



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO:
INDUÇÃO *IN VITRO* E MINERAÇÃO DE DADOS MOLECULARES**

ALINE BEATRIZ RIBEIRO DOS SANTOS

Natal/RN
Dezembro de 2019

ALINE BEATRIZ RIBEIRO DOS SANTOS

ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO:

INDUÇÃO *IN VITRO* E MINERAÇÃO DE DADOS MOLECULARES

Trabalho apresentado como pré-requisito para a
Conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Rio Grande
do Norte.

Orientador: Paulo Sérgio Marinho Lúcio

Natal/RN

Dezembro, 2019

**ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO:
INDUÇÃO *IN VITRO* E MINERAÇÃO DE DADOS MOLECULARES**

ALINE BEATRIZ RIBEIRO DOS SANTOS

Banca Examinadora

Prof. Maria Tereza Barreto
DMP/UFRN
Examinador Externo

Prof. Carlos Alfredo Galindo Blaha
DBG/UFRN
Professor Convidado

Prof. Paulo Sérgio Marinho Lúcio
DBG/UFRN
Professor Orientador

Natal/RN
Dezembro de 2019

DEDICATÓRIA

**Dedico aos meus pais,
Leandra Maria Ribeiro e Francisco Marcelino Lima
E ao meu irmão, Marcelino Junior**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Paulo Marinho, por ter acreditado em meu potencial, pela orientação, pelas palavras de incentivo e, por ter dado suporte e contribuído para realização desta pesquisa.

A Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) pelo conhecimento adquirido.

Ao corpo docente do Curso de Ciências Biológicas, pelos ensinamentos teóricos e práticos.

Aos companheiros de curso pela convivência.

Aos familiares, amigos e todos que torceram pelo meu sucesso.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO GERAL

ENDOFÍTICOS EM EUCALIPTO:

INDUÇÃO *IN VITRO* E MINERAÇÃO DE DADOS MOLECULARES

Endofíticos são fungos ou bactérias que vivem inseridos nos tecidos vegetais de praticamente todas as plantas e que exercem várias funções nesta condição além de garantir sua sobrevivência. Estes microrganismos são de grande importância também para as plantas e aspectos quanto a nutrição ou mesmo conferindo defesa. Em algumas situações menos frequentes podem ser patogênicos. Neste trabalho, procurou-se abordar a temática dos endofíticos com dois objetivos básicos em plantas de eucalipto. O primeiro objetivo foi criar as condições para induzir *in vitro* o crescimento desses organismos em laboratório e o segundo consistiu na busca de artigos científicos que permitissem a mineração de dados moleculares sobre as principais espécies existentes. A metodologia do trabalho consistiu então em descontaminar discos de folhas de espécies de eucalipto cultivadas no experimento TECHS (Tolerância de Eucalyptus Clonais aos Estresses Hídrico, Térmico e Biótico) da EAJ-Escola Agrícola de Jundiaí/UFRN, e induzir seu crescimento em meios de cultura *in vitro*. A mineração de dados moleculares foi feita através da busca de artigos na base de dados PUBMED seguida da identificação de sequências nucleotídicas para cada tipo de organismo citado nos artigos. Os resultados obtidos mostraram que foi possível a indução dos microrganismos *in vitro* definindo o protocolo de desinfestação da superfície das folhas. O levantamento de referências e de sequências de DNA resultou em 27 artigos científicos sobre endofíticos em eucalipto. A partir destas referências e consultados bancos de dados públicos foram identificados 306 genomas, 4.182.587 nucleotídeos sequenciados e 618.716 genes em organismos endofíticos relacionados com a planta do eucalipto.

Palavras-chave: endofíticos, eucalipto, indução *in vitro*, mineração de dados moleculares

GENERAL ABSTRACT

ENDOPHYTICS IN EUCALYPTUS: IN VITRO INDUCTION AND MOLECULAR DATA MINING

Endophytes are fungi or bacteria that live embedded in the plant tissues of virtually every plant and that perform various functions in this condition in addition to ensuring their survival. These microorganisms are of great importance also for plants and aspects regarding nutrition or even conferring defense. In some less frequent situations they may be pathogenic. In this work, we tried to approach the endophytic theme with two basic objectives in eucalyptus plants. The first objective was to create the conditions to induce the growth of these organisms in vitro in the laboratory and the second was to search for scientific articles that allowed the mining of molecular data on the main existing species. The methodology of this work consisted of decontaminating discs of leaves of eucalyptus species cultivated in TECHS (Tolerância de Eucalyptus Clonais aos Estresses Hídrico, Térmico e Biótico/ EAJ-Escola Agrícola de Jundiaí/UFRN) and inducing their growth in in vitro culture media. Mining of molecular data was done by searching for articles in the PUBMED database followed by identification of nucleotide sequences for each type of organism cited in the articles. The results showed that it was possible to induce microorganisms in vitro by defining the leaf surface disinfection protocol. The collection of references and DNA sequences resulted in 27 scientific articles on eucalyptus endophytes. From these references and consulted public databases, 306 genomes, 4,182,587 nucleotide sequences and 618,716 genes in endophytic organisms related to the eucalyptus plant were identified.

Keywords: endophytes, eucalyptus, in vitro induction, molecular data mining

LISTA DE ABREVIATURAS

CNB: Tipo clonal (*E. urophylla x grandis*)

COP: Tipo clonal do Eucalipto (*E. grandis x camaldulensis*)

FIB: Tipo clonal do Eucalipto (*E. grandis x urophylla*)

TECHS: Programa Cooperativo sobre Tolerância de Eucalyptus Clonais aos Estresses Hídrico e Térmico

MS: Meio nutritivo de MURASHIGE e SKOOG, 1962

pH: Potencial Hidrogeniônico

PIB: Produto Interno Bruto

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PUBMED: Banco de dados *online* da U. S. National Library of Medicine (NLM)

