessas plantas. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, incluindo os grupos com potencial para fixação de N associados às folhas dessa planta. A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica foi acessada por PCR-DGGE, isolamento e sequenciamento do gene rRNA 16S. Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma-) e Actinobacteria foram identificados na comunidade investigada. Nessa comunidade, esse é o primeiro relato das espécies *Novosphingobium barchamii*, *Rhizobium grahami*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* e *Terrabacter lappili* como endofíticas. A diversidade variou entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, sendo Proteobacteria o filo mais representativo em folhas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento, e Firmicutes no campo. A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou ser distinta e específica para as fases de desenvolvimento em estudo, com muitas espécies encontradas apresentando potencial para fixação de nitrogênio.

Palavras-chave: diversidade, bactérias endofíticas, DGGE, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

Eucalyptus é um dos gêneros de planta mais cultivados em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, pelo rápido crescimento, adaptabilidade e valor comercial da madeira produzida (BROOKER, 2000). O rápido crescimento do eucalipto demanda alta disponibilidade de nutrientes, especialmente nitrogênio (SMETHURST *et al.*, 2004). Esse elemento pode ser obtido pela fixação biológica, realizada por bactérias de vida livre e por endofíticas (SUMMAN *et al.*, 2005; REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). O estudo da comunidade microbiana do eucalipto pode proporcionar melhor panorama das interações planta-micro-organismo, permitindo ampliar o entendimento da contribuição da microbiota associada para a nutrição florestal.

A parte aérea de várias plantas abriga ampla diversidade de micro-organismos, especialmente bactérias e fungos, com grande importância ecológica (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Essa diversidade tem sido alvo de vários estudos que revelam a presença de bactérias em diferentes órgãos do hospedeiro, influenciando sua sanidade e desenvolvimento (BRADER *et al.*, 2015). Micro-organismos endofíticos adaptam-se a ambientes específicos do corpo da planta e, ao colonizá-los (BULGARELLI *et al.*, 2013), podem estimular o crescimento vegetal por meio da fixação de nitrogênio (SUMMAN *et al.*, 2005), pela síntese de auxinas e seus análogos e pela síntese de giberelinas (WAQAS *et al.*, 2012). A interação eucalipto-bactérias endofíticas é pobremente documentada, sendo a maioria das pesquisas focada nos micro-organismos associados às raízes (BONITO *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2014).

A diversidade microbiana tem sido acessada em diversas plantas agronomicamente importantes pela utilização da análise molecular das comunidades microbianas por meio de métodos dependentes (MIGUEL *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2013; SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) e independentes de cultivo (WEST *et al.* 2010; JACKSON *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Apesar da existência de trabalhos envolvendo a diversidade de bactérias em *Eucalyptus* spp. (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010), da importância das endofíticas como parte da comunidade microbiana dessas plantas (BRADER *et al.*, 2015) e do Brasil ser o maior produtor mundial dessa essência florestal, pouco se conhece sobre a microbiota endofítica associada ao eucalipto. Variações na estrutura dessa comunidade em função da idade da planta e das fases de desenvolvimento em viveiros comerciais são totalmente desconhecidas. Da mesma forma, a diversidade de bactérias com potencial de fixação de nitrogênio

sob essas mesmas condições necessita ainda ser caracterizada.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas, incluindo aquelas com potencial de fixação de nitrogênio, em associação com folhas de plantas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento em viveiros comerciais e em campo, combinando métodos dependentes e independentes de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Esse estudo foi realizado utilizando-se mudas de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”) em diferentes fases de desenvolvimento, em viveiros e áreas de campo, pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), Belo Oriente, Minas Gerais, Brasil. As fases de desenvolvimento das plantas estudadas foram jardim clonal (JD – produção de brotos por miniestaquia), em sombreamento (S – seis dias em casa de vegetação recebendo 50% de radiação), recém-saídas do sombreamento (SS – primeira seleção com a exclusão de plantas indesejáveis), expedição (EP - etapa anterior ao preparo para plantio com plantas com mesmo padrão de tamanho, pares de folhas e livres de doenças) e campo (plantas com 18 meses de idade). Amostras de folhas de todas as etapas foram coletadas em quatro repetições.

As plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e expedição foram crescidas em substrato composto basicamente por palha de arroz carbonizada e vermiculita. A fertilização das plantas foi realizada utilizando-se superfosfato simples e solução nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1: Fontes, doses e forma de aplicação da adubação de substrato

Fertilizantes	Doses* (kg/m ³)	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	7,00	Direta
Sulfato de Amônio	0,417	Via Solução
Cloreto de Potássio	0,208	Via Solução
Sulfato de Zinco	0,014	Via Solução
Sulfato de Cobre	0,014	Via Solução
Sulfato de Manganês	0,014	Via Solução
Ácido Bórico	0,021	Via Solução

Fonte: CENIBRA, 2015.

A área de estudo em campo foi a floresta plantada com o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (eucalipto “urograndis”), situada no município de Guanhães, Minas Gerais, Brasil, pertencente à Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). A vegetação natural dessa área era de floresta estacional semidecidual, que foi substituída por pastagens, estando em seu primeiro plantio com eucalipto. O histórico de produtividade do clone em estudo é de 340 m³ ha⁻¹/rotação de seis anos. A idade das plantas à época da coleta era de 18 meses de idade.

A latitude da região é 19° 24' 54”, a longitude 42° 25' 56” e a altitude 318 metros. O solo da área de estudo é altamente intemperizado, com relevo movimentado, de ondulado a fortemente ondulado, sendo a classe mais representativa o latossolo vermelho ácrico típico, textura argilosa, a proeminente ou moderado, álico, caulínítico ou caulínítico-oxídico ou gibbsítico-oxídico, hipoférrico ou mesoférrico.

O clima Cwa é mesotérmico pela classificação de Köppen (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e chuva no verão. As médias de temperaturas máxima, média e mínima em 2014 foram de 23,5; 19,5 e 15,5°C, respectivamente, a umidade relativa de 74% e a precipitação e o déficit hídrico de 56,39 e 8,38 mm, respectivamente (CENIBRA, estação climatológica Gaspar).

As amostras das folhas de eucalipto foram coletadas ao acaso em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo (plantas com 18 meses de idade), em quatro repetições. A coleta aleatória das folhas em campo consistiu em amostras de folhas que compreendiam toda a planta. O material foliar coletado foi transferido para sacos plásticos, armazenado em gelo, transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e estocado em freezer a -20 °C. Esse material foi armazenado por 15 dias, até o processamento para análises de diversidade de fungos filamentosos e de leveduras, utilizando metodologia independente de cultivo e quantificação de açúcares.

Descontaminação superficial das folhas

A descontaminação superficial de oito folhas sadias provenientes de cada terço da copa das árvores amostradas foi iniciada após serem previamente lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida, o material foi imerso duas vezes em água destilada e tampão fosfato (0,05 mmol.L⁻¹), com pH 7, imerso em etanol 70% (v/v) durante 1 min e mantido por 5 min em recipiente contendo hipoclorito de

sódio (5%) + 0,05% (v/v) de tween 80, e rapidamente imerso em etanol 70% (v/v) antes de nova imersão em hipoclorito + tween 80 durante 15 min. Esse processo foi repetido uma vez. Finalmente, as folhas foram colocadas em água destilada esterilizada, individualizadas em tubos contendo 10 mL do meio de cultura R2A (REASONER AND GELRDREICH, 1985) e incubadas na temperatura de 28°C por 72 horas. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-R2A, sendo as placas incubadas a 28°C por 72 horas, para se comprovar a ausência de crescimento microbiano.

Extração de DNA metagenômico das folhas

O procedimento para a extração de DNA de oito folhas de cada uma das fases de desenvolvimento das plantas foi realizado após a maceração em nitrogênio líquido. O material foliar macerado foi transferido para tubos de 2 mL; após, ressuspensionado e mantido em 1000 µL de tampão de extração - [(4% (m/v) brometo de etil metil amônio (CTAB), 1,4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 e 1% (m/v) polivinilpirrolidona) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoethanol]. Adicionalmente, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 min, com agitação em intervalos constantes. Subsequentemente, seguiu-se a adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 30 µg de proteinase K (sigma) antes de nova incubação em banho-maria por cerca de 40 min, com agitação em intervalos constantes. A mistura foi submetida duas vezes a desproteinização usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após a incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 13000g por 10 min, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado misturando-se o sobrenadante a 50 µL de acetado de amônio 7,5 M a -20°C por 30 min e a mistura centrifugada por 10 min a 7500g. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e etanol absoluto (Sigma) e ressuspensionado *overnight* em 100 µL de água mili-Q esterilizada após secagem em cabine de fluxo laminar. A concentração e a pureza do DNA extraído foram comprovadas por densidade óptica no comprimento de onda 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc). A integridade foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com Gel Red® 1000X, e as imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

Análise da Diversidade de bactérias totais e diazotróficas

A estratégia Nested-PCR foi utilizada para acessar a diversidade de bactérias totais em folhas de eucalipto por DGGE. O DNA total, na primeira PCR, foi utilizado como molde para amplificação do gene rRNA 16S, e, juntamente com primers P027/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005), produziram *amplicons* específicos que serviram de molde para a segunda PCR, com os primers 984GC/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005).

As PCRs foram realizadas em volume final de 25 µL, sendo 5 µL do tampão GoTaq Flex® Reaction Buffer, 200 µM de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 µM dos primers, 20 ng de molde e água desionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 47 °C por 1 min, extensão por 2 min a 72 °C e extensão final durante 10 min a 72 °C.

O acesso à diversidade de bactérias potencialmente fixadoras de N em folhas de eucalipto foi obtido por PCR em duas reações: uma utilizando os primers polF/polR (POLY *et al.*, 2001) e outra substituindo polF por polFGC. As reações foram realizadas em volume de 50 µL contendo tampão 1X, 1.5mM MgCl₂, 0.12mM of dNTPs, 0.3 µM de cada *primer*, 1U Taq polymerase e 10 ng molde, submetidos a desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 0,5 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min e extensão final de 72 °C por 10 min. (MAPELLI *et al.*, 2013).

