

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Investigação da microbiota endofítica onipresente em  
microplantas “axênicas”**

**Natalia Pimentel Esposito Polesi**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e  
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba  
2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Natalia Pimentel Esposito Polesi  
Engenheiro Agrônomo

**Investigação da microbiota endofítica onipresente em  
microplantas “axênicas”**

Orientador:  
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e  
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba  
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Polesi, Natalia Pimentel Esposito

Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas "axênicas" / Natalia Pimentel Esposito Polesi. - - Piracicaba, 2010.  
120 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.  
Bibliografia.

1. Cultura de tecidos vegetais 2. DNA 3. Micropropagação vegetal 4. Microrganismos endofíticos 5. Plantas hospedeiras 6. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDD 631.53  
P765r

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

*Dedico este trabalho aos meus pais **Nilson e Marineusa**, que sempre demonstraram o exercício do amor e da dedicação, além de me auxiliarem durante toda minha vida servindo de exemplo de conduta moral e profissional; aos meus irmãos **Marcelo e Márcio** que sempre acreditaram em mim, me apoiando e estiveram presentes mesmo distantes; à minha mais nova família: **Roberta, Ana, Cida, Chicão, Valéria, Junior, Gabriel, Rogério, Elisângela e Thais** que me ajudaram a diminuir as dificuldades de se estar longe da família abrindo suas portas e seus corações para que pudesse ser parte de suas vidas; e como não podia deixar de ser dedico este trabalho ao meu marido **Luis Fernando**, que sem o qual este trabalho não teria sido possível, que sempre esteve do meu lado com todo amor, carinho e paciência!*



## AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida, pelas pessoas que colocou em meu caminho, pela possibilidade de realizar um trabalho tão edificante e satisfatório, e por me auxiliar nos momentos de dificuldade e aflição.

À minha família por permitir que pudesse vir para Piracicaba estudar, pelo apoio sentimental e financeiro, pelo amor dedicado a mim e por acreditar que eu pudesse conseguir realizar meu sonho e alcançar meus objetivos, mesmo que por vezes parecesse tão distante ou impossível de serem atingidos.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e ao Departamento de Ciências Biológicas (LCB/ESALQ/USP) por disponibilizar suas instalações e equipamentos para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pelo voto de confiança, pelo apoio num momento de dúvida e angústia, por confiar a mim um trabalho tão fascinante, pela orientação, dedicação, amizade, pela maneira carinhosa e afetiva com que resolve os problemas e pela alegria em trabalhar e ensinar, servindo como alguém em quem eu deva me espelhar na minha vida profissional.

À Dra. Cristina Vieira de Almeida pelo carinho com que fui recebida no meu primeiro dia de Laboratório, pelo entusiasmo contagiante em trabalhar, pelo carinho e afeto maternos, que auxiliaram muito na realização do meu trabalho e por me guiar pelo fantástico mundo dos microrganismos.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos (CEBTEC) do Departamento de Ciências Biológicas e ao Laboratório de Fisiologia de Árvores do Departamento de Ciências Florestais, pela concessão das microplantas utilizadas neste trabalho, aos professores Helaine Carrer e Antonio Natal Gonçalves pela cooperação e apoio, e aos Técnicos Antonio Francisco de Campos Amaral e José Roberto Romanini pela paciência e auxílio durante a realização das análises.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai por permitir que pudesse realizar minhas análises moleculares no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA, pelo carinho e atenção com que fui recebida, auxiliada e orientada.

Aos Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e Francisco André Ossamu Tanaka por me receberem e ensinarem as técnicas de microscopia de varredura e de transmissão, pela amizade e pelo auxílio no uso dos equipamentos e na captura das imagens.

Ao Prof. Dr. João Lúcio Azevedo e aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela colaboração e auxílio na compreensão de diferentes técnicas e formas de analisar os microrganismos.

Ao meu amado marido, Luis Fernando Polesi, pelo amor, carinho e paciência dedicados a mim, por estar sempre perto com alguma palavra amiga e de incentivo, pela ajuda na realização do meu trabalho e na confecção da dissertação, pelo apoio sempre com muita disposição e compreensão nos momentos difíceis, além da confiança depositada em mim.

À Dra. Monita Fiori de Abreu Tarazi pela solidariedade, amizade, carinho e paciência na resolução de minhas dúvidas e pelo apoio efetivo na execução de muitas análises.

À equipe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA Acácio, Ademir, Aline, Amanda, Bianca, Bianca “manauara”, Caio, Camila, Chiquinho, Dani, Elias, Enéas, Ezio, Fabi, Fabio, Fernanda, Lilian, Lucas, Ludmila, Lucy, Maju, Mari, Mariana, Marquinhos, Marcon, Medau, Milena, Othon, Renata, Rodrigo e Wagner, pela amizade, pelo auxílio e por me ensinarem diversas técnicas de biologia molecular

Aos Amigos do Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva da ESALQ Cássia, Érika, Gabi, Gilvano, Heron, Katherine, Kátia, Laura, Malu, Marcela, Maysa, e Thais, pelos momentos de alegria, descontração e amizade que me proporcionaram, tornando o trabalho bem mais leve e prazeroso, e pelo auxílio e paciência em me ensinar muitas técnicas que utilizei neste trabalho.

Aos meus amigos Carol, Ester, Fred e David pela amizade, companheirismo, apoio e pelos inúmeros momentos de descontração, regados a muita comida e música, fazendo com minha vida fosse mais alegre e divertida.

À FAPESP, processo nº 2008/07535-9, pela concessão da bolsa de mestrado para realização do projeto.

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos Específicos .....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
3.1 Cultura de Tecidos Vegetais .....	17
3.2 Plantas Axênicas.....	19
3.3 Microrganismos Endofíticos .....	20
3.3.1 Aplicações na Agricultura .....	23
3.3.1.1 Controle Biológico .....	23
3.3.1.2 Promoção de Crescimento .....	25
3.3.1.3 Fixação Biológica de Nitrogênio .....	27
3.3.1.4 Solubilização de Fósforo .....	29
3.3.2 Aplicação Farmacológica .....	30
3.3.3 Implicação na Cultura de Tecidos .....	32
3.3.4 Métodos de Análise .....	33
3.3.4.1 Análise Histológica da Planta Hospedeira.....	33
3.3.4.2 Isolamento.....	34
3.3.4.3 Análise Molecular .....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Material Vegetal .....	40
4.2 Microplantas.....	41
4.2.1 Testes Histoquímicos .....	41
4.2.2 Análises Ultraestruturais.....	42
4.2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	42
4.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	42
4.2.3 Análise Molecular .....	43

4.2.3.1	Extração do DNA Genômico Total das Microplantas .....	44
4.2.3.2.	Amplificação do Gene 16S rRNA de Bacteria.....	45
4.2.3.3	PCR-DGGE.....	46
4.2.3.4	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) .....	46
4.2.4	Isolamento de Microrganismos Endofíticos .....	47
4.2.4.1	Primeira Fase.....	47
4.2.4.2	Segunda Fase.....	49
4.3	Isolados .....	50
4.3.1	Extração do DNA dos Microrganismos Isolados.....	50
4.3.2	Amplificação do Gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> .....	50
4.3.3	Sequenciamento .....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
5.1	Microplantas .....	53
5.1.1	Testes Histoquímicos.....	53
5.1.2	Análise Ultraestrutural.....	60
5.1.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	60
5.1.2.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	67
5.1.3	Análise Molecular.....	73
5.1.3.1	Extração do DNA Genômico Total das Microplantas .....	73
5.1.3.2	Amplificação do Gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> .....	74
5.1.3.3	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) .....	77
5.1.4	Isolamento .....	84
5.2	Isolados .....	90
5.2.1	Sequenciamento .....	90
5.2.1.1	Gênero <i>Bacillus</i> .....	91
5.2.1.2	Gênero <i>Methylobacterium</i> .....	94
5.2.1.3	Gênero <i>Acinetobacter</i> .....	96
6	CONCLUSÃO .....	99
	REFERÊNCIAS .....	101