PCR: Reação de Polimerização em Cadeia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Busca de artigos no PUBMED contendo palavras chave.....17
- Figura 2.** Busca em todos os bancos de dados com espécie de endofítico.....17
- Figura 3.** Exemplo de busca por genoma, números de nucleotídeos e genes no PUBMED...18
- Figura 4.** Discos de folhas de *E. grandis* x *urophylla* descontaminados induzindo o crescimento de endofíticos..... 19
- Figura 5.** Crescimento de endofíticos dos tipos clonais do Eucalipto CNB, COP e FIB..... 20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados obtidos dos artigos encontrados na plataforma PUBMED.....	21
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Indução de endofíticos <i>in vitro</i>	16
2.2. Mineração <i>in silico</i>	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1. Indução de endofíticos <i>in vitro</i>	19
3.2 Mineração <i>in silico</i>	21
4. CONCLUSÃO.....	25
5. REFERÊNCIAS.....	26

1. INTRODUÇÃO

O termo endofítico originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer microrganismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epífíticos que vivem na superfície das plantas. Microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das células, habitando, de modo geral, suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros. Portanto eles se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. São também distintos dos microrganismos epífíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Evidentemente, essas distinções tem finalidades apenas didáticas, havendo sobreposição entre esses grupos de microrganismos. Assim, um endofítico que vive no interior de uma planta de acordo com as condições do ambiente e o próprio estado fisiológico do hospedeiro, pode ser considerado um patógeno latente (MELO E AZEVEDO,1998).

De fato, há duas maneiras de estudar um microrganismo endofítico, conforme o enfoque seja patológico ou ecológico. Na primeira, microrganismos são inoculados em plantas ou partes vegetais para verificar se eles produzem doenças, muitas vezes sem a preocupação de preservar condições em que a planta vive, ou seja favorecendo o microrganismo. O enfoque ecológico está muito mais relacionado com as interações planta-microrganismo em condições naturais como um ecossistema tendendo ao equilíbrio. Nessas condições, um microrganismo endofítico, do ponto de vista ecológico, pode ser considerado patogênico e também um microrganismo epífítico pode eventualmente alojar-se no interior de um tecido vegetal e nesse caso ser erroneamente considerado endofítico. Microrganismos endofíticos também podem ser encontrados não apenas nas partes aéreas vegetais, mas inclusive em raízes, que são, aliás, uma das principais portas de entrada dos mesmos. A distinção, no caso, é feita apenas para não incluir as bactérias fixadoras de nitrogênio entre os endofíticos, que vivem em simbiose com as plantas formando nódulos nas mesmas, e também fungos micorrízicos. Eles são microrganismos endofíticos, mas constituem grupos muito mais estudados que outros que habitam principalmente as partes aéreas das plantas. A respeito destes, as pesquisas ainda são poucas, comparadas com as existentes sobre micorrizas e bactérias, como por exemplo em *Rhizobium* (MELO E AZEVEDO,1998).

Entre os microrganismos endofíticos, os fungos e bactérias que formam nódulos nas raízes das plantas as quais estão associados são bastante estudados devido sua importância na agricultura, particularmente por sua participação na fixação de nitrogênio pelas plantas. Ao contrário, os endófitos das partes aéreas dos vegetais só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras (SOUZA et al., 2004).

Os microrganismos (fungos, bactérias, actinomicetos, entre outros) desempenham um papel fundamental na produção de novos produtos naturais que podem ser utilizados na indústria farmacêutica (humana e animal), alimentícia e agrícola. Os fungos encontrados no interior de espécies vegetais, denominados fungos endofíticos ou fungos endófitos, apresentam um enorme potencial na produção de substâncias novas e bioativas (CHAPLA et al., 2013).

As interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (Araújo, 1996; Rodrigues & Dias Filho, 1996; Pereira, 1993). Segundo Araujo et al., (2002), microrganismos endofíticos colonizam um nicho ecológico semelhante aquele ocupado por fitopatógenos e, portanto, podem ser importantes para o controle destes.

Apesar de devidamente comprovada a existência da microbiota endofítica, muitas pesquisas ainda deverão ser feitas a respeito de aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessa interação. Antes disso, é interessante se conhecer a diversidade desses organismos, sua presença, frequência e funções. Existe uma série de razões para que se aprofundem os estudos com endofíticos. Primeiro, a falta de informações para elucidar a base biológica dessas interações. Segundo, porque os endofíticos são vantajosos, pois muitos benefícios para a planta têm sido atribuído à presença deles: a) vários endofíticos são capazes de produzir antibióticos e outros metabólicos secundários de interesse farmacológico;

- b) podem servir como bioindicadores de vitalidade (HELANDER & RANTIO-LEHTIMAKI, 1990);
- c) têm sido usados como agentes de controle biológico de pragas e doenças;
- d) têm sido usados como bioherbicidas;
- e) podem ser usados na biorremediação de solos contaminados com poluentes e
- f) são usados como vetores para introdução de genes em plantas hospedeiras.

O isolamento dos endofíticos pode ser feito de forma direta ou indireta, utilizando meios de cultura ou via técnicas moleculares, visando o isolamento dos microrganismos endofíticos, fatores que demonstram uma visão mais realista da comunidade endofítica do hospedeiro (LACAVA et al., 2006).

Várias modificações fisiológicas em plantas foram relacionadas com a presença de microrganismos que habitam seu interior. Alguns endofíticos associados a folhas e pecíolos tem alta produção de enzimas como celulasas e ligninases. Em gramíneas, endofíticos podem inibir a reprodução da planta hospedeira, pois sua presença dentro dos óvulos produz esterilidade. Alguns fungos endofíticos, como *Epicoccum purpureceus*, aumentam o poder germinativo das sementes que o contêm. Há ainda vários relatos de fungos endofíticos produzindo fatores de crescimento como o *Fusarium moniliforme* que produz giberilina, ocasionando, inclusive, modificações morfológicas teratogênicas nas plantas hospedeiras (MELO E AZEVEDO, 1998).

Os microrganismos endofíticos penetram nas plantas basicamente através de aberturas naturais ou ferimentos, sendo que a principal porta de entrada é o sistema radicular (NETO et al., 2002).