Os *amplicons* resultantes das amostras de folhas obtidos após as PCRs foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Uma mistura de DNA das culturas puras de *Nocardioides thermo- lilacinus*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* foi utilizada como marcador externo para facilitar a normalização dos géis no software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (37.5:1, acrilamida – N,N=–metilenobisacrilamida) (Sigma) em gel de gradiente desnaturante utilizando como tampão TAE 1X (40 mmol·L⁻¹ Tris–HCl, pH 8.0, 20 mmol·L⁻¹ ácido acético, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8), 0,09% (v/v) TEMED (N,N,N=,N=–tetrametilenodiamina) e 0,07% (m/v) persulfato de amônio. O gradiente desnaturante foi otimizado a 40%–60% ureia/formamida (100% desnaturante contém 7 mol·L⁻¹ ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em

tampão TAE 1X a 60V durante 20 horas em temperatura constante de 60°C. Os fragmentos de DNA no gel foram corados durante 20 min em tampão TAE 1X contendo o corante SYBR Gold® 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e as imagens dos géis obtidas por luz UV utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o software *Bionumerics*® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de bactérias totais e fixadoras foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1), e ausência como zero (0). A estrutura dessas comunidades foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER *et al.*, 2001), a diversidade, estimada pelo índice de Shannon-Winner, e os gráficos, confeccionados pelo software sigmaplot (Systat Software, Inc. 2008). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Minitab versão 15 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Isolamento de bactérias endofíticas

As folhas desinfestadas de cada uma das fases de desenvolvimento do eucalipto foram utilizadas para estabelecer a densidade de bactérias cultiváveis por folha ([UFC] folha⁻¹). As folhas foram individualmente trituradas em homogeneizador em tubos contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7). A suspensão foi, então, filtrada em gaze esterilizada, e o filtrado diluído seriadamente em tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7.0). Alíquotas de 100 µL foram espalhadas em meio sólido R2A e incubadas a 28°C por 72 horas.

Extração de DNA de culturas puras

O DNA total das culturas puras crescidas em meio R2A líquido foi extraído utilizando o Kit de purificação de DNA (Promega™, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. A integridade e a quantidade de DNA extraído foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corados com Gel Red® 1000X, e as imagens obtidas utilizando Molecular Imaging system LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

BOX-PCR

BOX-PCR foi realizado utilizando o primer BOX-A1R (VERSALOVIC *et al.*, 1994) para analisar a diversidade genômica em nível de isolado. A PCR foi preparada em volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão, 3,75 µL de MgCl₂ 25mmol, 0,5 µL de dNTPs 10 mmol, 1,25 µL de DMSO, 1,25 µL de BSA (soro albumina bovina), 0,5 µL oligonucleotídeos iniciadores BOX-A1R (10mM) e 0,25 µL de Taq DNA polymerase (BONIEK *et al.*, 2010), 1 µL de DNA e 15,25 µL de água mili-Q autoclavada. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94° C por 7 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min, extensão por 8 min a 65°C e extensão final durante 16 min a 65°C (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Os *amplicons* obtidos pela PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) a 100V durante 6 horas e corados com Gel Red® 1000X. As imagens foram obtidas utilizando Molecular Imaging System LPIX Chemi (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil). Para determinar a similaridade entre os isolados o gel de agarose contendo os produtos BOX-PCR foi analisado por UPGMA (agrupamento médio entre grupos) software Bionumerics® versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). O dendrograma resultante foi avaliado com base no coeficiente de Jaccard, o qual analisa a similaridade e a distância com base nas bandas obtidas. Isolados com valores de similaridade acima de 90% foram considerados iguais.

Amplificação e sequenciamento do rRNA 16S

Os *primers* universais P27F/1392R (HEUER *et al.*, 1997; BLACKWOOD *et al.*, 2005) foram utilizados para amplificar o gene rRNA 16S dos isolados bacterianos diferenciados por BOX-PCR. A reação foi realizada contendo aproximadamente 20 ng de DNA, tampão (Promega), 2,25 mmol of MgCl₂, 210 mmol de cada *primer*, 250 µM of deoxinucleotídeos (dNTPs), e 0,02 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega). A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf-Germany) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 min, e extensão a 72°C por 1,5 min, com extensão final de 7 min a 72°C. Os *amplicons* foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) e o gel corado com Gel Red® 1000X. Os *amplicons* obtidos por essas reações foram sequenciados pela Macrogen, Inc. Korea e as sequências obtidas comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank*

(NCBI). Para cada sequência bacteriana foi realizada uma busca de identidade com o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as provenientes dos nucleotídeos do banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990). As sequências com identidade acima de 97%, identificadas pela pesquisa foram importadas pelo software Mega 6.0 e alinhadas com outras sequências do gene rRNA 16S utilizando ClustalW. Os alinhamentos foram ajustados manualmente, e o cálculo para análise filogenética baseado no alinhamento dessas sequências foi feito utilizando o Método de *Neighbor Joining*. A distância foi computada pelo método p-distância, e a robustez das árvores resultantes e o nível de significância estatística dos nós interiores foram obtidos por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os *bootstraps* acima de 50% foram demonstrados.

RESULTADOS

A diversidade e a distribuição da comunidade bacteriana endofítica em folhas de plantas de eucalipto provenientes das fases do jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e a campo foram examinadas por DGGE, cultivo em placa e sequenciamento do rRNA 16S. A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e potenciais fixadoras de nitrogênio. Essa abordagem permitiu a identificação de comunidades mais e menos abundantes pela presença de bandas mais e menos intensas nos géis (Figuras 1 e 2). A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes fases de desenvolvimento dessa planta (Figura 2).

O perfil de bandas e a análise de agrupamento mostraram que a comunidade bacteriana endofítica em folhas de eucalipto foi homogênea, com alta similaridade, e as populações mais distintas estão presentes no jardim clonal e no campo. Essas duas fases mostraram a formação de dois grupos distintos, com menor similaridade que os demais (Figura 1). Portanto, a comunidade bacteriana endofítica de eucalipto variou em relação às fases de desenvolvimento dessa

planta.

Em comparação com a comunidade de bactérias endofíticas totais, a de diazotróficos revelou-se mais heterogênea entre as fases de desenvolvimento do eucalipto, pelo menor número de agrupamentos distintos. A comunidade de endofíticas diazotróficas no campo é distinta das outras etapas de desenvolvimento, com valores de similaridade inferiores a 58,3% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelas diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). A DGGE mostrou sensibilidade em detectar diferenças na comunidade endofítica diazotrófica em folhas de eucalipto, sendo o gene *nifH* marcador molecular eficiente para verificar diferenças de forma rápida na diversidade e distribuição de diazotróficas endofíticas em folhas de eucalipto em diferentes fases de desenvolvimento das plantas.

A distribuição de bandas revelou poucas alterações na estrutura da comunidade de bactérias endofíticas ao longo das etapas de desenvolvimento do eucalipto, sendo que a maior parte delas foi ocasionada pelas bactérias diazotróficas (Figura 3). A maioria das UTOs é compartilhada entre as fases de desenvolvimento das plantas para ambas as comunidades. Entretanto, a presença de UTOs específicas é evidente, o que reflete as diferenças na estrutura da comunidade nas folhas provenientes do campo (Figura 3). Essas mudanças demonstraram que as fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram a comunidade de bactérias endofíticas nas condições avaliadas, fato mais evidenciado entre as bactérias diazotróficas.

Os índices de diversidade de Shannon e de riqueza foram calculados para as comunidades de bactérias endofíticas em interação com as folhas de eucalipto. A diversidade e a riqueza de bactérias endofíticas totais foram maiores nas folhas provenientes do campo (Figura 4). De forma distinta, para as bactérias diazotróficas, as maiores médias desses índices foram obtidas para as amostras de folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo (Figura 5). Esses resultados indicam que as fases de desenvolvimento de eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias diazotróficas endofíticas do que a de bactérias totais. As folhas provenientes do jardim clonal e da expedição foram as que mostraram as menores médias de diversidade e de riqueza de bactérias endofíticas diazotróficas (Figura 5).