## RESUMO

### **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”.**

A cultura de tecidos tem sido uma importante ferramenta amplamente utilizada para diversas finalidades, dentre elas a micropropagação tem merecido destaque devido à rápida produção de mudas saudáveis num espaço físico reduzido. Dentro deste contexto, o termo, plantas axênicas, tem sido difundido como um ideal a ser atingido nesta técnica, havendo a busca cada vez maior de métodos que eliminem de forma eficaz toda e qualquer contaminação que possa, eventualmente, crescer no meio de cultura. No entanto, cada vez mais se observa que a concepção de contaminação dentro da cultura de tecidos deve ser revista, assim como a de planta axênica, pois inúmeros trabalhos têm mostrado, que mesmo em microplantas assintomáticas consideradas axênicas, existe uma comunidade endofítica onipresente e que na sua grande maioria desempenha papel fundamental no estabelecimento, desenvolvimento e aclimatização das culturas, sendo, portanto, microrganismos benéficos que devem ser conservados no cultivo *in vitro*. Dessa forma, o presente trabalho teve como principal objetivo investigar a microbiota endofítica presente em diversas espécies de microplantas assintomáticas consideradas “axênicas”, independente de seu protocolo de cultivo *in vitro*, local, método de micropropagação e manipulação. Para tal, foram utilizadas microplantas assintomáticas, em fase de multiplicação por mais de um ano, provenientes de três laboratórios diferentes, submetidas à caracterização por meio de testes histoquímicos, à análises ultraestruturais, a isolamento em diferentes meios de cultura por dois métodos (trituração e fragmentação), à análises moleculares utilizando a extração do DNA genômico total e PCR-DGGE, além da extração e sequenciamento do DNA dos isolados obtidos. Os resultados obtidos pelo isolamento, testes moleculares e análises ultraestruturais, evidenciaram a presença de uma comunidade endofítica, colonizando os tecidos de diferentes espécies de microplantas, provenientes de três laboratórios distintos. Dessa forma, conclui-se que a inexistência de plantas axênicas deve ser considerada, futuramente, como um aspecto positivo dentro da cultura de tecidos, uma vez que, essa comunidade endofítica pode atribuir características de interesse agrônômico às diferentes espécies vegetais.

Palavras-chave: Microplantas; Axênicas; Endofíticos; Onipresença; DNA; PCR-DGGE



## ABSTRACT

### **Investigation of ubiquitous endophytic microbiota in "axenic" microplants.**

Tissue culture has been an important tool widely used for various purposes, among them the micropropagation has been highlighted due to the rapid production of healthy seedlings in a small space. Within this context, the term axenic plant has been distributed as an ideal to be achieved in this technique, which the search based on numerous methods that effectively eliminate any contamination that may eventually grow into the culture medium. However, it is seen that the conception of contamination in tissue culture should be reviewed as well as axenic plants, because several studies have shown that even in asymptomatic microplants considered axenic, there is an ubiquitous and that the endophytic community mostly plays a fundamental role in the establishment, development and acclimatization of cultures, therefore, beneficial microorganisms that should be preserved *in vitro*. Thus, this study aimed to investigate the endophytic microbiota present in several species of micro asymptomatic considered "axenic" regardless of their protocol for *in vitro* culture, location, method of micropropagation and manipulation. For this purpose, were used asymptomatic microplants in multiplication stage by more than one year, from three different laboratories, and were submitted to characterization by histochemistry tests, ultrastructural analysis, isolation in different culture medium by two methods (grinding and fragmentation), molecular analyses using the extraction of total genomic DNA and PCR-DGGE, in addition to extracting and sequencing the DNA of the isolates obtained. The results obtained by the isolation, molecular and ultrastructural analysis, showed the presence of an endophytic community colonizing the tissues of different species of microplants, from three different laboratories. Thus, it was concluded that the inexistence of axenic plants should be considered in future as a positive aspect in the tissue culture, since this endophytic community can give agronomical traits to different crop species.

Keywords: Microplants; Axenic; Endophytic; Ubiquitously; DNA; PCR-DGGE



## 1 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais é amplamente utilizada com diversas finalidades, dentre elas a micropropagação tem merecido destaque devido à rápida produção de mudas saudáveis num espaço físico reduzido (ALVARES; CALDAS, 2002; DONATO et al., 2005; LIMA; MORAES, 2006). Inúmeros fatores determinam o sucesso da cultura de tecidos, no entanto, o mais importante deles é a contaminação microbiana, sendo a razão de muitos estudos. A contaminação dos explantes é, indubitavelmente, o mais severo transtorno para a técnica de micropropagação de plantas por ser um dos principais responsáveis por perdas severas em biofábricas e laboratórios de pesquisa (DANTAS; OLIVEIRA; CÂMARA, 2002; DONATO et al., 2005).

Na técnica *in vitro* a contaminação dos tecidos é devida à presença de microrganismos epifíticos, oportunistas ou patogênicos, que podem penetrar nos tecidos através de fendas na epiderme, pelos estômatos, ou ainda por microlesões, causando no meio de cultivo, severa contaminação. A contaminação microbiana pode, também, estar associada a uma desinfestação ineficiente da superfície do explante, ou ao manuseio incorreto durante a subcultura (LONDE et al., 2007; PANICKER et al., 2007).

A microplanta denominada axênica é aquela cultivada em condições assépticas e que durante todo o seu desenvolvimento não se constata a presença de nenhum microrganismo. Entretanto, esporadicamente, após um período de estresse mecânico, físico ou nutricional, observa-se o crescimento de pequenas colônias de microrganismos no meio de cultura ou sobre as microplantas, até então assintomáticas (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; THOMAS; PRAKASH, 2004; THOMAS; PRABHAKARA; PITCHAIMUTHU, 2006; THOMAS et al., 2008).

Como explicar, então, que microplantas assintomáticas e axênicas possam apresentar em seu interior algum tipo de microrganismo? Tal questionamento tem sido o foco de muitas pesquisas que sugerem que esses microrganismos sejam endofíticos, fato esse extensivamente estudado em plantas cultivadas *in vivo*, mas até então desconhecidos no cultivo *in vitro*.

Recentes observações comprovam a existência de endofíticos em culturas *in vitro* consideradas axênicas (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA; YARA; ALMEIDA,

2005; ALMEIDA et al., 2009; THOMAS et al., 2008). Dessa forma, o que se acreditava ser contaminação, frequentemente atribuída a uma má desinfestação, pode ser na realidade o crescimento de endófitos presentes no interior da planta, não eliminados pelos desinfetantes utilizados (PANICKER et al., 2007). Na maioria das vezes, esses microrganismos não se manifestam de forma visível e nem crescem no meio de cultura, sendo observados somente em análises microscópicas das plantas micropropagadas, contradizendo, portanto, a suposição de que estas plantas são isentas de microrganismos (BARROW; OSUNA-AVILA; REYES-VERA, 2004).

A presença desses endófitos não necessariamente afeta negativamente o desenvolvimento das microplantas, inferindo-se inclusive, tratar-se de uma associação neutra ou benéfica. Até o final da década de 70 desconheciam-se os efeitos benéficos ou maléficos dos microrganismos endófitos. No entanto, estudos posteriores revelaram propriedades de interesse, como a proteção contra predadores e patógenos. Atualmente, outras propriedades importantes lhes são atribuídas, como o aumento da resistência a condições de estresse, alterações de propriedades fisiológicas, produção de fitormônios, toxinas, fármacos e compostos de interesse biotecnológico, como enzimas (AZEVEDO et al., 2000; STAMFORD et al., 2001, 2002; STROBEL, 2003; SUTO et al., 2002; THOMAS; KUMARI, 2010). Sob este ponto de vista, segundo Pamphile e Azevedo (2002), os produtores devem levar em consideração não somente as vantagens e atribuições genéticas das plantas, mas também os endófitos que ela abriga, podendo contribuir para um aumento nas características de interesse agrônomo.