O gênero *Eucalyptus*, pertence à família Myrtaceae, ocorre naturalmente na Austrália, Nova Guiné e na Indonésia, possui mais de 700 denominações diferentes incluindo espécies, variedades e híbridos naturais (CARVALHO, 2006). O gênero possui uma grande diversidade de espécies em relação à adaptação a diferentes condições edafoclimáticas com uma variedade de finalidades de uso (EMBRAPA, 2000). Os plantios florestais no Brasil são destinados para diferentes setores, sendo a principal utilização voltada ao abastecimento de matéria-prima para as indústrias de celulose, papel, carvão vegetal, chapas de partículas e fibras (LIMA et al., 2007).

No Brasil foi introduzido na região sudeste em meados de 1904, com o objetivo de suprir as demandas de lenha, postes e dormentes (DOSSA et al., 2002). O Brasil possui a maior área plantada de eucalipto (7,4 milhões de ha), sendo o maior produtor mundial (IBGE, 2018). A silvicultura gerou para o país R\$ 12.681.426 no ano de 2017 e desses, R\$ 10.504.592 foram provenientes somente do cultivo de eucalipto (IBGE, 2018). Em 2017, o país exportou 12,9 milhões de toneladas de celulose, se mantendo no topo dos maiores produtores desse polímero vegetal (IBÁ, 2018). Isso tornou a silvicultura responsável por 6,2% do Produto Interno Bruto (PIB) do país, gerando aproximadamente 5 milhões de empregos (IBÁ, 2018).

Neste trabalho, a temática dos endofíticos é abordada com dois objetivos. Por um lado, procura-se definir um protocolo de desinfestação de discos de folha de plantas de eucalipto em laboratório para induzir o crescimento dos endofíticos da planta. Por outro lado, procura-se saber o que há na literatura recente sobre eucalipto e endofíticos bem como a disponibilidade de sequências de DNA disponíveis para estes organismos em plataformas de domínio público.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Indução de endofíticos *in vitro*

A **coleta** do material vegetal foi realizada em agosto de 2019 na área do Programa Cooperativo Sobre Tolerância de Eucalyptus Clonais aos Estresses Hídrico e Térmico (TECHS), na Escola Agrícola de Jundiaí. Foram coletadas 27 amostras (n folhas) de 3 tipos clonais de eucalipto denominados CNB (*E. urophylla x grandis*), COP (*E. grandis x camaldulensis*), e FIB (*E. grandis x urophylla*). As amostras coletadas foram mantidas em sacos plásticos até que posteriormente ao chegar no laboratório foi acrescido água nos sacos plásticos com as amostras para sua melhor preservação, e posteriormente acondicionadas em geladeira.

A **descontaminação** das folhas foi realizada para os clones CNB, COP e FIB, 06 amostras das 27 foram escolhidas aleatoriamente. As folhas foram inicialmente lavadas com sabão e água corrente com detergente (30%). Posteriormente, sob capela de fluxo laminar, foram imersas em hipoclorito de sódio a 5% durante 25 minutos e, em seguida, foram feitas mais 5 lavagens em água destilada e autoclavada. Seguidamente, foram feitos cortes de discos para sua inoculação em placas de Petri contendo meio de cultura.

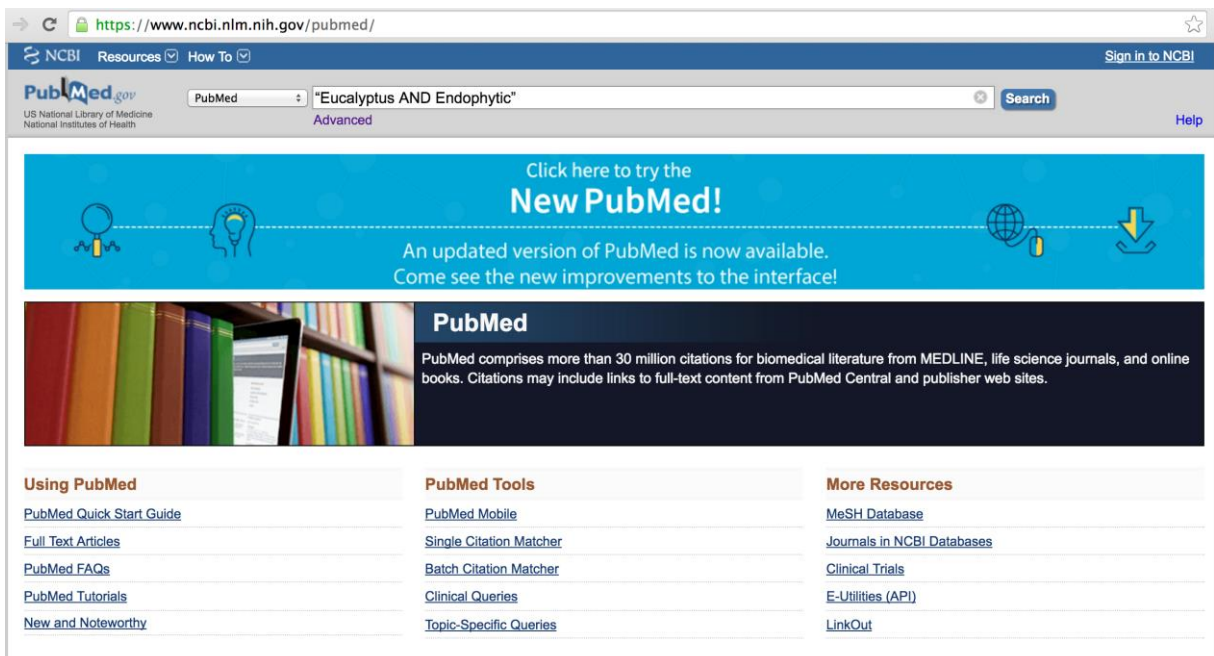
Os discos foliares foram inoculadas nas placas contendo meio MS (meio nutritivo MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 2% de ágar ajustado para pH 5,7 e previamente autoclavado. 10 discos foliares de cada amostra foram inoculados em placas de Petri contendo 20 ml de meio MS. Para cada amostra havia uma placa controle na qual não houve a descontaminação com hipoclorito a 5%.

As Placas com as amostras foram mantidas em sala de cultura com luminosidade 24hs. Após três dias foi feito o registro para verificação de crescimento dos endofíticos.