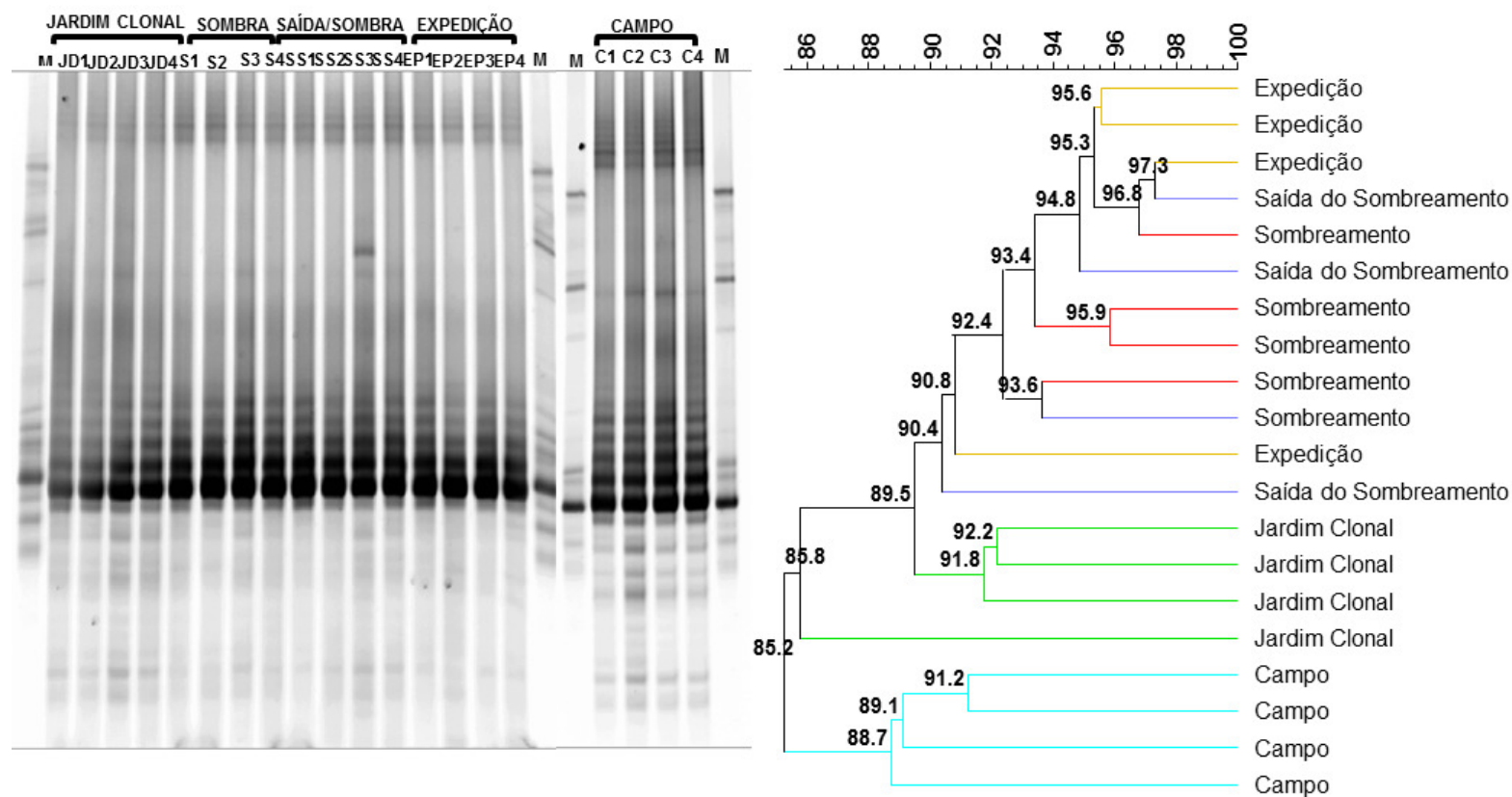


Figura 1: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes rRNA 16S. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene rRNA 16S das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

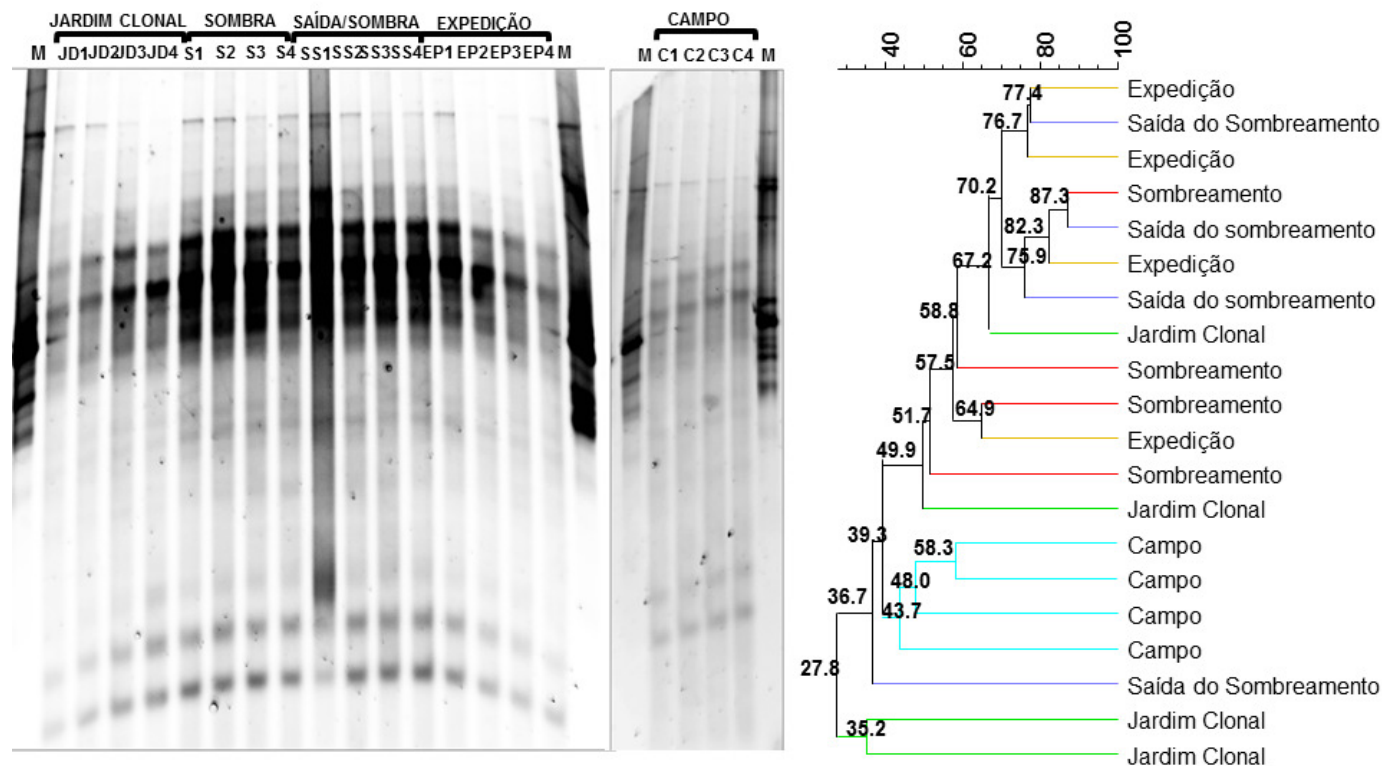


Figura 2: Perfil eletroforético de DGGE da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio em eucalipto. A – Perfil eletroforético a partir da DGGE com genes *nifH*. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém- saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; M: marcador; 1, 2, 3 e 4: Repetições. B – Dendrograma construído a partir da DGGE dos *amplicons* do gene *nifH* das amostras de folhas provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto.

Os isolados com perfil genômico distinto, segundo a técnica de BOX-PCR, e com índices de similaridade inferiores a 90% (dados não publicados) foram identificados por sequenciamento do rRNA 16S e comparados com sequências obtidas pelo algoritmo BLAST (NCBI). O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria (Figura 6). Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto, seja no viveiro ou em campo. As sequências de rRNA 16S obtidas de 32 isolados apresentaram alta identidade com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Entre essas sequências, somente duas, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores de identidade inferiores a 97%. Esses isolados foram identificados apenas em nível de gênero, e os demais, em nível de espécie (Figura 6).

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento das plantas, já que apenas 27% das espécies identificadas foram isoladas em mais de uma etapa, como *Bacillus flexus*, presente desde as folhas do jardim clonal até as do campo (Figura 6). A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S (44%) foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento (35%). A colonização endofítica pelo gênero *Bacillus* em folhas de eucalipto inicia-se no jardim clonal e se estende em etapas subsequentes em que são encontradas as espécies *B. flexus*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Figura 6).

A análise filogenética das sequências de rDNA 16S com identidades acima de 97% confirmou que a comunidade de bactérias endofíticas em folhas provenientes de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto pertencem aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, pela formação de clados distintos com altos *bootstraps* (Figuras 7). Os *bootstraps* apresentados pela maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007) (Figura 7).

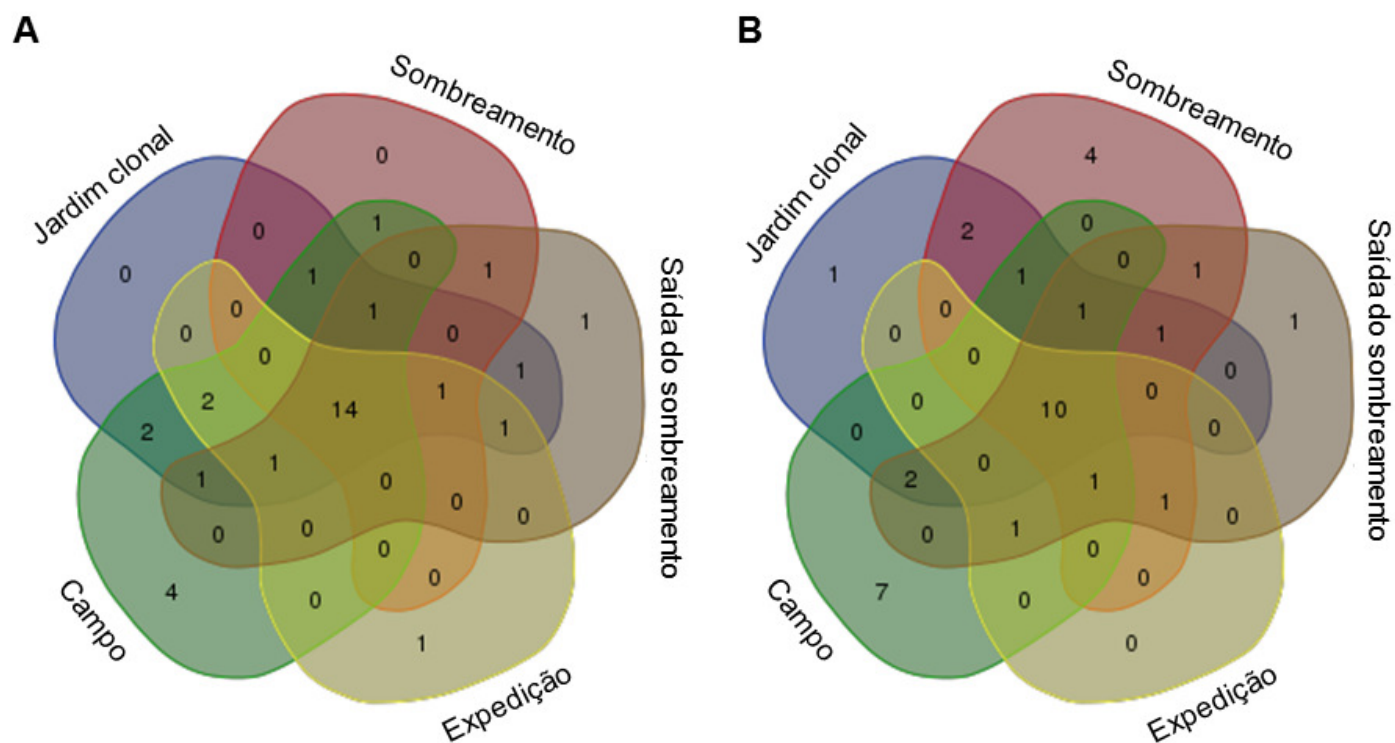


Figura 3: Distribuição de UTOs de bactérias endofíticas totais (A) e potencialmente diazotróficas (B) pelo diagrama de venn em diferentes etapas de desenvolvimento das folhas de eucalipto: jardim clonal, sombreamento, recém-saídas do sombreamento, expedição e campo.