Dessa forma, o conceito de planta axênica deve ser revisto e aprimorado, de modo que seja considerada a existência de uma microbiota endófitica nas microplantas. Sendo assim, torna-se evidente a necessidade de estudos aprofundados para melhor compreender essa associação de maneira a contestar o paradigma de que plantas cultivadas sob condições assépticas, sejam caracterizadas como axênicas, inferindo-se que existe uma microbiota onipresente em todas as espécies vegetais. Por essas razões, este estudo se fundamentou nas seguintes hipóteses: 1 – existe semelhança na microbiota endófitica entre laboratórios distintos? e 2 – há semelhança entre a microbiota endófitica de diferentes espécies de microplantas?

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a microbiota endofítica em diversas espécies de microplantas assintomáticas consideradas “axênicas”, independente de seu protocolo de cultivo *in vitro*, local e método de micropropagação.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar e comparar as diferentes espécies de microplantas por meio de testes histoquímicos;
- b) Confirmar a presença da microbiota endofítica de microplantas “axênicas” cultivadas em diferentes laboratórios, por meio de isolamento e análises ultraestruturais;
- c) Caracterizar molecularmente a microbiota endofítica, por meio da extração de DNA genômico total de microplantas e métodos de PCR-DGGE, bem como a extração do DNA de microrganismos isolados e sequenciamento parcial.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cultura de Tecidos Vegetais

O cultivo de plantas *in vitro* ou cultura de tecidos vegetais pode ser definido como o cultivo, em ambiente artificial sob condições assépticas e controladas, de células vegetais isoladas, ou tecidos ou órgãos, que podem dar origem a plantas inteiras, diretamente do explante ou indiretamente através de calos. Trata-se de uma biotecnologia, que compreende vários métodos de propagação vegetal em laboratório e, atualmente, vem sendo amplamente utilizada como ferramenta para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial (GEORGE, 1996; LAKSHMANA et al., 2005; TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998).

A cultura de tecidos vegetais tem atraído a atenção dos pesquisadores desde o início do século XX, Haberlandt, em 1902, foi o primeiro a cultivar células de tecidos somáticos de várias espécies de plantas em solução nutritiva (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998). Com a redescoberta dos princípios básicos de segregação de Mendel no início do século XX, ocorreu paralelamente o desenvolvimento de estudos genéticos de animais e plantas, verificando-se concomitantemente um progresso considerável nas técnicas de cultivo *in vitro* de células e tecidos de plantas (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998).

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas, sendo utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, como alternativa em suas diferentes fases, ou como solução única, contribuindo em maior ou menor escala de acordo com os objetivos e com as características biológicas da espécie-alvo (CHENGALRAYAN; ABOUZID; GALLO-MEAGHER, 2005; FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998; ULISSES et al., 2000). Além dos aspectos do melhoramento genético das plantas, a cultura de tecidos é amplamente utilizada na propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação, sendo a aplicação mais prática e de maior impacto da cultura de tecidos, que tem como principal

objetivo a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa (DONATO et al., 2005; LIMA; MORAES, 2006).

A micropropagação se tornou a saída para o cultivo de muitas plantas que possuem limitações na propagação sexuada, além da alta taxa de multiplicação e qualidade em comparação aos métodos tradicionais (LIMA; MORAES, 2006; NIETSCHE et al., 2006). As principais vantagens das plantas propagadas *in vitro* (microplantas) são: a rapidez com que se obtém um grande número de mudas em instalações reduzidas, e a obtenção de plantas livres de doenças e pragas, o que reduz a dispersão de organismos fitoparasitas (ALVARES; CALDAS, 2002; DAMASCO et al., 1996; LIMA; MORAES, 2006). Plantas micropropagadas, quando comparadas às plantas oriundas de propagação convencional, sobrevivem mais no campo, crescem mais rapidamente nos primeiros estádios de desenvolvimento, possuem maior precocidade, florescendo até quatro meses antes, além de apresentarem uniformidade de produção, proporcionando colheitas superiores (ALVARES; CALDAS, 2002).

Inúmeros são os fatores que influenciam a multiplicação *in vitro*, tais como, a taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma, coloração e tamanho das folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimação (LIMA; MORAES, 2006). Por essa razão, há um grande requerimento de cuidados que vão desde o estabelecimento destas plantas *in vitro* até a manutenção delas, durante os meses de desenvolvimento. (NISHIMURA et al., 2002). Dentre eles, o fator mais determinante para o sucesso ou não do cultivo *in vitro* é a contaminação microbiana, constituindo-se como uma ameaça séria à cultura de tecidos, admitida por todos os pesquisadores, que discutem protocolos mais eficientes, mas raramente informam ou mencionam em suas publicações científicas maneiras mais eficientes de controlá-la (KAMOUN; LEPOIVRE; BOXUS, 1998; PANICKER et al., 2007).

Dessa forma, o aprimoramento constante dos processos de multiplicação *in vitro* e o controle de qualidade das mudas, aliado à redução de custos, têm sido essenciais para a sua aceitação no mercado (DÍAZ et al., 2009; NIETSCHE et al., 2006).

### 3.2 Plantas Axênicas

As principais exigências para um protocolo de micropropagação viável incluem a formulação de meios de cultura simples, poucos procedimentos nas fases de produção, taxas consistentes de propagação, sustentabilidade do sistema em longo prazo e acima de tudo um controle adequado da contaminação microbiana. No tocante à contaminação microbiana, pode-se afirmar que as plantas axênicas são aquelas consideradas livres de todo e qualquer microrganismo, sendo o termo amplamente utilizado na cultura de tecidos (PANICKER et al., 2007).

A contaminação microbiana é o principal problema que impede a aplicação da cultura de tecidos, havendo uma tendência geral em atribuir essa contaminação às próprias matrizes que não foram submetidas a uma desinfestação eficaz da superfície do explante no processo de iniciação da cultura, ou do manuseio em laboratório, utilizando práticas estéreis ineficientes durante a manipulação (PANICKER et al., 2007; THOMAS; PRABHAKARA; PITCHAIMUTHU, 2006; THOMAS; PRAKASH, 2004; THOMAS et al., 2008). As contaminações bacterianas são mais drásticas e trazem duas consequências básicas: a primeira é a perda de tempo e de recursos financeiros ou genéticos pela eliminação de frascos contaminados, e a segunda é o risco de contaminação de outras plantas (LOPES, 1988; THOMAS; PRABHAKARA; PITCHAIMUTHU, 2006; THOMAS; PRAKASH, 2004).

A maior dificuldade no processo de desinfestação é obter um tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado, uma vez que se utiliza compostos que certamente reduzem a capacidade de resposta morfogênica dos explantes, exigindo dessa forma, o emprego de bioreguladores mais fortes para alcançar o objetivo de propagação, o que pode acarretar em sérios efeitos colaterais, como a variação somaclonal. Os antibióticos e fungicidas são, ocasionalmente, utilizados para o controle *in vitro* de microrganismos, podendo os mesmos serem adicionados ao meio de cultura ou submetendo os explantes a banhos sob agitação, durante alguns dias, porém, o uso de certos antibióticos tem sido limitado devido à toxicidade para as plantas (DONATO et al., 2005; LONDE et al., 2007). A limpeza dos propágulos pode, por outro lado, eliminar também microrganismos identificados como

não patogênicos que beneficiam a cultura (BARROW; OSUNA-AVILA; REYES-VERA, 2004; DIAS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2002; WEBER et al., 2004).

Segundo Thomas et al. (2007), uma exigência universal primária para o trabalho de cultura de tecido é assepsia, mas as observações sugerem que é praticamente impossível adquirir culturas assépticas com esterilização normal da superfície, o que incita a possibilidade da cultura de tecidos não axênicos como uma opção futura. Vários estudos já demonstraram uma grande diversidade de aspectos benéficos que microrganismos simbiotes podem promover à planta hospedeira, como aumento no crescimento e sobrevivência de microplantas na fase de aclimatização e a rapidez da produção de biomassa (AKELLO et al., 2007; WEBER et al., 2004). Sendo assim, a presença de tais microrganismos pode não somente, não representar problemas reais à cultura, como representar um ganho ao mantê-los na planta, pois, além de não apresentarem características patogênicas, também se configuram, na atualidade, como vetores genéticos, como agentes de controle biológico, como fonte de metabólitos secundários, entre outros (ALMEIDA, YARA, ALMEIDA, 2005; PEREIRA; CARNEIRO-VIEIRA; AZEVEDO, 1999).