2.2. Mineração *in silico*

Para a Mineração *in silico* foi seguido o método da mineração de dados, do termo inglês data mining, o qual consiste a busca de sequências de DNA em bancos de dados de domínio público.

A análise da diversidade dos endofíticos foi feita através de estudos com duas abordagens. Num primeiro momento, foi feita uma pesquisa no banco de dados PUBMED (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) com os termos “Eucalyptus AND Endophytic” para se obter os artigos mais recentes (Figura 1). Uma vez obtidos os resultados da busca, cada artigo foi analisado quanto aos endofíticos relatados possibilitando uma segunda busca mais específica na plataforma na opção “all databases”. Os aspectos avaliados nesta busca para este trabalho foram **genoma**, **números de nucleotídeos** e **genes** encontrados nesses artigos (Figuras 2 e 3).



The image shows a screenshot of the PubMed website. The browser address bar displays <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. The page header includes the NCBI logo, navigation links for Resources and How To, and a sign-in option. The main search area features a search bar with the query "Eucalyptus AND Endophytic" and a "Search" button. Below the search bar, there is a blue banner promoting the "New PubMed" interface, stating "An updated version of PubMed is now available. Come see the new improvements to the interface!". Underneath the banner, a section titled "PubMed" describes the database as comprising more than 30 million citations for biomedical literature. At the bottom of the page, there are three columns of links: "Using PubMed" (Quick Start Guide, Full Text Articles, FAQs, Tutorials, New and Noteworthy), "PubMed Tools" (Mobile, Citation Matcher, Clinical Queries, Topic-Specific Queries), and "More Resources" (MeSH Database, Journals in NCBI Databases, Clinical Trials, E-Utilities (API), LinkOut).

Figura 1. Busca de artigos no PUBMED contendo palavras chave

The screenshot shows the PubMed homepage with a search bar containing the text "Burkholderia vietnamiensis". The search results are not yet displayed, but the search bar is set to "All Databases" and "Advanced" search mode. A banner at the top promotes the "New PubMed!" interface. Below the banner, there are sections for "Using PubMed", "PubMed Tools", and "More Resources".

Using PubMed

- [PubMed Quick Start Guide](#)
- [Full Text Articles](#)
- [PubMed FAQs](#)
- [PubMed Tutorials](#)
- [New and Noteworthy](#)

PubMed Tools

- [PubMed Mobile](#)
- [Single Citation Matcher](#)
- [Batch Citation Matcher](#)
- [Clinical Queries](#)
- [Topic-Specific Queries](#)

More Resources

- [MeSH Database](#)
- [Journals in NCBI Databases](#)
- [Clinical Trials](#)
- [E-Utilities \(API\)](#)
- [LinkOut](#)

Figura 2. Busca em todos os bancos de dados com espécie de endófito

The screenshot shows the search results page for "Burkholderia vietnamiensis". The results are organized into several categories: Literature, Genes, Proteins, Genomes, Genetics, and Chemicals. Each category has a list of sub-categories with the number of results for each.

Literature		Genes		Proteins	
Bookshelf	0	Gene	8	Conserved Domains	0
MeSH	0	GEO DataSets	5	Identical Protein Groups	91,314
NLM Catalog	0	GEO Profiles	0	Protein	361,874
PubMed	147	HomoloGene	0	Protein Clusters	1,465
PubMed Central	655	PopSet	43	Sparcle	31
				Structure	24
Genomes		Genetics		Chemicals	
Assembly	49	ClinVar	0	BioSystems	846
BioCollections	0	dbGaP	2	PubChem BioAssay	7
BioProject	18	dbSNP	0	PubChem Compound	0
BioSample	161	dbVar	0	PubChem Substance	50
Genome	2	GTR	0		
Nucleotide	10,737	MedGen	0		
Probe	1	OMIM	0		
SRA	155				
Taxonomy	0				

Figura 3. Exemplo de busca por genoma, números de nucleotídeos e genes no PUBMED

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de endofíticos *in vitro*

A indução do crescimento de endofíticos *in vitro* se fez em laboratório através da descontaminação de folhas de plantas e submissão dos fragmentos descontaminados a meios de cultura em placas de petri. Nestes experimentos, foi estabelecida que a descontaminação dos discos submetidos as condições de 5% de hipoclorito de sódio e a 5 lavagens em água destilada é ideal e exitosa. Isto se observou pelo não crescimento de fungos ou bactérias fora da área do disco, ou seja, diretamente do meio de cultura. Isto pode ser observado na Figura 1. Estes resultados são compatíveis com os descritos por Kaewkla cujas condições de descontaminação são semelhantes as empregadas neste trabalho.



Figura 4. Discos de folhas de *E. gradis x urophylla* descontaminados e induzindo o crescimento de endofitífos.

O experimento de indução foi acompanhado ao longo de 15 dias de registro para as três espécies de eucalipto estudadas. Ao longo deste período foi possível observar visualmente que diferentes fungos crescem nos discos. É possível estabelecer uma possível correlação entre a

especificidade dos endofíticos e as espécies estudadas conforme se observa na figura 5. Em eucalipto, esta especificidade foi relatada por Procópio et al (2009).