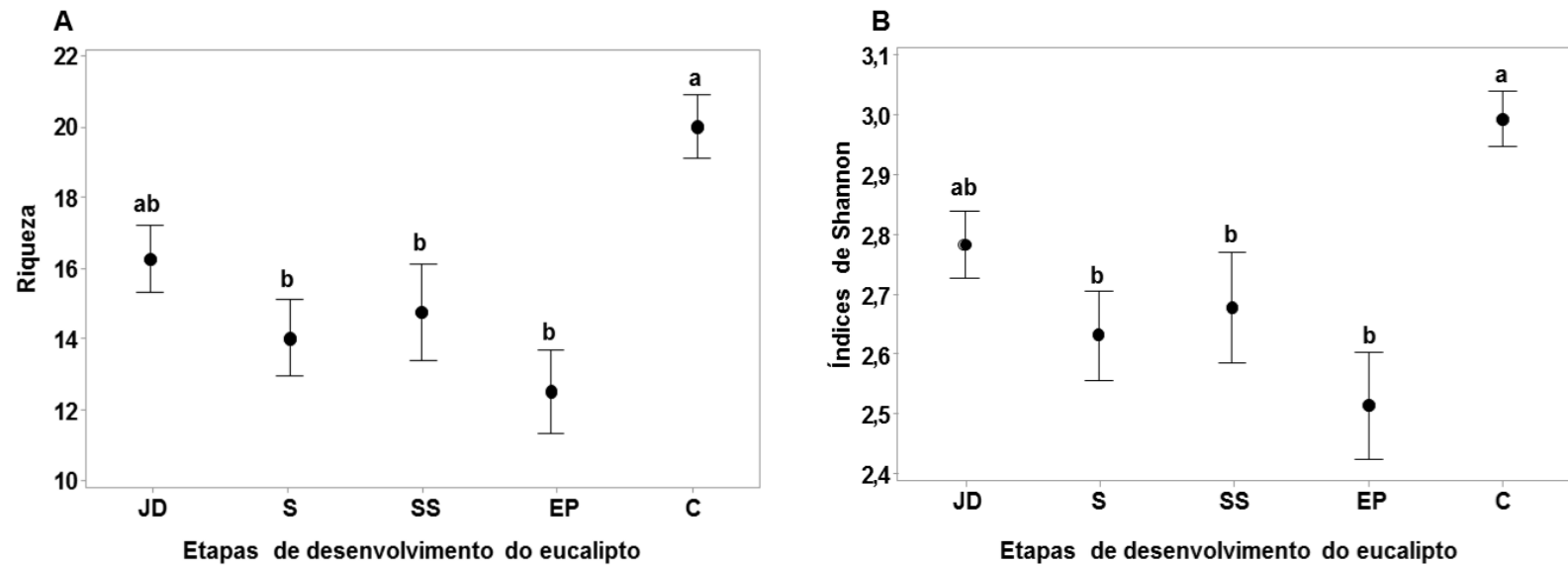


Figura 4: Perfil de Riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas totais provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

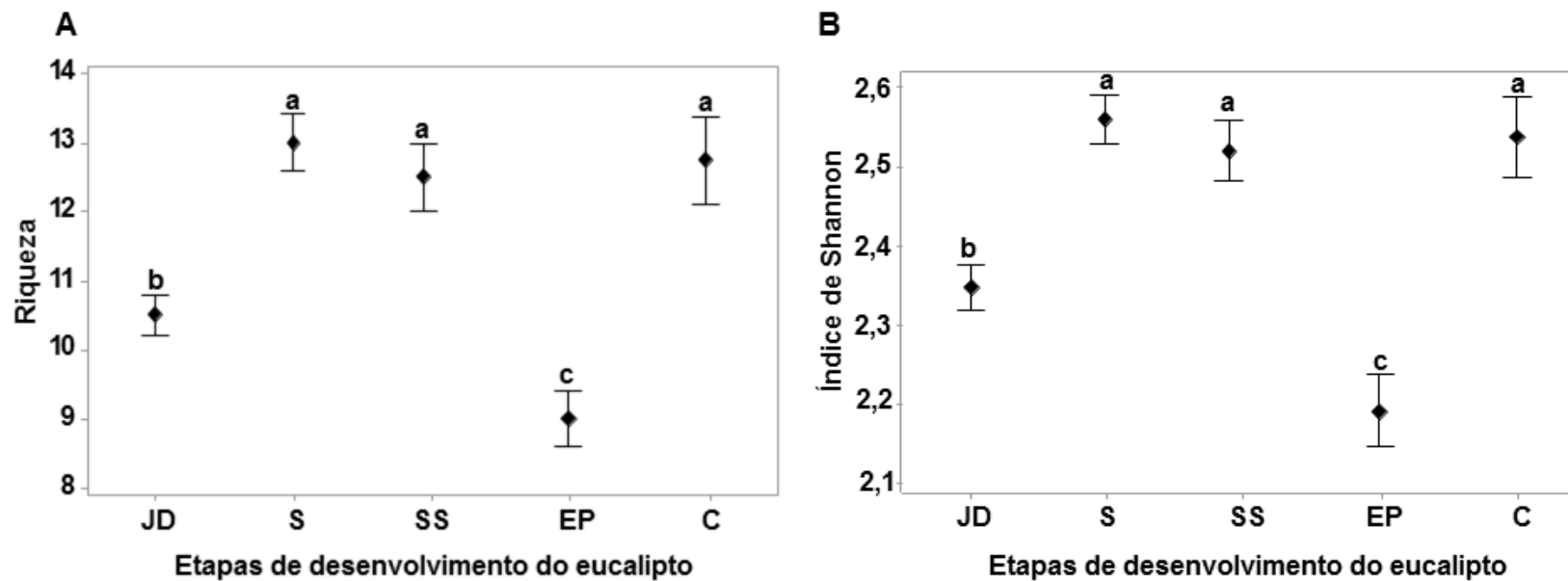


Figura 5: Perfil de riqueza (A) e de diversidade (B) de bactérias endofíticas potencialmente fixadoras de nitrogênio provenientes das fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo. Médias que compartilham a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise filogenética das sequências revelou que a maioria delas pertence ao filo Gammaproteobacteria, em que se destacam os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Firmicutes e Alphaproteobacteria são os filos que apresentaram o maior número de gêneros distintos. Betaproteobacteria foi o filo menos representativo entre os encontrados, sendo o isolado BAC 06 identificado como *Massilia timonae* e próximo filogeneticamente a *Massilia timonae* (Figura 7). Entre os Firmicutes, *Bacillus* foi gênero predominante (Figura 6) com *bootstrap* 99 (Figura 7). *Paenibacillus terrigena* (BAC 33) e *Paenibacillus darwinianus* (BAC 29), colonizadoras exclusivas da expedição e do campo, respectivamente, ainda não foram documentadas em interação endofítica com plantas. *Terrabacter lapilli* (BAC 32) é a única actinobacteria isolada de folhas de eucalipto que ainda não foi registrada como endofítica. Alphaproteobacteria contribui com a presença de muitas bactérias diazotróficas, o que inclui *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium grahamii* e *Rhizobium pusense* (Figuras 6 e 7). O isolado BAC 16, identificado como *Rhizobium pusense* (Figura 6), agrupou com alta sustentação filogenética com *Agrobacterium fabrum* e *Rhizobium pusense* (Figura 7). Nesse filo, *Rhizobium grahami* (BAC 25) e *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) foram pela primeira vez identificadas como endofíticas (Figura 6). Essas duas espécies foram isoladas de mudas de eucalipto recém-saídas do sombreamento, não persistindo as demais fases de desenvolvimento da planta. *Novosphingobium barchamii* apresentou proximidade filogenética com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7). Para a maioria dos isolados essa análise (Figura 7) confirmou a identificação realizada pela comparação com as sequências encontradas no BLAST (Figura 6). Outra espécie acrescida ao universo das endofíticas é a Gammaproteobacteria *Stenotrophomonas panacihumi* (Figuras 6 e 7), isolada de mudas em sombreamento e recém-saídas do sombreamento (Figura 6). Portanto, as folhas de eucalipto sustentam uma comunidade de bactérias endofíticas diversa e dependente das fases de desenvolvimento dessa planta.