A interação entre plantas e microrganismos pode estimular o crescimento vegetal, seja por competição com patógenos ou por indução de efeitos de outros microrganismos úteis, ocasionando benefício às plantas (ARRUDA, 2000). Por essa razão, são muito importantes os estudos com uma abordagem positiva da presença de endófitos naturais no cultivo *in vitro*. Isto, porque, vários estudos já evidenciam a onipresença de endófitos “encobertos” em várias espécies *in vitro*, dentre elas videira, mamoeiro, meloeiro, bananeira, abacaxizeiros e palmeiras (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; ALMEIDA et al., 2009; THOMAS et al., 2008).

### **3.3 Microrganismos Endofíticos**

Microrganismos que vivem dentro de tecidos de plantas em parte ou em todo o seu ciclo de vida sem causar qualquer sintoma visível de sua presença, podendo ser isolados de tecidos de plantas que tiveram sua superfície desinfestada, são definidos como endofíticos (ARAÚJO et al., 2002; BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA,

2006; GAMBOA; LAUREANO; BAYMAN, 2002; GOND et al., 2007; GUO et al., 2008; LARRAN; MÓNACO; ALIPPI, 2001; PETRINI, 1991; REITER et al., 2003; SAIKKONEN, 2007; SANTOS et al., 2003; SUN et al., 2008; TEJESVI et al., 2005). Eles habitam as regiões saudáveis da planta, ou regiões assintomáticas, numa densidade entre  $10^3$  a  $10^6$  UFC por grama de tecido fresco (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; GARBEVA et al., 2001).

Os endófitos diferem-se dos epífitos, por habitarem o interior das plantas, e dos fitopatógenos por não causarem doenças (SOUZA et al., 2004). De acordo com as estratégias de vida dos endófitos eles podem ser classificados em obrigatórios ou facultativos. Os obrigatórios são estritamente dependentes da planta hospedeira para seu crescimento e sobrevivência, já os facultativos possuem uma fase de seu ciclo dentro da planta hospedeira e outra em que vivem fora delas (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008).

Endófitos são onipresentes nos tecidos vegetais, tendo sido isolados de flores, frutos, folhas, caules, raízes, e sementes de várias espécies vegetais (KOBAYASHI; PALUMBO, 2000; MCINROY; KLOEPPER, 1995; MELNICK et al., 2008; PICCOLO et al., 2010; THOMAS et al., 2007). Alguns são mais frequentes em determinado tipo de vegetal, designados dominantes, em contraposição há outros mais raros, chamados de secundários (PILEGGI, 2006). Desde 1940, tem-se relatado a presença de endófitos colonizando os tecidos saudáveis de diversas plantas como, batata, tomate, pepino, trigo, leguminosas, algodão e citros (RAI et al., 2007).

As associações de microrganismos endofíticos com seus hospedeiros são variadas e complexas e o entendimento dessas interações ainda é prematuro (NEWMAN; REYNOLDS, 2005; SOUZA et al., 2004), podendo ser definidas como simbióticas ou neutras (SOUZA et al., 2004). Na maioria dos casos as relações entre os endofíticos e as plantas hospedeiras são simbióticas e provavelmente mutualísticas (GUO et al., 2008; MELNICK et al., 2008).

Nas interações simbióticas os microrganismos endofíticos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira que, por sua vez, são beneficiadas ao abrigá-los, pois podem auxiliar o crescimento e desenvolvimento, o estabelecimento sob condições adversas, a rapidez do aparecimento da muda, resistência a nematóides e a diversos

patógenos, produzindo antibióticos, ou colonizando um nicho ecológico semelhante ao dos fitopatogênicos (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; ARAÚJO et al., 2002; BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; GUO et al., 2008; TEJESVI et al., 2005), além de produzirem ou induzirem a produção de metabólitos primários, secundários e outros compostos químicos como enzimas, alcalóides e antibióticos (FIRÁKOVÁ; ŠTURDÍKOVÁ; MÚČKOVÁ, 2007; GOND et al., 2007; HOL et al., 2007; TEJESVI et al., 2005).

A relação entre a planta hospedeira com a comunidade e diversidade endofítica envolve um processo de co-evolução, regido pela sua colonização, que, por sua vez, é influenciada pelo genótipo, estágio de crescimento, status fisiológico e tipo de tecido da planta, além de condições ambientais e práticas agrícolas (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; FIRÁKOVÁ; ŠTURDÍKOVÁ; MÚČKOVÁ, 2007; FORCHETTI et al., 2007; HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008; SIEBER, 2007). A composição da comunidade associada com as plantas pode, ainda, ser diferente, dependendo da espécie, do tipo de cultivar, e até mesmo entre espécies transgênicas e suas respectivas progenitoras (ANDREOTE et al., 2010). A co-evolução das plantas com endófitos conduz a uma íntima relação, ocasionada por mudanças na informação em nível celular e molecular (ARAVIND et al., 2010; BACON; HINTON, 2006), que podem contribuir de diferentes formas na sanidade e desenvolvimento da planta.

Embora o conhecimento da ecologia e filogenia de microrganismos endofíticos tenha se acumulado rapidamente durante as últimas duas décadas, perguntas básicas sobre a origem evolutiva, especiação e papel ecológico dos endofíticos permanecem largamente sem resposta (SAIKKONEN et al., 2004). Sabe-se que de aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes na terra, cada uma é hospedeira de um ou mais endofíticos, especialmente plantas lenhosas, que podem conter inúmeras espécies (SAIKKONEN, 2007; GUO et al., 2008).

### **3.3.1 Aplicações na Agricultura**

#### **3.3.1.1 Controle Biológico**

Uma das grandes preocupações atuais com a agricultura de uma maneira geral concentra-se no ataque dos patógenos e, conseqüentemente, na instalação da doença que em muitos casos pode levar a morte da planta ou a uma drástica redução da produtividade. Para resolver este problema, na maioria das vezes, utilizam-se produtos como inseticidas, fungicidas e antibióticos, que além de promoverem a redução da doença, eliminam importantes espécies de insetos que controlam outras pragas e microrganismos que desempenham papel importante no ambiente (AZEVEDO et al., 2000). Dessa forma, o controle biológico surge como uma nova alternativa no combate a pragas e doenças, uma vez que permite um manejo racional sem afetar outras formas de vida e sem contaminar o ambiente, por ser altamente específico (LIU et al., 2007).

Dentro do controle biológico de doenças o uso de microrganismos endofíticos tem gerado bons resultados (ARAVIND et al., 2010). A efetividade dos endofíticos como agentes de controle biológico depende de muitos fatores, podendo-se citar: a especificidade da planta hospedeira, a dinâmica de população e padrão de colonização da planta, a habilidade para mover-se dentro dos tecidos da planta e a habilidade para induzir resistência sistêmica (MELNICK et al., 2008). Investigações bioquímicas de plantas bacterizadas mostraram uma alteração marcada na fisiologia da planta hospedeira, como também mudanças anatômicas e estruturais, no início do processo de resistência induzida pelas bactérias em várias plantas (BENHAMOU; KLOEPPER; TUZUN, 1998).

O processo de imunização ou resistência induzida tem sido o foco de interesse de vários estudos (BENHAMOU; KLOEPPER; TUZUN, 1998). Os efeitos benéficos para as plantas hospedeiras incluem: aumento da tolerância à seca, impedimento de herbivoria, proteção contra nematóides, e resistência contra patógenos fúngicos (MEJÍA et al., 2008). Muitos endofíticos podem excretar substâncias antimicrobiais que podem estar envolvidas numa associação simbiótica com a planta hospedeira (SUN et al., 2006). Dessa forma, os endófitos podem especificamente inibir a infecção e proliferação

do patógeno diretamente dentro da planta hospedeira, ou indiretamente por induzir respostas de resistência intrínseca à planta (MEJÍA et al., 2008).