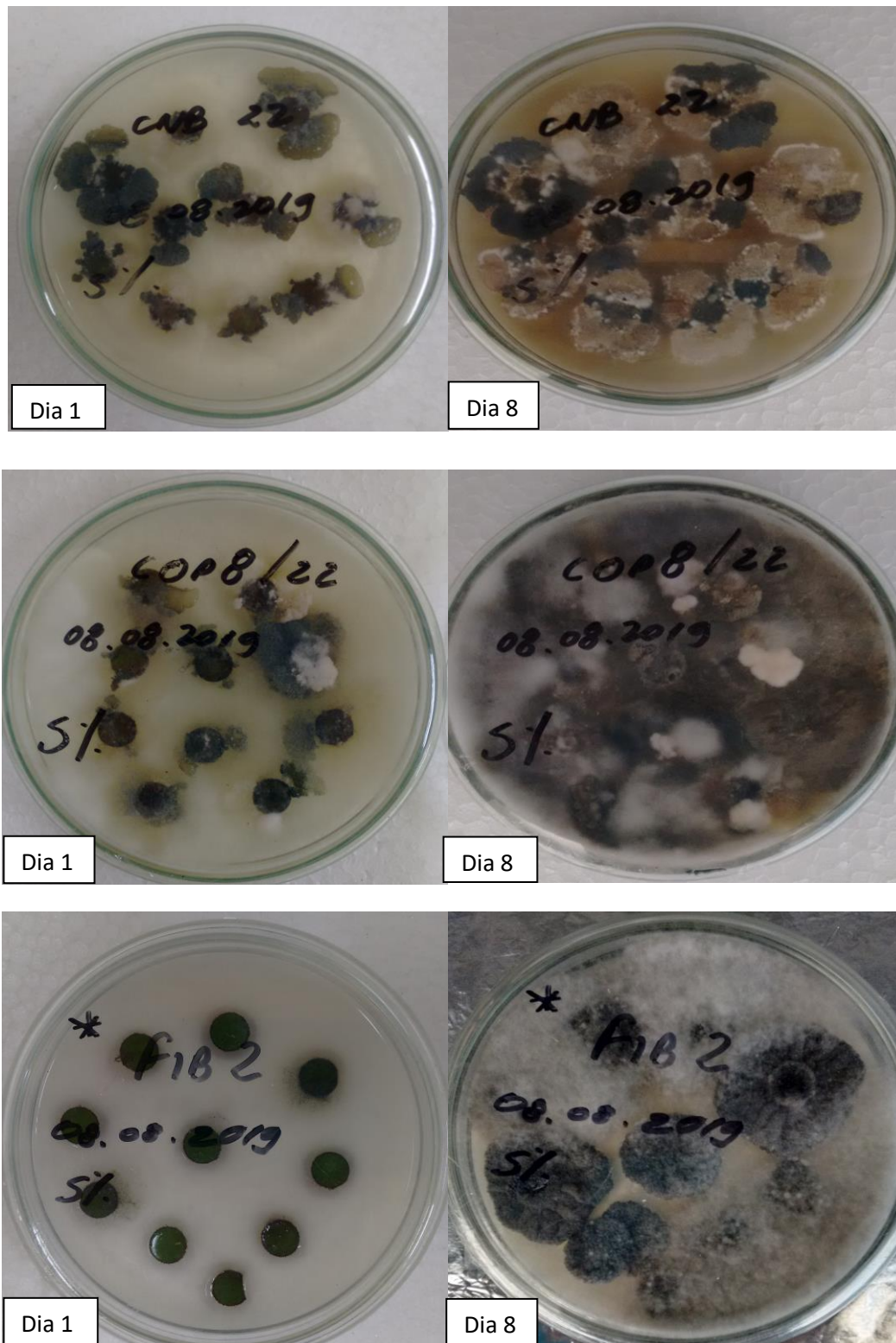


Figura 5. Crescimento de endofíticos nos fragmentos de folha de tipos clonais do Eucalipto CNB, COP e FIB.

3.2 Mineração *in silico*

Na pesquisa realizada no banco de dados do NCBI com as palavras-chave foram obtidos 27 artigos que exploraram endofíticos em eucalipto. Estes artigos são do período de 2001 a 2019. Neles, são tratadas diversas abordagens sobre endofíticos em, pelo menos, 7 espécies de eucalipto especificamente e nos demais artigos outras espécies de eucalipto também são estudados. Nesta busca de referências bibliográficas, foi possível se observar estudos com diferentes tipos de microrganismos tais como *Rhizobium* (ANGULO et al, 2014; FONSECA et al, 2018) bem como a descrição de espécies novas de endofíticos (AYLOR et al, 2009; MARTÍN-SAMPEDRO et al, 2015; OUYANG et al, 2018; KAEWKLA et al, 2010, 2011). Ao mesmo tempo, nos trabalhos encontrados, diferentes tipos de explantes são citados tais como em Esposito-Polesi et al (2015) que trabalham com brotos e caules, endofíticos obtidos a partir de sementes (FERREIRA et al, 2008) ou flores (LUPO et al, 2001). Fonseca et al (2018) traz interessantes dados sobre o microbioma da rizosfera em eucalipto num estudo sobre fixação de nitrogênio.

O levantamento bibliográfico realizado permitiu, através da busca por espécies, a identificação de sequências de DNA já depositadas em bancos de dados públicos. O critério de busca visou os primeiros resultados da página principal do PUBMED. Os resultados obtidos, mostrados em resumo na tabela 1., permitem observar que um grande número de genomas e, sobretudo, de genes (618.716) já está disponível. Isto é de grande interesse para estudos futuros uma vez que permite o desenho de oligonucleotídeos para PCR - Reação de polimerização em cadeia que possibilitará, por sua vez, a identificação por sequenciamento das espécies de endofíticos presentes nas plantas de eucalipto.

Tabela 1. Dados obtidos dos artigos encontrados na plataforma PUBMED.

	Organismos	Genomas	Nucleotídeos	Genes	Referências
1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	2	10.737	8	KANAGENDRAN et al (2019)
2	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	1	1.183	0	YONGPISANPHOP et al (2019)
3	<i>Chaetomium</i> sp	0	1.373	0	OUYANG et al (2018)
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	40.743	4.393	PAZ et al (2018)
5	Gênero <i>Mycobacterium</i>	0	794	3	FONSECA et al (2018)
5	gênero <i>Bradyrhizobium</i>	0	1.094	0	FONSECA et al (2018)
5	Gênero <i>Streptomyces</i>	0	845	0	FONSECA et al (2018)
5	Gênero <i>Bacillus</i>	1	3.312	3	FONSECA et al (2018)
5	Gênero <i>Actinospica</i>	0	0	0	FONSECA et al (2018)
5	Gênero <i>Burkholderia</i>	0	2.386	1	FONSECA et al (2018)
6	<i>Trichoderma</i>	19	291.353	81.980	ROCHA et al (2017)
7	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	1	3.677	15	MARSBERG et al (2017)
8	<i>Chrysosporthe austroafricana</i>	1	113	125	MAUSSE-SITOE et al (2016)
9	<i>Novosphingobium barchaimii</i>	1	418	0	MIGUEL et al (2016)
9	<i>Rhizobium grahamii</i>	1	357	1	MIGUEL et al (2016)
9	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>	1	425	0	MIGUEL et al (2016)
9	<i>P. darwinianus</i>	0	428	0	MIGUEL et al (2016)
9	<i>Paenibacillus terrigena</i>	1	182	2	MIGUEL et al (2016)