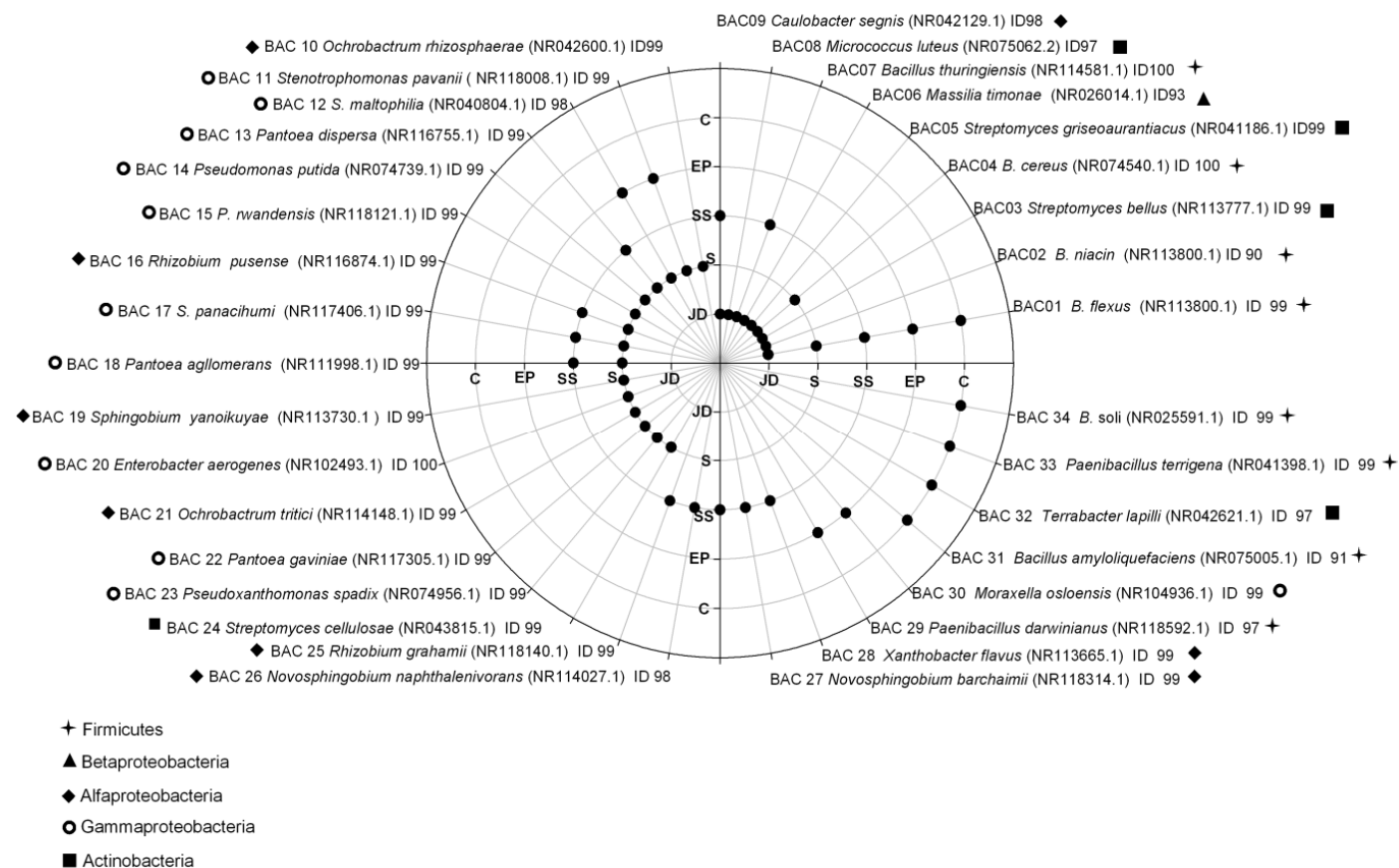


Figura 6: Distribuição das espécies de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. JD: jardim clonal; S: plantas em sombreamento; SS: plantas recém-saídas do sombreamento; EP: plantas para expedição; C: plantas no campo; 1, 2, 3 e 4: Repetições. As espécies estão acompanhadas do número de acesso do *GenBank* (NCBI) e dos valores de identidades (ID) em porcentagem.

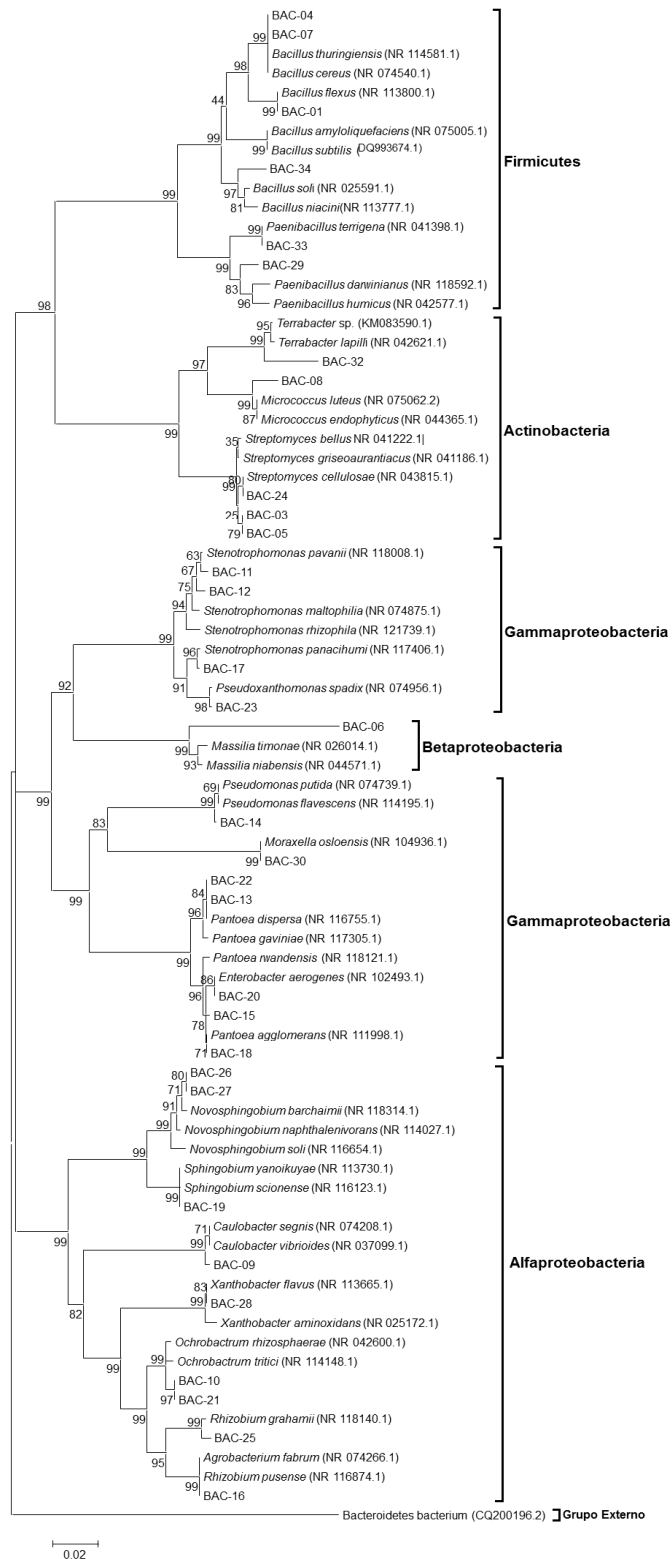


Figura 7: Árvore filogenética construída pelo Método de *Neighbor Joining* utilizando sequências do gene rRNA 16S de bactérias endofíticas encontradas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. *Bootstrap* acima de 50% são mostrados.

DISCUSSÃO

A amplificação do gene rDNA 16S e a separação dos *amplicons* por DGGE mostrou eficiência no acesso à diversidade de bactérias endofíticas em folhas de eucalipto. Através do sequenciamento dos isolados e identificação por busca no NCBI, mais informações sobre essa comunidade foram obtidas. Com essas informações, as sequências e a filogenia foram conhecidas. DGGE é boa escolha para avaliação da diversidade das interações planta-micro-organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2013), sendo o método semiquantativo rápido para descrição de comunidades microbianas complexas (PETERSEN & DAHLLOF, 2005). O estudo dessas interações é importante, uma vez que o interior das plantas é habitat de grande diversidade de micro-organismos endofíticos que desempenham papéis relevantes na sanidade e no desenvolvimento das plantas (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Ao adaptarem-se a esse ambiente e colonizá-lo, os micro-organismos endofíticos expressam potencial metabólico diferenciado dos micro-organismos de vida livre (BRADER *et al.*, 2014).

A análise de agrupamento das bandas de DGGE de fragmentos rRNA 16S exibiu separação eletroforética clara e a formação de grupos distintos. Esses agrupamentos foram menos evidentes na comunidade de bactérias diazotróficas comparada com a de bactérias totais com valores de similaridade inferiores a 30% entre as fases de desenvolvimento do eucalipto. Essas pequenas porcentagens de similaridade (Figura 1) indicam alta variação entre os grupos bacterianos (ALTIMIRA *et al.*, 2012) nas folhas de eucalipto. Entretanto, a comunidade de endofíticas diazotróficas no campo parece recrutar uma microbiota própria, a qual é distinta das outras etapas de desenvolvimento da planta, com similaridade entre 43 e 58% (Figura 2). Esses resultados sugerem que as poucas diferenças encontradas no perfil da comunidade endofítica total (Figura 1) podem ser proporcionadas pelos potencialmente diazotróficos presentes nas etapas de campo e jardim clonal (Figura 2). O gene *nifH* utilizado na DGGE mostrou ser marcador molecular eficiente em verificar diferenças na diversidade e distribuição da comunidade de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas em folhas de eucalipto. Essa abordagem consistente proporciona a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes nessa comunidade (Figura 2). Esses resultados mostraram que essas fases modulam a comunidade de bactérias endofíticas, sendo que muitas delas têm potencial para estimular o crescimento vegetal por fixação de nitrogênio. Essa capacidade possibilitaria condições para a melhoria da nutrição das plantas pela presença da enzima nitrogenase (OLDROYD & DIXON, 2014). Este estudo pode,

então, fornecer contribuições para a busca de soluções biotecnológicas para resolver o problema do nitrogênio em plantas.

A diversidade de bactérias endofíticas em árvores é estudada com menor frequência quando comparada a outras plantas (EL-DEEB *et al.*, 2013; KUKLA *et al.*, 2014; MIGUEL *et al.*, 2013). Em *Eucalyptus*, pouco se conhece sobre as interação planta-bactéria, e os estudos existentes enfatizam o solo (DA SILVA *et al.*, 2014), a rizosfera e as raízes (CASTELLANOS *et al.*, 2010), os caules (PROCÓPIO *et al.*, 2009) e as sementes (FERREIRA *et al.*, 2008).

A modulação da composição das comunidades de bactérias endofíticas pelas fases de desenvolvimento do eucalipto é evidenciada pelos maiores índices de riqueza e diversidade nas folhas provenientes do campo (Figura 4). Embora o perfil de diversidade da comunidade endofítica diazotrófica seja distinto, pois as maiores médias dos índices foram obtidas em folhas oriundas das plantas em sombreamento, recém-saídas do sombreamento e campo, as etapas de desenvolvimento da planta também modulam essa comunidade (Figura 5). As fases de desenvolvimento do eucalipto influenciaram mais as comunidades de bactérias endofíticas potencialmente diazotróficas do que as de bactérias totais.