Muitos endofíticos apresentam ação fungicida para *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* em algodão, *Verticillium dahliae*, *Verticillium* sp., e *R. solani* em batata, *Sclerotium rolfsii* em feijão (CHO et al., 2007; SINGH et al., 2008). Espécies de fungos endofíticos isoladas de plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo* por Almeida; Yara e Almeida (2005), mostraram potencial para o uso no controle biológico de patógenos causadores do apodrecimento radicular de pupunheiras (*Bactris gasipaes*).

Espécies de bactérias endofíticas atuam intimamente na planta hospedeira com atividade antagonica a fungos e bactérias patogênicas, podendo-se citar a *Acinetobacter baumannii*, efetiva no combate ao crescimento de diversos fungos patogênicos, tais como: *Cryphonectria parasitica*, *Glomerella glycines*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, e *Rhizoctonia solani* (LIU et al., 2007). Espécies, como *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis*, são conhecidas pela sua atividade de proteção devido à produção de antibióticos e enzimas hidrolíticas (ADAMS et al., 2008; REVA et al., 2002). *B. pumilus* inibe o crescimento de fungos por produzir enzimas proteolíticas que degradam a parede de celular (ADAMS et al., 2008; KUMAR, 2002; NIELSEN; SORENSEN, 1997).

Outra característica marcante de bactérias do gênero *Bacillus*, consiste no fato de produzirem esporos com alta tolerância a condições ambientais adversas, permitindo seu uso em formulações de biopesticidas para aplicação no campo com menor impacto ambiental, além disso, o uso de linhagens de *Bacillus* no biocontrole, em relação a outras bactérias, oferece as seguintes vantagens: são mais fáceis de cultivar e armazenar; podem ser aplicadas como esporos em sementes e plantas ou como inoculantes; possuem um amplo espectro de ação contra vários patógenos microbianos; e adicionalmente podem estimular o crescimento das plantas (CHOUDHARY; JOHRI, 2009; FORCHETTI et al., 2007; HERNANDEZ et al., 2009; ZHAO, et al., 2010).

Diversos estudos realizados nos últimos vinte anos tem focado principalmente o controle de nematóides parasitas de plantas. Tais estudos comprovaram a suscetibilidade desses nematóides a uma diversidade de fungos e bactérias presentes no solo, criando a possibilidade do uso de alguns microrganismos, como *Pasteuria*,

*Pseudomonas* e *Bacillus*, como agentes de biocontrole desses parasitas (TIAN; YANG; ZHANG, 2007). Mendoza e Sikora (2009) relataram que *Bacillus firmus* é o agente biológico presente no bionematicida registrado em Israel com o nome comercial de Bionem® WP (KEREN-ZUR et al., 2000; MENDOZA; SIKORA, 2009). A eficácia deste bionematicida é relatada para o controle de diferentes nematóides como *Meloidogyne incognita*, *Helicotylenchus* spp, *Tylenchorhynchus* spp, *Radopholus similis* e *Ditylenchus dipsaci* (MENDOZA; SIKORA, 2009).

A proteção antipatogênica mediada por endofíticos contra nematóides foi observada em gramíneas tropicais, plantas de tomateiro e bananeiras, e contra fungos patogênicos para feijão e cevada, porém, mesmo com essas evidências de que os endofíticos podem reduzir os danos causados pelos patógenos, pouco se conhece sobre o papel desses microrganismos em sistemas naturais e ainda, como eles podem ser explorados como uma estratégia no controle biológico de plantas (MEJÍA et al., 2008).

### 3.3.1.2 Promoção de Crescimento

Estudos sugerem que os microrganismos endofíticos também atuam nas plantas como excelentes promotores de crescimento, sendo relatada sua eficiência em plantas de arroz, com aumento significativo do rendimento dos grãos, em plantas de cana-de-açúcar, entre outras. Neste contexto, cabe destacar duas endobactérias comuns a muitas plantas *Rhizobium* e *Azorhizobium*, que aumentam a absorção de nutrientes pelo aumento de raízes laterais, promovendo o crescimento em altura e espessura da parte aérea (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; TING et al., 2008).

O termo rizobactéria é geralmente usado para designar a ocorrência natural de bactérias que vivem livres no solo envolvidas em associações benéficas com as plantas, promovendo seu crescimento (EL-TARABILY, 2008). Tais bactérias são classificadas por dois mecanismos: - o primeiro é o mecanismo direto, no qual estão envolvidas as produções de compostos que favorecem o crescimento das plantas, como auxinas, citocininas, giberelinas e poliamidas; além de estarem envolvidas na fixação de nitrogênio atmosférico; na solubilização de ferro e fosfato inorgânico; na

mineralização de fosfato orgânico e no aumento da tolerância a estresse hídrico, salino, toxicidade de metal e pesticidas; - o segundo é o mecanismo indireto, no qual estão envolvidos os processos de diminuição ou prevenção dos efeitos danosos de microrganismos fitopatogênicos, através da produção de sideróforos e metabólitos fungicidas (AKHTAR; SIDDIQUI, 2008; BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; CANBOLAT et al., 2006; EL-TARABILY, 2008; SINGH et al., 2008).

Um dos principais mecanismos de promoção do crescimento das plantas mediada por microrganismos endofíticos é a produção de fitormônios. As plantas respondem a perturbações pela modificação dos níveis de vários hormônios, incluindo o ácido jasmônico (JA), ácido abscísico (ABA) e etileno. Muitas bactérias endofíticas produzem esses hormônios, que podem auxiliar a planta, principalmente espécies que crescem sob condições restritas, como seca e salinidade, (FORCHETTI et al., 2007). Além disso, hormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, também podem ser produzidos. As auxinas são sintetizadas pelas bactérias por diferentes rotas (Figura 1) e auxiliam no crescimento e desenvolvimento da parte aérea e radicular das plantas (TROTSENKO; IVANOVA; DORONINA, 2001).

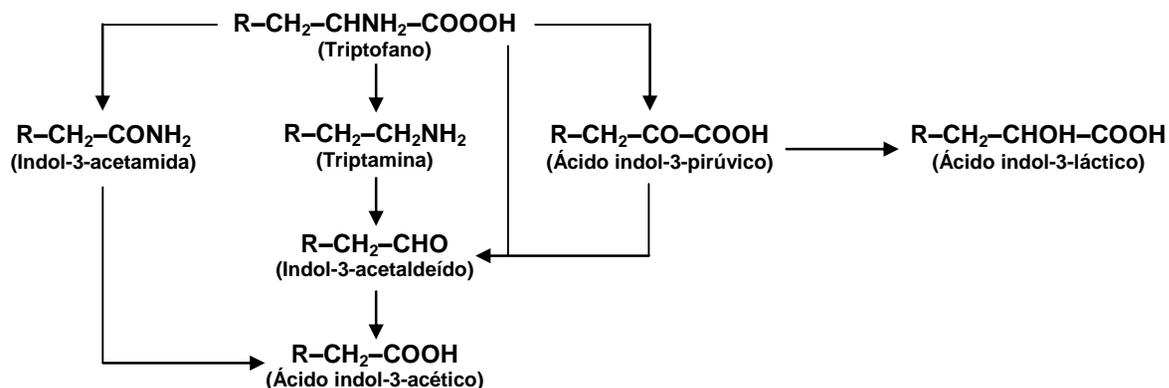


Figura 1 – Biossíntese de AIA em bactérias  
Fonte: Trotsenko, Ivanova e Doronina (2001)

Muitas bactérias, como *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, e *Bacillus*, produzem fitormônios como o ácido indol acético (KANG et al., 2009; KHALID; ARSHAD; ZAHIR, 2004), ácido indol butírico (MARTÍNEZ- MORALES et al. 2003), giberelinas (GUTIÉRREZ-MAÑERO et al., 2001), citocininas (DOBBELAERE;

VANDERLEYDEN; OKON, 2003), octadecanoides, e compostos que imitam a ação dos jasmonatos (PING; BOLAND, 2004). Em condições normais, auxina e giberelinas como GA1, GA3, GA4, e GA20 tem sido detectadas em meio de cultura líquido de *Bacillus pumilus* e *B. licheniformis*. (FORCHETTI et al., 2007; HERNANDEZ et al., 2009).