9	<i>Terrabacter lapilli</i>	1	22	0	MIGUEL et al (2016)
10	Sem espécies				ESPOSITO-POLESI et al (2015)
11	<i>Ulocladium sp</i>	0	165	0	MARTÍN-SAMPEDRO et al (2015)
11	<i>Hormonema sp</i>	0	109	0	MARTÍN-SAMPEDRO et al (2015)
12	<i>A.phenanthrenivorans</i>	1	543	4.281	ANGULO et al (2014)
12	<i>B. cereus</i>	3	83.532	1080	ANGULO et al (2014)
12	<i>B. amyloliquefaciens</i>	1	24.840	79	ANGULO et al (2014)
12	<i>R. aquatilis</i>	0	233	18	ANGULO et al (2014)
13	Família Mycosphaerellaceae	38	236.006	58.366	KEMLER et al (2013)
13	Família Teratosphaeriaceae	8	52.845	10.552	KEMLER et al (2013)
13	Ordem Dothideales	6	120.418	32.901	KEMLER et al (2013)
13	Família Botryosphaeriaceae	10	48.182	10.841	KEMLER et al (2013)
13	Família Pleosporaceae	28	262.828	113.721	KEMLER et al (2013)
13	Família Nectriaceae	85	562.074	172.707	KEMLER et al (2013)
13	Família Taphrinaceae	9	7.194	0	KEMLER et al (2013)
13	Família Filobasidiaceae	2	3.421	0	KEMLER et al (2013)
13	Ordem Sporidiobolales	11	52.426	15.661	KEMLER et al (2013)
14	<i>Streptomyces spp.</i>	0	26.741	16	KAEWKLA & FRANCO (2012)
15	<i>B. licheniformis</i>	1	63.324	138	PAZ et al (2012)
15	<i>B. subtilis</i>	4	654.272	3.660	PAZ et al (2012)

16	<i>Promicromonospora endophytica</i> sp. nov.	0	2	0	KAEWKLA & FRANCO (2011)
17	<i>Pantoea agglomerans</i>	1	7.467	7.227	DE LIMA et al (2011)
18	<i>Flindersiella endophytica</i> gen. nov., sp. nov.	0	2	0	KAEWKLA & FRANCO (2010)
19	<i>Pseudonocardia eucalypti</i> sp. nov.	0	2	0	KAEWKLA & FRANCO (2010)
20	<i>Pseudonocardia adelaidensis</i> sp. nov.	0	2	0	KAEWKLA & FRANCO (2011)
21	<i>Pantoea</i>	27	59.887	25.268	PROCÓPIO et al (2009)
21	<i>Agrobacterium</i> sp	1	7739	638	PROCÓPIO et al (2009)
21	<i>Curtobacterium</i> sp	0	13.474	3.523	PROCÓPIO et al (2009)
21	<i>Brevibacillus</i> sp	1	5.863	98	PROCÓPIO et al (2009)
21	<i>Pseudomonas</i> sp	1	798.237	16.584	PROCÓPIO et al (2009)
21	<i>Acinetobacter</i> sp	1	80.702	7.259	PROCÓPIO et al (2009)
21	<i>Burkholderia cepacia</i>	1	73.892	9.018	PROCÓPIO et al (2009)
21	<i>Lactococcus lactis</i>	1	150.845	8.527	PROCÓPIO et al (2009)
22	<i>Dothiorella moneti</i>	0	13	0	TAYLOR et al (2009)
22	<i>Dothiorella santali</i>	0	9	0	TAYLOR et al (2009)
22	<i>Neofusicoccum pennatisporum</i>	0	6	0	TAYLOR et al (2009)
22	<i>Aplosporella yalgorensis</i>	0	9	0	TAYLOR et al (2009)
22	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	1	3.677	15	TAYLOR et al (2009)
22	<i>Dichomera eucalypti</i>	0	53	0	TAYLOR et al (2009)
22	<i>Neofusicoccum australe</i>	0	759	0	TAYLOR et al (2009)
23	<i>P. ananatis</i>	1	1557	123	TORRES et al (2008)

23	<i>P. stewartii</i>	1	556	1	TORRES et al (2008)
23	<i>Enterobacter sp</i>	1	34.569	510	TORRES et al (2008)
23	<i>E. homaechei</i>	0	0	0	TORRES et al (2008)
24	<i>Bacillus sp.</i>	1	196.032	955	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Bacillus megaterium</i>	1	30.005	8.399	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Enterococcus mundtii</i>	1	5.151	3.276	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Methylobacterium sp.</i>	1	51.229	5.310	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Methylobacterium variabile</i>	1	1.135	0	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Methylobacterium gregens</i>	0	1	0	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Paracoccus sp.</i>	0	1	0	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Paenibacillus sp.</i>	1	49.513	88	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Paenibacillus humicus</i>	1	274	0	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i>	1	33	0	FERREIRA et al (2008)
24	<i>Frankiaceae</i>	20	32.976	4.767	FERREIRA et al (2008)
25	<i>Cytospora chrysosperma</i>	1	561	0	LUPO et al (2001)
25	<i>Fusicoccum eucalypti</i>	0	8	0	LUPO et al (2001)
26	<i>Tremelloscypha gelatinosa</i>	0	7	0	GLEN et al (2002)
26	<i>Sebacina dimitica</i>	0	23	0	GLEN et al (2002)
26	<i>Tremellodendron pallidum</i>	0	15	0	GLEN et al (2002)
27	<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	1	17.713	6.578	SORRELL (2001)
Total		306	4.182.587	618.716	