Índices de diversidade são essenciais nesse tipo de abordagem entre comunidades (MOHAMMAD & RAWASHDEH, 2015), e as mais diversas apresentam maior número de espécies distintas (GHIMIRE *et al.*, 2011). Os índices encontrados neste estudo estão entre aqueles comumente citados na literatura (Figura 4), que mostram valores variando entre 1,5 e 3,5 (GAZIS & CHAVERRI, 2010). As diferenças na diversidade de bactérias endofíticas podem ser atribuídas às concentrações distintas de açúcares encontradas nesse ambiente, aliada às variações catabólicas encontradas na maioria das bactérias heterotróficas filogeneticamente próximas (RODIONOV *et al.*, 2010). A fixação de nitrogênio requer a utilização de fontes de carbono e energia, e os gêneros que apresentam essa capacidade podem ser distintos em tempo de geração, taxa de crescimento e quantidade consumida de carboidratos (NAHER *et al.*, 2008). Em cianobactérias a clivagem da sacarose é essencial no metabolismo do carbono e fixação do nitrogênio (FIGUEROA *et al.*, 2013). Assim, em etapas com concentrações superiores de sacarose pode haver predomínio de bactérias diazotróficas que, à semelhança de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, utilizariam sacarose como fonte de energia (VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto é composta pelos filos Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta-, e Gamma) e Actinobacteria. As

bactérias endofíticas isoladas e identificadas por sequenciamento do rRNA 16S, em sua maioria, mostraram identidades superiores a 97% com as sequências depositadas NCBI, e somente dois isolados, BAC 02 e BAC 31, apresentaram valores inferiores a esse (Figura 6). Em geral, identidades acima de 97% são adotadas em estudos de filogenia como padrão para conceituação de organismos da mesma espécie (AL-BATAYNEH *et al.*, 2011), embora autores reconheçam que valores entre 98,5 e 99% são mais desejáveis e consistentes (STACKEBRANDT & EBERS, 2006). A confiabilidade dos alinhamentos foi confirmada utilizando-se o *e-value* (dados não mostrados), o qual indica a probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de bases, outro alinhamento com escore igual ou superior (KERFELD & SCOTT, 2011). Os isolados com identidades inferiores a 97% foram classificados em nível de gênero, após alinhamentos das sequências obtidas por sequenciamento do rDNA 16S com sequências correspondentes do NCBI (Figura 6).

O principal filo encontrado em plantas sombreadas e recém-saídas do sombreamento foi Proteobacteria, classes Alfa-, Beta- e Gamma (Figura 6). Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria apresentam habilidade em catabolizar carboidratos simples e complexos (LI *et al.*, 2014), o que facilita a adaptação ao habitat endofítico. A análise da diversidade da comunidade de folhas por meio das sequências de rRNA 16S, em abordagens dependentes e independentes de cultivo tem mostrado a dominância de Proteobacteria (BULGARELLI *et al.*, 2013). Entre os micro-organismos encontrados, muitos são potencialmente diazotróficos (Figura 6) (KÖBERL *et al.*, 2013), com a presença do gene *nifH*, o qual está relacionado à fixação de nitrogênio (WEBER *et al.*, 2013). Bactérias pertencentes à Firmicutes geralmente predominam na rizosfera (BODENHAUSEN *et al.*, 2013); porém, muitas de suas espécies apresentam boa adaptação ao estilo de vida endofítico (MIGUEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa colonização frequentemente tem origem na infecção de bactérias do solo nas junções das raízes laterais e na rápida disseminação pelos espaços intercelulares do sistema radicular (CHEN & ZHU, 2015). Entretanto, a maioria das bactérias endofíticas isoladas das diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto demonstrou interação etapa-específica, com poucas delas colonizando mais de uma etapa (Figura 6).

A presença de espécies específicas em cada etapa na comunidade endofítica indica que parte dela pode não ser originária do solo, e sim alcançar o interior da folha pelos estômatos, ferimentos, ou outras portas de entrada (ROMERO *et al.*, 2014). Nesse novo habitat, Proteobacteria pode ter crescido e

proliferado mais rapidamente em fontes de carbono mais prontamente disponíveis (LEFF *et al.*, 2014) no sombreamento e na saída do sombreamento (capítulo 2). Assim, a comunidade de endofíticas pode ser influenciada pela composição e concentração de açúcares e aminoácidos. Plantas mais jovens e em sombreamento apresentam maiores conteúdos de aminoácidos (CHEN & POLAND, 2009; STEINBAUER *et al.*, 2013). Muitos gêneros de Proteobacteria utilizam preferencialmente ácidos orgânicos ao invés de açúcares (PORTAIS & DELORT, 2002), o que também pode ter contribuído para a predominância de Proteobacteria nessas etapas de desenvolvimento do eucalipto (Figura 6).

O predomínio de Firmicutes nas folhas oriundas do campo (Figura 6) pode ser atribuído às maiores concentrações de açúcares (capítulo 2) acompanhadas dos menores teores de aminoácidos (STEINBAUER, 2013). Entretanto, *Bacillus flexus* mostrou-se abundante em todas as fases de desenvolvimento (Figura 6), podendo o início da colonização desse gênero ocorrer no jardim clonal, evidenciado pela ocorrência de algumas de suas espécies em mais de uma fase de desenvolvimento das mudas (Figura 6). A colonização e permanência de *Bacillus flexus* indica a existência de maquinaria genética específica para colonização e persistência em folhas de eucalipto, sendo um endofítico competente (HARDOIM *et al.*, 2008), generalista e com maior capacidade competitiva. Folhas são um habitat mais dinâmico em comparação com a rizosfera e a comunidade microbiana em interação com ela está mais sujeita a variações de temperatura, umidade e radiação durante o dia e a noite, fatores que mudam a comunidade microbiana e a fisiologia da planta (TURNER *et al.*, 2013).

A versatilidade metabólica de bactérias do gênero *Bacillus* confere maior resistência e resiliência desses micro-organismos em vários ambientes com temperaturas, concentrações de sais e pH variáveis (AQEL *et al.*, 2012). Durante as etapas de desenvolvimento do eucalipto ocorrem mudanças na fisiologia da planta (MANKESSI *et al.*, 2010), as quais podem ser responsáveis por modificar a comunidade de bactérias endofíticas. Essas mudanças permitem às bactérias endofíticas multiplicarem-se rapidamente e predominarem em condições favoráveis, mantendo latência em condições menos propícias ao crescimento e proliferação. Bactérias endofíticas em interação com eucalipto podem ser relevantes para a fisiologia da planta e proporcionar tolerância a fatores bióticos e abióticos. Essas características aumentam a sobrevivência e o crescimento da planta em condições adversas e em competição com patógenos (GAIERO *et al.*, 2013). Acrescente-se, ainda, a produção de grande variedade de reguladores de crescimento como

giberelinas, ácido abscísico e auxinas (GAIERO *et al.*, 2013).

A análise filogenética das sequências de rRNA 16S confirmou que a comunidade de endofíticas em folhas de eucalipto está incluída em Firmicutes, Proteobacteria (Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria pela formação de clados distintos (Figura 7). Os *bootstraps* acima de 95 (Figura 7) na maioria dos agrupamentos formados são considerados fortes e sustentam a análise filogenética (SCHNEIDER, 2007). Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* com altos *bootstraps*. Esses gêneros são fixadores de nitrogênio e produtores e excretadores de AIA e aminoácidos (LIBA *et al.*, 2006). Esses metabólitos liberados pelos endofíticos podem ser utilizados pela planta e aumentar sua taxa de crescimento (KEMBEL *et al.*, 2014). A fixação de nitrogênio é amplamente difundida entre bactérias e essa capacidade pode proporcionar uma oportunidade para melhorar a nutrição de plantas (OLDROYD & DIXON, 2014). Entre as Proteobacterias fixadoras de nitrogênio estão dois isolados de *Rhizobium* (Figura 6), com alta identidade e *bootstrap*, geneticamente relacionados com *Agrobacterium*, *Ochrobactrum rhizosphaerae* e *Ochrobactrum tritici* (Figura 7).

Ochrobactrum rhizosphaerae foi descrita recentemente no solo com capacidade de utilizar sacarose e frutose como fontes de carbono (KAMPFER *et al.*, 2008), sendo neste estudo descrita aqui como endofítica em eucalipto. *Xantobacter flavus* é outra fixadora de N descrita há 36 anos com sistema similar a *Azotobacter* e utiliza muitos ácidos orgânicos. A maioria dos carboidratos é utilizada por esses micro-organismos após incubação prolongada (MALIK & CLAUS, 1979). Essas bactérias formam um clado distinto com alto *bootstrap*, o que garante a proximidade filogenética entre elas. Os genes de fixação de nitrogênio presentes podem ser uma das características que as aproximam filogeneticamente.

A maioria dos Firmicutes isolados das várias fases de desenvolvimento do eucalipto pertencente ao gênero *Bacillus* e o filo Alfaproteobacteria foi o que contribuiu com o maior número de gêneros distintos (Figura 6). *Bacillus* geralmente é a bactéria endofítica mais encontrada, sendo fonte de várias enzimas com grande potencial biotecnológico, como amilases, proteases, celulasas e lipases (KANNAN *et al.*, 2015). Essas enzimas parecem ser fundamentais para o início da colonização endofítica (SEO *et al.*, 2010). Esses micro-organismos são capazes de produzir auxinas e giberelinas, em adição à fixação de nitrogênio, e secretar substâncias importantes no controle biológico de patógenos (BACON *et al.*, 2015).

O filo Betaproteobacteria foi o menos representativo entre os isolados e BAC 06 foi identificado como *Massilia timonae* (Figuras 6 e 7). Essa espécie é

colonizadora da rizosfera, raízes (OFEK *et al.*, 2012) e folhas (JACKSON *et al.*, 2013) e promotora de crescimento pela produção de AIA, sideróforos em várias espécies de planta. A sensibilidade de *Massilia timonae* à competição (OFEK *et al.*, 2012) pode ser a causa da incapacidade dela em manter-se em outras fases de desenvolvimento do eucalipto, fato que pode ter ocorrido também com outras espécies (Figura 6). Essa comunidade bacteriana endofítica em eucalipto é diversa e dependente dessas fases. Muitas delas são potencialmente diazotróficas e podem contribuir para a fixação de nitrogênio e promoção de crescimento (Figura 6).