Bactérias do gênero *Methylobacterium*, podem atuar sinergicamente quando em conjunto com bactérias do gênero *Rhizobium*, promovendo o crescimento da planta ao estimular a germinação da semente e o crescimento da raiz, aumento na nodulação e no rendimento, pela produção de fitormônios como ácido indol acético (AIA) e giberelinas (MADHAIYAN et al., 2006a).

Além destes mecanismos comuns de promoção do crescimento, muitas bactérias podem estimular o crescimento da planta pela atividade da enzima 1-aminociclopropano-1 – ácido carboxílico desaminase, que hidroliza o 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico, precursores imediatos da biossíntese do fitormônio etileno, em tecidos de planta (EL-TARABILY, 2008). Outros efeitos da infecção dos endofíticos na planta hospedeira incluem o ajuste osmótico, controle da abertura e fechamento estomático, modificação da morfologia radicular, aumento da captação de minerais e alteração do acúmulo, suprimento de vitaminas essenciais e metabolismo do nitrogênio, (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; FIGUEIREDO et al., 2008). Díaz et al. (2009) demonstraram que a inoculação de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomona* em *Eucalyptus globulus* tem a capacidade de estimular o enraizamento e o aumento da biomassa radicular, sendo utilizadas como potenciais biofertilizantes.

### 3.3.1.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

A revolução verde na agricultura, ocorrida nos anos sessenta, resultou em elevados aumentos na produção de grãos de cereais, devido ao desenvolvimento de genótipos de plantas que são altamente responsivas a fertilizantes químicos, particularmente o nitrogênio (GOVINDARAJAN; KWON; WEON, 2007). O aspecto nutricional é um ponto de preocupação e busca por soluções menos onerosas, assim como no campo fitopatológico, são inúmeros os estudos utilizando maneiras

alternativas de fornecimento dos nutrientes essenciais às plantas, dentre eles e com maior importância do ponto de vista econômico, destaca-se o nitrogênio, por ser mais limitante a produtividade. (GOVINDARAJAN et al., 2006).

As plantas absorvem nitrogênio presente na atmosfera na forma de amônia e nitrato, porém tal absorção é ínfima, sendo necessária à suplementação com fertilizantes, o que nas condições tropicais se apresenta com elevados gastos, devido às chuvas que provocam a lixiviação desse nitrogênio, restando a fixação biológica do nitrogênio, como uma alternativa economicamente viável, vantajosa e menos impactante (JENSEN; HAUGGAARD-NIELSEN, 2003; GOVINDARAJAN; KWON; WEON, 2007).

Muitas bactérias infectam as raízes de algumas plantas e formam os nódulos, em cujo interior é sintetizado um complexo enzimático, denominado nitrogenase, que rompe a tripla ligação existente entre os átomos de N que formam a molécula do  $N_2$  e utilizam esses átomos para produzir duas moléculas de amônia ( $NH_3$ ), que são fornecidas à planta, para sintetizar os compostos nitrogenados (ALBINO; CAMPO, 2001; BAKULIN; GRUDTSYNA; PLETNEVA, 2007).

A aplicação de inoculantes bacterianos como biofertilizantes tem aumentado o crescimento e rendimento de muitas culturas de cereais, sendo atribuído a esses efeitos benéficos o uso de rizobactérias que fixam biologicamente o nitrogênio, além de produzirem fitormônios, que promovem o desenvolvimento e proliferação radicular, resultando em uma captação mais eficiente de água e nutrientes (GOVINDARAJAN et al., 2006; SENTHILKUMARN et al., 2008). Segundo Balachandar et al. (2006) os microrganismos diazotróficos colonizam endofiticamente raízes, caules e folhas de cereais, sofrendo provavelmente, muito menos competição por carbono com outros organismos microscópicos, do que as bactérias presentes na rizosfera, e possivelmente excretam parte do nitrogênio por eles fixados diretamente na planta. Em cana-de-açúcar, por exemplo, a inoculação com uma mistura de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos mostrou-se equivalente à metade da dose indicada de fertilizantes (GOVINDARAJAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2002).

Vários endofíticos que fixam nitrogênio em plantas já foram informados, podendo-se citar os do gênero *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Azoarcus*,

*Herbaspirillum*, *Burkholderia* em plantas gramíneas e *Methylobacterium* em citrus (ARAÚJO et al., 2002; BALACHANDAR et al., 2006; DONATO et al., 2005; ELBELTAGY et al., 2001; GOVINDARAJAN; KWON; WEON, 2007). *Burkholderia vietnamiensis* foi uma das primeiras espécies de *Burkholderia* relatada como fixadora de nitrogênio, outros estudos, porém, sugerem que muitas espécies deste gênero desempenhem tal função, como a *Burkholderia baldani* que coloniza os tecidos de cana-de-açúcar, batata-doce e arroz, e *Burkholderia unamae* que coloniza os tecidos da planta de milho (GOVINDARAJAN et al., 2006).

#### 3.3.1.4 Solubilização de Fósforo

Depois do nitrogênio, o fósforo é o nutriente que mais limita a planta e sua deficiência restringe o rendimento da produção. Os solos tropicais e subtropicais são predominantemente ácidos e normalmente deficientes em fósforo, com elevada capacidade de imobilização, tal deficiência é devida à alta reatividade do fosfato solúvel com outros elementos (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007).

A solução mais comumente utilizada é o uso de fertilizantes químicos que possuem alto custo, utilizam energia fóssil para serem produzidos e poluem o ambiente, além disso, são rapidamente imobilizados, tornando-se indisponíveis às plantas. Dessa forma, torna-se indispensável explorar fontes alternativas de disponibilização de fósforo, como, por exemplo, o uso de microrganismos (CANBOLAT et al., 2006; DIAS et al., 2009; KHAN; ZAIDI; WANI, 2007).

Organismos com habilidade de solubilizar fosfato representam uma alternativa economicamente viável e ecologicamente correta, pois o sistema microbiano é capaz de disponibilizar grandes quantidades de nutrientes de reservas naturais e enriquecer o solo com os nutrientes mais importantes e escassos. Os microrganismos convertem o fósforo insolúvel nas formas solúveis, e dentre eles destacam-se as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* e alguns fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007).

Assim como os microrganismos de solo, muitos endofíticos são conhecidos por promover o crescimento da planta através da solubilização do fósforo (DIAS et al.,

2009; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001; WAKELIN et al., 2004). *Bacillus pumilus* e *Acinetobacter calcoaceticus* são conhecidamente bactérias endofíticas que auxiliam a planta hospedeira de diferentes formas, sendo uma delas a oferta de fósforo solúvel através de sua solubilização (HERNANDEZ et al., 2009; KANG et al., 2009).

### 3.3.2 Aplicação Farmacológica

Os microrganismos endofíticos são fontes relativamente espontâneas e potenciais de produtos naturais modernos para exploração em medicina, agricultura e indústria, por se tratarem de sintetizadores químicos dentro da planta (LIN et al., 2007; GUO et al., 2008). Muitos deles são capazes de sintetizar compostos bioativos que podem ser usados pelas plantas para defesa contra patógenos e algumas destas combinações se mostraram de grande utilidade para a descoberta de drogas modernas. Centenas de compostos naturais produzidos por endofíticos como, alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróides, antibióticos, foram relatados (GUO et al., 2008; VERMA et al., 2009).