4. CONCLUSÃO

O trabalho realizado permitiu a abordagem dos dois objetivos principais, a indução de endofíticos em eucalipto e a mineração de dados moleculares. Quanto a indução de endofíticos foi possível estabelecer um protocolo inicial de descontaminação de discos de folhas a partir do uso de concentrações de hipoclorito de sódio a 5%. Ao mesmo tempo, também foi possível se observar o crescimento de fungos e bactérias a partir das bordas dos discos foliares que, provavelmente, constituem microrganismos endofíticos. É possível estabelecer uma relação entre as três diferentes espécies utilizadas e a diversidade de microrganismos observada. Com relação à análise *in silico* a busca de artigos nos bancos de dados públicos forneceu um número considerável de informações. Neste levantamento foram identificados 306 genomas, 4.182.587 nucleotídeos sequenciados e 618.716 genes em organismos endofíticos relacionados com a planta do eucalipto. Estes acessos vão constituir a base para a escolha de primers para realização de reações de polimerização em cadeia - PCR e se proceder a identificação molecular desses microrganismos. Este trabalho é então a base para estudos futuros mais precisos com a microbiota presente nas plantas de eucalipto.

5. REFERÊNCIAS

- ANGULO VC, SANFUENTES EA, RODRÍGUEZ F, SOSSA KE. Characterization of growth-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus nitens* seedlings. *Rev Argent Microbiol.* 2014 Oct-Dec;46(4):338-47. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70093-8. Spanish.
- ARAUJO, W. L. Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros. Dissertação de Mestrado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 111p, 1996.
- ARAUJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKINSKYSOBRAL, J.; LACAVAL, PT. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002. 86p.
- CARVALHO, A.D.F.; PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS. Seminários em Genética e Melhoramento de Plantas, 2006. Departamento de Genética -Piracicaba – SP. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/ADFCarvalho-200602-Resumo.pdf>>. Acesso em: 28 de outubro de 2015.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. *Rev. Virtual Quim.*, 2013, 5 (3), 421-437. Data de publicação na Web: 11 de novembro de 2012.
- DE BARY, A. *Morphologie und physiologie der Pilze, Flechhten und Myxomyceten.* Leipzig:Engelamn, 1866, 316p.
- DE LIMA PROCÓPIO RE, ARAÚJO WL, ANDREOTE FD, AZEVEDO JL. Characterization of a small cryptic plasmid from endophytic *Pantoea agglomerans* and its use in the construction of an expression vector. *Genet Mol Biol.* 2011 Jan;34(1):103-9. doi: 10.1590/S1415-47572010005000096. Epub 2011 Mar 1.
- DOSSA, D. SILVA, H. D. da BELLOTE, A. F. J. RODIGHIERI, H. R. *Produção e Rentabilidade do Eucalipto em Empresas Florestais.* Colombo, Embrapa Florestas, 2002. 4p. (Comunicado Técnico, 83).
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. *Eucalyptus*, 2000. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/folder_eucalyptus_junho2000ID-pEiTdesAUE.PDF> Disponível em: Acesso em: 02 de novembro de 2015.
- ESPOSITO-POLESI NP, DE ANDRADE PA, DE ALMEIDA CV, ANDREOTE FD, DE ALMEIDA M. Endophytic bacterial communities associated with two explant sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015 Nov;31(11):1737-46. doi: 10.1007/s11274-015-1924-0. Epub 2015 Sep 16.
- FERREIRA A, QUECINE MC, LACAVAL PT, ODA S, AZEVEDO JL, ARAÚJO WL. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2008 Oct;287(1):8-14. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01258.x
- FONSECA EDS, PEIXOTO RS, ROSADO AS, BALIEIRO FC, TIEDJE JM, RACHID CTCDC. The Microbiome of *Eucalyptus* Roots under Different Management Conditions and Its Potential for Biological Nitrogen Fixation. *Microb Ecol.* 2018 Jan;75(1):183-191. doi: 10.1007/s00248-017-1014-y. Epub 2017 Jun 21. Erratum in: *Microb Ecol.* 2017 Dec 2;:.

GLEN M, TOMMERUP IC, BOUGHER NL, O'BRIEN PA. Are Sebacinaceae common and widespread ectomycorrhizal associates of Eucalyptus species in Australian forests? Mycorrhiza. 2002 Oct;12(5):243-7. Epub 2002 Jun 29.

HELANDERM M.L.;RATIO-LEHTIMAKI---Effects of watering and simulated acid raiz on quality of phyllosphere fungi of Birch leaves. Microbial Ecology, v. 19, p. 119-125, 1990.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES(IBA). Relatório 2017. Disponível em: <iba.org/images/shared/biblioteca/iba_relatorioanual2017.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. Disponível em:<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/291>. Acesso em: 30 out. 2018.

KAEWKLA O, FRANCO CM. Flindersiella endophytica gen. nov., sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the root of Grey Box, an endemic eucalyptus tree. Int J Syst Evol Microbiol. 2011 Sep;61(Pt 9):2135-40. doi: 10.1099/ijms.0.026757-0. Epub 2010 Oct 1.

KAEWKLA O, FRANCO CM. Pseudonocardia eucalypti sp. nov., an endophytic actinobacterium with a unique knobby spore surface, isolated from roots of a native Australian eucalyptus tree. Int J Syst Evol Microbiol. 2011 Apr;61(Pt 4):742-6. doi: 10.1099/ijms.0.022327-0. Epub 2010 Apr 23.

KAEWKLA O, FRANCO CM. Pseudonocardia adelaidensis sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of a grey box tree (Eucalyptus microcarpa). Int J Syst Evol Microbiol. 2010 Dec;60(Pt 12):2818-22. doi: 10.1099/ijms.0.019208-0. Epub 2010 Jan 15. Erratum in: Int J Syst Evol Microbiol. 2011 Mar;61(3):700.

KAEWKLA O, FRANCO CM. Promicromonospora endophytica sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the root of an Australian native Grey Box tree. Int J Syst Evol Microbiol. 2012 Jul;62(Pt 7):1687-91. doi: 10.1099/ijms.0.033258-0. Epub 2011 Sep 2.

KAEWKLA O, FRANCO CM. Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from Australian native trees. Microb Ecol. 2013 Feb;65(2):384-93. doi: 10.1007/s00248-012-0113-z. Epub 2012 Sep 14.