A comunidade bacteriana endofítica em eucalipto *Eucalyptus* difere de acordo o órgão de isolamento, área geográfica do cultivo e a espécie de planta em interação (FERREIRA *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2009; CASTELLANOS *et al.*, 2010). Os poucos estudos existentes envolvendo essa planta mostraram a presença de *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp., *Paenibacillus humicus*, *Enterococcus mundtii*, *Methylobacterium* sp., *Methylobacterium variabile*, *Methylobacterium gregens*, *Sphingomonas phyllosphaerae*, *Paracoccus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008), *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp, *Curtobacterium* sp, *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, e *Lactococcus lactis* (PROCÓPIO *et al.*, 2009). Acrescenta-se a esses os gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Xanthomonas* (CASTELLANOS *et al.*, 2010).

As espécies isoladas em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto ainda não foram registradas em interação endofítica com essa planta. Este estudo, portanto, contribuiu com a inclusão de novas endofíticas em *Eucalyptus*, inclusive aquelas com potencial para fixação de nitrogênio (Figuras 6 e 7). O gênero *Novosphingobium* já foi descrito como endofítico (CASTRO *et al.*, 2014); entretanto, esse é o primeiro registro da espécie *Novosphingobium barchamii* (BAC 27) como endofítica. Essa espécie está filogeneticamente relacionada com alto *bootstrap* com *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingobium scionense* (Figura 7) e apresenta maquinaria genética que possibilita a adaptação em diversos habitat como solo, sedimentos e ambientes aquáticos (ADDISON *et al.*, 2007). O interior das folhas de eucalipto recém-saídas do sombreamento é outro importante habitat ocupado por *Novosphingobium barchamii* (Figura 6 e 7). Essa espécie utiliza glicose, sacarose e ramnose como fontes de carbono sendo isolada de solos contaminados com o inseticida hexaclorociclohexano (NIHARIKA *et al.*, 2013). *Rhizobium grahamii*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*

e *Terrabacter lappili* são outras novas espécies endofíticas isoladas de folhas de eucalipto (Figuras 6 e 7). Os altos valores de identidade e *bootstrap* confirmam a identificação dessas espécies como endofíticas (Figura 7). *Rhizobium* é comumente citado como endofítico em várias plantas, porém, a literatura consultada não aponta *Rhizobium grahami* como um deles. Essa bactéria pertence a um novo grupo filogenético de rizóbio, juntamente com *Rhizobium mesoamericanum* e outros (ALTHABEGOITI *et al.*, 2014). A presença de *Stenotrophomonas panacihumi* em interação com plantas é inédita (Figura 6), sendo até o momento encontrada apenas em solos cultivados com plantas medicinais (YI *et al.*, 2010). *Stenotrophomonas panacihumi* mostrou proximidade filogenética com *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas pavani* e *Stenotrophomonas maltophyla* (Figura 7), sendo essas duas últimas isoladas como endofíticas fixadoras em cana-de-açúcar (RAMOS *et al.*, 2014). *P. darwinianus* e *Panibacillus terrigena* são espécies incluídas em Firmicutes, o filo mais abundante entre os grupos bacterianos no ambiente como solos da Antártica (DSOUZA *et al.*, 2014), e rizosfera de bambú (HAN *et al.*, 2009). A habilidade de bactérias desse gênero em colonizar vários ambientes é atribuída à diversidade fisiológica pela formação de endósporos resistentes a estresse, à secreção de enzimas extracelulares e a compostos antimicrobianos. A presença dessas enzimas garante a hidrólise de uma variedade de carboidratos (PRIEST, 2009). A colonização inédita de *Panibacillus darwinianus* e *Panibacillus terrigena* em eucalipto ocorreu em plantas oriundas da expedição e campo, respectivamente (Figura 6). O filo actinobacteria é pouco explorado como fonte de novas bactérias endofíticas. Entretanto, mais recentemente, o número de relatos vem aumentando em várias plantas (BODENHAUSEN *et al.*, 2013; MIGUEL *et al.*, 2013; ROMERO *et al.*, 2014; LEFF *et al.*, 2014). Neste estudo, *Terrabacter lappili*, isolada de folhas de eucalipto em campo, é mais uma actinobacteria incluída entre as endofíticas (Figuras 6 e 7).

A comunidade bacteriana endofítica é parte importante do microbioma de eucalipto. Entre as bactérias que compõem essa comunidade estão as endofíticas diazotróficas, que podem contribuir com o nitrogênio necessário ao crescimento dessa planta. Entretanto, novas abordagens envolvendo a expressão de genes *nifH*, responsáveis pela fixação de N fazem-se necessárias. A descrição da diversidade desses micro-organismos em diferentes fases de desenvolvimento possibilita melhor compreensão sobre a dinâmica da colonização endofítica em eucalipto. A descrição da diversidade de bactérias endofíticas é etapa importante para determinar outros possíveis benefícios da interação endofítico-eucalipto e

determinar o papel ecológico que elas têm nessa interação.

CONCLUSÕES

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio. A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou-se distinta em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria. Esses filos estavam presentes em plantas de diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas*, e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

A distribuição das espécies de bactérias endofíticas em eucalipto mostrou especificidade entre as fases de desenvolvimento. A maioria dos isolados de bactérias endofíticas identificados por sequenciamento do rRNA 16S foram obtidos de plantas em sombreamento e das recém-saídas do sombreamento.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.

REFERÊNCIAS

- ADDISON, S. L., FOOTE, S. M., REID, N. M & LLOYD-JONES, G. *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2467-2471, 2007.
- AL-BATAYNEH, K. M., JACOB, J. H & HUSSEIN E. I. Isolation and molecular identification of new thermophilic bacterial strain of *Geobacillus pallidus* and

Anoxybacillus flavithermus. **International Journal Integrative Biology**. v. 11, p. 39-43, 2011.

ALTHABEGOITI, M. J., ORMEÑO-ORRILLO, E., LOZANO, L., TEJERIZO, G. T., ROGEL, M. A., MORA, J & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Characterization of *Rhizobium grahamii* extrachromosomal replicons and their transfer among rhizobia. **BMC Microbiology**, 14, p. 1-14, 2014.

ALTIMIRA, F., YÁÑEZ, C., BRAVO, G., GONZÁLEZ, M., ROJAS, L. A & SEEGER, M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-12, 2012.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410. 1990.

AQEL, H., AL-QUADAN, F & BOULENOUAR, N. Effects of temperature, pH-values and sodium chloride concentrations on the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by thermotolerant *Bacillus* strains. **Journal Bioscience Biotechnology**, v. 1, p. 57-65, 2012.

BACON, C. W., PALENCIA, E. R & HINTON, D. M. (2015). Abiotic and Biotic Plant Stress-Tolerant and Beneficial Secondary Metabolites Produced by Endophytic *Bacillus* Species. In: **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets** (pp. 163-177). Springer India.

BLACKWOOD, C. B., OAKS, A & BUYER, J. S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6193-6198, 2005.

BODENHAUSEN, N., HORTON, M. W & BERGELSON, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

BONIEK, D., FIGUEIREDO, D., PYLRO, V. S & DUARTE, G. F. Characterization of bacterial strains capable of desulphurisation in soil and sediment samples from Antarctica. **Extremophiles**, v. 14, p. 475-481, 2010.

BONITO, G., REYNOLDS, H., ROBESON, M. S., NELSON, J., HODKINSON, B. P., TUSKAN, G., SCHADT, C. W & VILGALYS, R. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3356-3370, 2014.

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

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 13, p. 79-148, 2000.

BULGARELLI, D., SCHLAEPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V. L & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

- CASTELLANOS, D. M. O., ZABALA, L. B. B., BOTÍA, D. I. E. G. O. R., GARRIDO, M. F. R., BALDANI, V. L. D & BUITRAGO, R. R, B. Caracterización de Bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, p. 107-120, 2010.
- CASTRO, R. A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., BATISTA, B. D., LUVIZOTTO, D. M., MARCON, J., FERREIRA, A., MELO, I. S & AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springer Plus**, v. 3, p. 1-10, 2014.
- CHEN, Y & POLAND, T. M. Interactive influence of leaf age, light intensity, and girdling on green ash foliar chemistry and emerald ash borer development. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 806-815, 2009.
- CHEN, C & ZHU, H. Are common symbiosis genes required for endophytic rice-rhizobial interactions? **Plant Signaling & Behavior**, v 8, p. 1-4, 2013.
- DA SILVA, M. D. C. S., DE ALMEIDA PAULA, T., MOREIRA, B. C., CAROLINO, M., CRUZ, C., BAZZOLLI, D. M. S., SILVA, C. C & KASUYA, M. C. M. Nitrogen-Fixing Bacteria in *Eucalyptus globulus* Plantations. **PloS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.
- DSOUSA, M., TAYLOR, M. W., TURNER, S. J & AISLABIE, J. Genome-Based Comparative Analyses of Antarctic and Temperate Species of *Paenibacillus*. **PloS One**, v. 9, p. e108009, 2014.
- EL-DEEB, B., FAYEZ, K & GHERBAWY, Y. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 1, p. 56-64, 2013.
- FERREIRA, A., QUECINE, M. C., LACAVA, P. T., ODA, S., AZEVEDO, J. L & ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, p. 8-14, 2008.
- FIGUEROA, C. M., DIEZ, M. D. A., KUHN, M. L., MCEWEN, S., SALERNO, G. L., IGLESIAS, A. A & BALLICORA, M. A. The unique nucleotide specificity of the sucrose synthase from *Thermosynechococcus elongatus*. **FEBS Letters**, v. 587, p. 165-169, 2013.
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S & DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GAZIS, R & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. v. 3, p. 240–254, 2010.
- GHIMIRE, S. R., CHARLTON, N. D., BELL, J. D., KRISHNAMURTHY, Y. L & CRAVEN, K. D. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting

- switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v. 47, p.19-27, 2011.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T & RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.
- HAN, J., XIA, D., LI, L., SUN, L., YANG, K & ZHANG, L. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Microbial Ecology**, v. 58, p. 363-373, 2009.
- HARDOIM, P. R., OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16, p. 463-471, 2008.
- HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K & WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.
- JACKSON, C. R., RANDOLPH, K. C., OSBORN, S. L & TYLER, H. L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- KÄMPFER, P., SESSITSCH, A., SCHLOTTER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J & SCHOLZ, H. C. *Ochrobactrum rhizosphaerae* sp. nov. and *Ochrobactrum thiophenivorans* sp. nov., isolated from the environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1426-1431, 2008.
- KANNAN, R., DAMODARAN, T & UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 350-359, 2015.
- KEMBEL, S. W., O'CONNOR, T. K., ARNOLD, H. K., HUBBELL, S. P., WRIGHT, S. J & GREEN, J. L. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 13715-13720, 2014.
- KERFELD, C. A & SCOTT, K. M. Using BLAST to Teach “e-value-evolutionary” Concepts. **PLoS Biology**, v. 9, p. 1-4, 2011.
- KÖBERL, M., SCHMIDT, R., RAMADAN, E. M., BAUER, R & BERG, G. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-9, 2013.
- KÖPPEN, W. (1948). **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica. 140p.
- KUKLA, M., PŁOCINICZAK, T & PIOTROWSKA-SEGET, Z. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. **Chemosphere**, v. 117, p. 40-46, 2014.

- LEFF, J. W., DEL TREDICI, P., FRIEDMAN, W. E & FIERER, N. Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees. **Environmental Microbiology**, p. 1-10, 2014.
- LI, X.; RUI, J., XIONG, J., LI, J., HE, Z., ZHOU, J., YANNARELL, A. C., RODERICK, I. & MACKIE, R. I. Functional Potential of Soil Microbial Communities in the Maize Rhizosphere. **PloS One**, v. 9, p. 1-9, 2014.
- LIBA, C. M., FERRARA, F. I. S., MANFIO, G. P., FANTINATTI-GARBOGGINI, F.,

ALBUQUERQUE, R. C., PAVAN, C., RAMOS, P. L., MOREIRA-FILHO, C. A

& BARBOSA, H. R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1076-1086, 2006.
- MALIK, K. A & CLAUS, D. Xanthobacter flavus, a new species of nitrogen-fixing hydrogen bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 29, p. 283-287, 1979.
- MANKESSI, F., SAYA, A. R., BOUDON, F., GUÉDON, Y., MONTES, F., LARTAUD, M., VERDEIL, J. L & MONTEUUIS, O. Phase change-related variations of dome shape in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems. **Trees**, v. 24, p. 743-752, 2010.
- MAPELLI, F., MARASCO, R., ROLLI, E., BARBATO, M., CHERIF, H., GUESMI, A., OUZARI, I., DAFFONCHIO, D & BORIN, S. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.
- MIGUEL, P. S. B., DELVAUX, J. C., OLIVEIRA, M. N. V., MONTEIRO, L. C. P., FREITAS, F. S., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal Microbiology**, v. 7, p. 586–594.
- Minitab, I. (2006). MINITAB statistical software. Version: Release, 15.
- MOHAMMAD, I & ALRAWASHDEH, I. Genetic Diversity Determination for Peganum Harmala Species using Shannon's, Simposn, Eveness, Density and Richness Parameters In Jordan. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 5, n. 2, p. 1-5, 2015.

- NAHER, U. A., RADZIAH, O., HALIMI, M. S., SHAMSUDDIN, Z. H & RAZI, I. M. Specific growth rate and carbon sugar consumption of diazotrophs isolated from rice rhizosphere. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 1008 – 1014, 2008.
- NIHARIKA, N., MOSKALIKOVA, H., KAUR, J., SEDLACKOVA, M., HAMPL, A., DAMBORSKY, J., PROKOP, Z. & LAL, R. *Novosphingobium barchaimii* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 667–672, 2013.
- OFEK, M., HADAR, Y & MINZ, D. Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). **PloS One**, v. 7, p. e40117, 2012.
- OLDROYD, G. E. D & DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 19-24, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. V., SANTOS, T. M. A., VALE, H. M. M., DELVAUX, J. C., CORDERO, A. P., FERREIRA, A. B., MIGUEL, P. S. B., TÓTOLA, M. R., COSTA, M. D., MORAES, C. A & BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 59, p. 221–230, 2013.
- PETERSEN, D. G & DAHLLÖF, I. Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 339-348, 2005.
- POLY, F., RANJARD, L., NAZARET, S., GOURBIÈRE, F & MONROZIER, L. J. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2255-2262, 2001.
- PORTAIS, J. C & DELORT, A. M. Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can ¹³C-NMR tell us? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 375-402, 2002.
- PRIEST, F. G (2009) Genus I. *Paenibacillus*. In: DE VOS. P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W *et al.*, editors. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Firmicutes**. 2nd ed. New York, USA: Springer. pp. 1422.
- PROCÓPIO, R. E. L., ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W & AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1408-1422, 2009.
- RAMOS, P. L., VAN TRAPPEN, S., THOMPSON, F. L., ROCHA, R. C., BARBOSA, H. R., DE VOS, P & MOREIRA-FILHO, C. A. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 926-931, 2014.
- REINHOLD-HUREK, B & HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 14, P. 435-443, 2011.

- RODIONOV, D. A., YANG, C., LI, X., RODIONOVA, I. A., WANG, Y., OBRAZTSOVA, A. Y., ZAGNITKO, O. P., OVERBEEK, R., ROMINE, M. F., REED, S., FREDRICKSON, J. K., NEALSON, K. H & OSTERMAN, A. L. Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. **BMC Genomics**, v. 11, p. 494, 2010.
- ROMERO, F. M., MARINA, M & PIECKENSTAIN, F. L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, p. 187-194, 2014.
- SAKIYAMA, C., PAULA, E., PEREIRA, P., BORGES, A & SILVA, D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SCHNEIDER, H (2007). **Métodos de análise filogenética: um guia prático** [Methods for phylogenetic analysis: a practical guide]. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- SEO, W. T., LIM, W. J., KIM, E. J., YUN, H. D., LEE, Y. H & CHO, K. M. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, p. 493-503, 2010.
- SMETHURST, P., HOLZ, H., MORONI, M & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 63-80, 2004.
- STACKEBRANDT, E & EBERS, J. Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, v. 33, p. 152-155, 2006.
- STEINBAUER, J. Shoot feeding as a nutrient acquisition strategy in free-living psyllids. **PloS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.
- SUMMAN, A., GAUR, A., SHRIVASTAVA, A. K & YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005
- Systat Software, Inc. (2008). SigmaPlot for Windows, version 11.0.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., IKEDA, A. C., HUNGRIA, M., ADAMOSKI, D., KAVACORDEIRO, V., GLIENKE, C & GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- TURNER, T. R., JAMES, E. K & POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-10, 2013.
- VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A & DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, p. 1-11, 2015.

- VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M., CRUZ-VÁZQUEZ, F., TREJO-CONTRERAS, M. J., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., BRAVO-PATÍÑO, A., CAJERO-JUÁREZ, M., CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P. & VALDEZ-ALARCÓN, J. J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 137-149, 2011.
- VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J & LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- WAQAS, M., KHAN, A. L., KAMRAN, M., HAMAYUN, M., KANG, S. M., KIM, Y. H., & LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.
- WEBER, O. B., VIDEIRA, S. S & DE ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 3422-3430, 2013.
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C & ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, p. 209-216, 2010.
- YI, H., SRINIVASAN, S & KIM, M. K. *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **The Journal of Microbiology**, v. 48, p. 30-35, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou-se eficiente em acessar a diversidade e a distribuição de bactérias, fungos e leveduras endofíticos em folhas de eucalipto.

A comunidade endofítica detectada foi influenciada pela parte da planta amostrada, pelo local de cultivo das árvores e pela sazonalidade. Os fungos e leveduras dos filos Basidiomycota e Ascomycota são componentes predominantes da microbiota fúngica e de leveduras endofíticas.

Esse é o primeiro registro da presença de fungos nos exsudatos xilêmáticos de uma planta, sendo relevante para o entendimento da biologia e das interações envolvidas.

A excisão, a eluição e o sequenciamento das bandas eluídas de diferentes posições do gel mostraram ser boas técnicas para identificação de fungos e leveduras endofíticos em eucalipto. Este estudo mostrou pela primeira vez a presença de leveduras em interação endofítica com eucalipto.

Em eucalipto, a relação entre fungos filamentosos e eucalipto mostrou ser mais específica que a de levedura, pelo maior número de representantes em cada fase de desenvolvimento do eucalipto.

A Nested-PCR e a análise por DGGE permitiram a identificação de populações de menor e maior abundância nas comunidades de bactérias endofíticas totais e fixadoras de nitrogênio.

A utilização do gene *nifH* foi consistente para a diferenciação, de forma rápida, das populações presentes na comunidade de diazotróficos em folhas de eucalipto durante as diferentes etapas de desenvolvimento dessas plantas.

A comunidade de bactérias endofíticas em eucalipto variou em relação às etapas de desenvolvimento dessa planta. As pequenas diferenças existentes na comunidade endofítica total podem ser proporcionadas pelas bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas etapas de campo e jardim clonal.

O sequenciamento dos isolados revelou a presença de três filos bacterianos: Firmicutes, Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma) e Actinobacteria em diferentes fases de desenvolvimento do eucalipto. Entre as Gammaproteobacteria, destacam-se os gêneros *Pantoea* e *Stenotrophomonas* e a maioria dos Firmicutes são *Bacillus*. Alfaproteobacteria contribuiu com os gêneros mais distintos, e Betaproteobacteria foi o menos representativo.

Esse é o primeiro relato de *Paenibacillus terrigena* e *Paenibacillus darwinianus*, *Terrabacter lapilli*, *Rhizobium pusense*, *Novosphingobium barchamii* e *Stenotrophomonas panacihumi* como endofíticas.