Calcula-se que pode haver cerca de 1 milhão de espécies endofíticas diferentes, porém, somente poucas espécies foram estudadas até o momento, o que representa uma grande oportunidade para encontrar novos produtos naturais sintetizados por eles de interesse farmacológico (GUO et al., 2008; KOUR et al., 2008). Dentro deste contexto, cabe destacar alguns microrganismos endofíticos, como *Fusarium subglutinans* que produz subglutinol com função imunossupressiva, tendo como planta hospedeira *Tripterigium wilfordii* (LEE et al., 1995); *Paenibacillus amylolyticus*, que produz e ativa a enzima pectinase, tendo como planta hospedeira *Coffea arabica* (SAKIYAMA, et al., 2001); *Pestalotiopsis microspora* presente nos tecidos de *Terminalia morobensis*, produzindo compostos antioxidantes (HARPER et al., 2003).

Recentes estudos tem mostrado interesse em fungos endofíticos com atividade antimicrobiana para controlar patógenos veiculados pelos alimentos como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e as toxinas produzidas por esses microrganismos (LIU et al., 2008). Ainda sob o ponto de vista alimentar, a aflatoxina é uma toxina produzida por fungos que constitui uma grande preocupação para a saúde

humana, devido a sua capacidade carcinogênica (CHO et al., 2009; SOUZA et al., 2004). Cho et al. (2009) concluíram que a bactéria *Bacillus pumilus* pode ser utilizada no controle dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, na inibição de aflatoxina por eles produzida, além de promover benefícios adicionais como ação antitumoral, antimicoplasmática, hemolítica e atividade fibrinolítica, quando adicionada no alimento.

A podofilotoxina é uma molécula bioativa potente no combate ao câncer, sendo encontrada em diversas espécies vegetais, porém, sua síntese química é restrita, devido à complexidade da estrutura da molécula com baixo rendimento pelos métodos disponíveis. Entretanto, recentes estudos mostram a produção dessa molécula por microrganismos endofíticos *Podophyllum hexandrum*, *Podophyllum peltatum* e *Fusarium oxysporum* (KOUR et al., 2008).

Indubitavelmente, uma das descobertas mais importantes com endofíticos foi o isolamento do microrganismo *Taxomyces andreanae* produtor de taxol, um diterpenóide considerado uma droga anticancerígena potente, mas a provisão desta droga esteve limitada pela exploração destrutiva da árvore usada como a fonte principal de taxol, porém, com a descoberta do *Taxomyces andreanae* produtor de taxol, esse problema pôde ser resolvido (GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008; GUO et al., 2008; WANG et al., 2000). Assim, ao se produzir certas drogas fitoquímicas, utilizando microrganismos endofíticos, muitos problemas poderiam ser evitados, como o lento crescimento das plantas que também produzem esses compostos, ou até mesmo o impacto ambiental causado pela extração desses compostos (LIN et al., 2007).

A produção de uma molécula bioativa por microrganismos endofíticos, que eram somente encontradas em determinadas espécies vegetais, comprova a teoria de que durante a colonização da planta hospedeira esses microrganismos se adaptam ao microambiente vegetal e assimilam parte do DNA vegetal em seu genoma, constituindo um processo de co-evolução, no qual os endófitos adquirem de seus hospedeiros a capacidade de biossíntese de compostos bioativos (KOUR et al., 2008). Outras teorias assumem que o inverso também é verdadeiro, de modo que parte do DNA microbiano, durante um processo de co-evolução, foi assimilado ao genoma da planta, e o que era uma exclusividade do endófito passa a ser do seu hospedeiro também (PILEGGI, 2006).

### 3.3.3 Implicação na Cultura de Tecidos

Embora já existam protocolos variados de cultura de tecidos, faz-se necessário avaliar a qualidade do sistema comercial de multiplicação *in vitro*, uma vez que esta é influenciada por diversos fatores como taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma, coloração e tamanho das folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimatação (OLIVEIRA; SILVEIRA; SILVA, 2001).

Neste contexto, inúmeros esforços são necessários para o aprimoramento dos processos de multiplicação *in vitro* e o controle da qualidade das mudas, aliados à redução de custos, para aceitação no mercado (NIETSCHE et al., 2006). Os microrganismos endofíticos tem despontado como importantes aliados no processo de micropropagação, segundo Pirttilä et al. (2008), o genótipo da planta e a composição de espécies endofíticas, aliados às condições de cultivo *in vitro*, representam um fator chave para a obtenção de culturas com alta capacidade de regeneração.

Os endofíticos foram documentados em uma grande variedade de espécies vegetais em cultura de tecidos (THOMAS et al., 2007). Embora existam estudos que mencionam a presença desses microrganismos como uma contaminação, outros confirmam a associação benéfica dos endofíticos na micropropagação e cultura de células, auxiliando no ajuste osmótico, no desenvolvimento, pela produção de fitormônios, absorção de nutrientes e proteção contra ação de patógenos, além de favorecer o processo de aclimatização das mudas em casa de vegetação (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; ALMEIDA et al., 2009; DIAS et al. 2009; PIRTTILÄ et al., 2000).

Espécies endofíticas do gênero *Methylobacterium* são relatadas na literatura como benéficas na cultura de tecidos vegetais, por promoverem a embriogênese e organogênese, além de induzirem a formação de calos e brotação em *Triticum aestivum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, e *Linum usitatissimum*, e permitir o desenvolvimento das plantas regeneradas, pela biossíntese de compostos e fitormônios como auxina e citocininas (PIRTTILÄ et al., 2008; TROTSSENKO; IVANOVA; DORONINA, 2001).

Além dos microrganismos endofíticos que naturalmente colonizam os tecidos vegetais, uma outra alternativa para melhorar a produção das microplantas, encontra-se na utilização de endófitos selecionados e inoculados de maneira asséptica nas espécies, de modo a favorecer ou potencializar o desenvolvimento e regeneração destas *in vitro* (SENTHILKUMAR et al., 2008). Segundo Barrow; Osuna-Avila e Reyes-Vera (2004), a micropropagação é uma valiosa ferramenta na identificação de endofíticos, para estudar suas relações e interações com a planta hospedeira em níveis genético, celular e fisiológico.

### **3.3.4 Métodos de Análise**

#### **3.3.4.1 Análise Histológica da Planta Hospedeira**

Sabendo-se que muitas bactérias endofíticas podem ser consideradas fastidiosas ou não cultiváveis pelos métodos tradicionais, restringindo os estudos a espécies cultivadas, que na maioria já são conhecidas, a aplicação de técnicas de microscopia de luz, análises ultraestruturais por meio de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, associada às técnicas de biologia molecular permitem a identificação e caracterização desses microrganismos endofíticos com maior amplitude (KIRCHHOF et al., 1997; UEDA et al., 1995).

Uma das grandes lacunas no conhecimento dentro da pesquisa de endófitos está na definição dos sítios de colonização, neste sentido, estudos com anatomia e microscopia ganham espaço importante (THOMAS et al., 2007, 2008; THOMAS; KUMARI, 2010; THOMAS; SOLY, 2009). Os microrganismos endofíticos podem ser detectados no interior de tecidos vegetais por meio de microscopia ótica (WHITE Jr.; MORGAN-JONES; MORROW, 1993) ou eletrônica (VIRET; PETRINI, 1994).

Dentre os métodos de análise da comunidade endofítica presente na planta hospedeira, a análise histológica das plantas é o método mais direto de observação, verificação e comprovação de sua existência, podendo servir como uma ferramenta auxiliar na detecção de endofíticos, bem como avaliar as regiões de colonização, como órgãos, tecidos e até células, de maior incidência desse microrganismo e aferir sua

existência em determinada planta, como pode ser observado nos trabalhos de Silvani et al. (2008) e de Mandyam e Jumpponen (2008), que utilizaram cortes anatômicos como uma ferramenta auxiliar na detecção de microrganismos endofíticos.

Jansa e Vosátka (2000) ao analisarem a presença de fungos micorrízicos em raízes de plantas da família Ericaceae, utilizaram a análise histológica para identificar o local de colonização, verificando uma íntima associação entre os fungos e as células corticais da raiz dessas espécies, bem como observar as estruturas típicas desses fungos.