KANAGENDRAN A, CHATTERJEE P, LIU B, SA T, PAZOUKI L, NIINEMETS Ü. Foliage inoculation by Burkholderia vietnamiensis CBMB40 antagonizes methyl jasmonate-mediated stress in Eucalyptus grandis. J Plant Physiol. 2019 Aug 22;242:153032. doi: 10.1016/j.jplph.2019.153032.

KEMLER M, GARNAS J, WINGFIELD MJ, GRYZENHOUT M, PILLAY KA, 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. 2013 Dec 16;8(12):e81718. doi: 10.1371/journal.pone.0081718. eCollection 2013.

LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAUJO, W.L. & AZEVEDO, J.L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR e DGGE. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 41, n. 4, p. 637-642, 2006.

LIMA, C. K. P. *et al.* Características anatômicas e química da madeira de clones de *Eucalyptus* e sua influência na clonagem. Cerne, Lavras, v. 13, n. 2, p. 123-129, 2007

LUPO S, Tiscornia S, Bettucci L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of Eucalyptus globulus. Rev Iberoam Micol. 2001 Mar;18(1):38-41.

MARSBERG A, KEMLER M, JAMI F, NAGEL JH, POSTMA-SMIDT A, NAIDOO S, WINGFIELD MJ, CROUS PW, SPATAFORA JW, HESSE CN, ROBBERTSE B, MARTÍN-SAMPEDRO R, FILLAT Ú, IBARRA D, EUGENIO ME. Use of new endophytic fungi as pretreatment to enhance

enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus*. *Bioresour Technol.* 2015 Nov;196:383-90. doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.088. Epub 2015 Jul 29.

MAUSSE-SITOE SN, RODAS CA, WINGFIELD MJ, CHEN S, ROUX J. Endophytic Cryphonectriaceae on native Myrtales: Possible origin of *Chrysosporthe* canker on plantation-grown *Eucalyptus*. *Fungal Biol.* 2016 Jun-Jul;120(6-7):827-35. doi: 10.1016/j.funbio.2016.03.005. Epub 2016 Mar 22.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L.de. *Ecologia Microbiana*. ed. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1998. 488p.

MIGUEL PS, DE OLIVEIRA MN, DELVAUX JC, DE JESUS GL, BORGES AC, TÓTOLA MR, NEVES JC, COSTA MD. Diversity and distribution of the endophytic bacterial community at different stages of *Eucalyptus* growth. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2016 Jun;109(6):755-71. doi: 10.1007/s10482-016-0676-7. Epub 2016 Mar 24.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, v. 15, p. 473–497, 1962.

NETO, P. A. de S. P.; AZEVEDO, J. L. & ARAUJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biociencia* 2002, Brasília, v.29, p. 62-76, 2002.

OUYANG J, MAO Z, GUO H, XIE Y, CUI Z, SUN J, WU H, WEN X, WANG J, SHAN T. Mollicellins O-R, Four New Depsidones Isolated from the Endophytic Fungus *Chaetomium* sp. Eef-10. *Molecules.* 2018 Dec 5;23(12). pii: E3218. doi: 10.3390/molecules23123218.

PAZ IC, SANTIN RC, GUIMARÃES AM, ROSA OP, DIAS AC, QUECINE MC, AZEVEDO JL, MATSUMURA AT. *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. *Genet Mol Res.* 2012 Oct 11;11(4):3711-20. doi: 10.4238/2012.August.17.9.

PAZ ICP, SANTIN RCM, GUIMARÃES AM, ROSA OPPD, QUECINE MC, SILVA MCPE, AZEVEDO JL, MATSUMURA ATS. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Calonectria gracilis* by eucalypts growth promoters *Bacillus* spp. *Microb Pathog.* 2018 Aug;121:106-109. doi: 10.1016/j.micpath.2018.05.026. Epub 2018 May 17.

PEREIRA, J.O. Fungos Endofíticos dos Hospedeiros Tropicais. 1996. 104 p. Tese de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 104p, 1993.

PROCÓPIO RE, ARAÚJO WL, MACCHERONI W JR, AZEVEDO JL. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. *Genet Mol Res.* 2009 Nov 24;8(4):1408-22. doi: 10.4238/vol8-4gmr691.

RODRIGUES, K.F.; DIAS-FILHO, M.B. 1996. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. *Pesq. Agropec. Bras.* 31(12): 905-909, 1996.

ROCHA SL, EVANS HC, JORGE VL, CARDOSO LAO, PEREIRA FST, ROCHA FB, BARRETO RW, HART AG, ELLIOT SL Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. *R Soc Open Sci.* 2017 Apr 5;4(4):160628. doi: 10.1098/rsos.160628. eCollection 2017 Apr.

SLIPPERS B. *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Mol Plant Pathol.* 2017 May;18(4):477-488. doi: 10.1111/mpp.12495. Epub 2016 Dec 13. Review

SORRELL TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol.* 2001 Apr;39(2):155-68.

SOUZA et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. Acta Amazonica VOL. 34(2) 2004: 185 – 195.

TAYLOR K, BARBER PA, ST J HARDY GE, BURGESS TI. Botryosphaeriaceae from tuart (*Eucalyptus gomphocephala*) woodland, including descriptions of four new species. Mycol Res. 2009 Mar;113(Pt 3):337-53. doi: 10.1016/j.mycres.2008.11.010. Epub 2008 Dec 6.

TORRES AR, ARAÚJO WL, CURSINO L, HUNGRIA M, PLOTTEGHER F, MOSTASSO FL, AZEVEDO JL. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. J Microbiol. 2008 Aug;46(4):373-9. doi: 10.1007/s12275-007-0165-9. Epub 2008 Aug 31.

YONGPISANPHOP J, BABEL S, KURISU F, KRUATRACHUE M, POKETHITIYOOK P. Isolation and characterization of Pb-resistant plant growth promoting endophytic bacteria and their role in Pb accumulation by fast-growing trees. Environ Technol. 2019 May 9:1-9. doi: 10.1080/09593330.2019.1615993.