Além dos cortes histológicos fixados e emblocados, são feitos também cortes a fresco, para testes histoquímicos que podem permitir a avaliação e detecção de compostos presentes nas plantas (ABREU-TARAZI, 2010), bem como, para verificação de movimentos dos microrganismos endofíticos gerados por condições ambientais, Donato et al. (2005), por exemplo, observaram, além da presença de microrganismos endofíticos, bactérias que apresentavam movimentos espiralados quando próximos à bolhas de ar, característicos de *Herbaspirillum* spp. O mesmo ocorre no trabalho de bacteriossomas presentes em plantas de *Bactris gasipaes* (pupunheira) realizado por Almeida et al. (2009).

Além da possibilidade de verificar movimentos dos microrganismos, é possível observar os locais de preferência, por fornecer condições adequadas para o crescimento e colonização, utilizando a microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e varredura para diferentes espécies como arroz (BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2001), tomate (EL-TARABILY, 2008), repolho chinês (YONEZAWA et al., 2004), cevada (OHTAKA; NARIZAWA, 2008), que utilizam esses métodos para localização dos endófitos e determinação das formas de colonização nas diferentes espécies.

#### **3.3.4.2 Isolamento**

O método de isolamento dos endofíticos é utilizado para a identificação dos microrganismos, pois a partir do crescimento desses isolados, é possível observar a configuração das colônias e realizar análises morfológicas, fisiológicas e químicas (CHO et al., 2007). Segundo Garbeva et al. (2001), toda a informação sobre a

ocorrência de microrganismos endofíticos e a estrutura de suas comunidades tem sido obtida por técnicas de cultivo microbiano, considerando que a caracterização dos isolados obtidos é principalmente executada pela utilização das fontes de carbono, ou por análises de ácido metil-éster.

Os cuidados para se realizar o isolamento de microrganismos endofíticos vão desde uma boa desinfestação da superfície das plantas para a remoção de epifíticos até a avaliação de características como, a idade da planta e dos órgãos utilizados, a temperatura de incubação das placas para o isolamento, recorrência do isolado, que revela o seu verdadeiro estado endofítico, além do local e a época da coleta das plantas, uma vez que a microbiota isolada de vegetais de regiões temperadas, possui maior diversidade do que a microbiota encontrada em espécies de regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (PILEGGI, 2006).

Tais cuidados devem levar em consideração, também, a escolha adequada dos meios de cultura, de acordo com o grupo de endófitos que se deseja isolar, podendo ser acrescentadas substâncias seletivas, como antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias, ou fungicidas, que restringem o crescimento de fungos (PILEGGI, 2006). Scrugli et al. (2000), isolaram fungos endofíticos de raízes de várias espécies de orquídeas, dos gêneros *Barlia*, *Epipactis*, *Limodorum*, *Neottia*, *Ophrys* e *Orchis*, notando que no meio BDA (Batata, Agar e Dextrose) os resultados foram melhor evidenciados do que no meio Müeller Hinton. Pereira; Carneiro-Vieira e Azevedo (1999) isolaram microrganismos endofíticos de plantas de bananeira e observaram que os fungos isolados eram passíveis de serem selecionados sob as condições de cultivo utilizadas.

Outros autores utilizaram o isolamento para a identificação e caracterização de endofíticos presentes em diferentes espécies vegetais como, banana (THOMAS et al., 2008), morango (DIAS et al., 2009), pupunheira (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005), *Guarea guidonia*, *Tabebuia rosea*, *Manilkara bidentata* (GAMBOA; LAUREANO; BAYMAN, 2002), *Echinacea purpurea* e *Echinacea pallida* (LATA et al., 2006).

Panicker et al. (2007) isolaram bactérias endofíticas de crisântemo para sua identificação, através da cor e morfologia das colônias no meio de cultura. Ohtaka e Narizawa (2008) realizaram a caracterização morfológica das colônias isoladas e observaram as estruturas reprodutivas dos endofíticos. Bandara, Seneviratne e

Kulasooriya (2006) isolaram endofíticos de arroz encontrando uma grande diversidade de bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos e actinomicetos.

Muitos estudos utilizam o isolamento para identificar possíveis funções dos microrganismos endofíticos dentro da planta hospedeira, como é o caso dos trabalhos de Jansa e Vosátka (2000) que isolaram fungos micorrízicos e inocularam na planta para verificar seu potencial fixador; Sun et al. (2006) que ao isolarem os endofíticos, obtiveram como resultado a produção por parte desses microrganismos de compostos secundários com função antimicrobiana e Senthilkumar et al. (2008) que isolaram endofíticos de arroz e verificaram um grande potencial de fixação de nitrogênio desses microrganismos.

A realização de métodos de isolamento para verificar a possível produção de novas drogas ou substâncias de interesse farmacológico, tem sido amplamente utilizada, como é o caso do trabalho de Lin et al. (2007) que isolaram e caracterizaram morfológicamente os corpos de frutificação dos microrganismos endofíticos presentes nos tecidos da raiz de *Camptotheca acuminata*, bem como a identificação de substâncias bioativas; e Kour et al. (2008) que realizaram o isolamento de endofíticos com potencial de produção de substâncias anticancerígenas.

O isolamento mesmo sendo um método amplamente utilizado ainda hoje nas pesquisas com endofíticos, possui como desvantagem o fato de que certas espécies de microrganismos podem ter exigências específicas para crescimento e, conseqüentemente, não desenvolverão colônias prontamente nas placas, havendo, portanto, uma limitação desse processo de análise, por não se conhecer perfeitamente as características e necessidades desses microrganismos (GARBEVA et al., 2001).

#### **3.3.4.3 Análise Molecular**

A maioria das informações sobre diversidade endofítica bacteriana foi obtida usando métodos de isolamento em meios de cultura, porém, devido ao desconhecimento das condições e exigências para o crescimento de muitas bactérias e a presença de células não cultiváveis, a diversidade encontrada por essa técnica não chega a 1% das espécies bacterianas presentes na planta (LACAVA et al., 2006; SUN

et al., 2008). Dessa forma, a melhoria da caracterização e análise dessas comunidades tem sido o foco de muitos estudos, principalmente no tocante ao desenvolvimento de técnicas de biologia molecular capazes de permitir o estudo da comunidade endofítica em seu habitat (LACAVA et al., 2006).

As análises moleculares, com destaque àquelas que utilizam gene 16S de rDNA, permitem a avaliação direta da diversidade estrutural das comunidades microbianas, superando, assim, as limitações do processo de cultivo desses microrganismos, podendo ser utilizadas nos mais diversos ambientes: solo, rizosfera, alimentos e intestino humano (GARBEVA et al., 2001; LACAVA et al., 2006; REITER et al., 2003; SUN et al., 2008).

A diversidade das comunidades bacterianas pode ser avaliada pela amplificação, em reações em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), de regiões variáveis de gene ribossomal 16S a partir de extratos de DNA natural, usando “primers” de regiões bacteriais conservadas, juntamente com técnicas de *fingerprinting* como ARDRA (“*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*”), DGGE (“*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*”), TGGE (“*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*”), RISA (“*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*”), ARISA (“*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*”), T-RFLP (“*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*”) e SSCP (“*Single-strand Conformation Polymorphism*”) (ABREU-TARAZI, 2010; ABREU-TARAZI et al., 2010; ANDREOTE et al., 2010; ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; GARBEVA et al., 2001; OROS-SICHLER et al., 2007).

Dentre as metodologias baseadas no 16S rDNA, destaca-se o DGGE por fornecer uma rápida caracterização das comunidades microbianas cultiváveis e não cultiváveis (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2006; REITER et al., 2003). Esta técnica identifica diferenças estabelecidas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA, com mesmo comprimento, mas diferentes quanto à composição básica, que submetida a um gradiente crescente de concentração de agentes desnaturantes (uréia e formamida), se separam em fragmentos discretos, chamados de domínios de desnaturação (GARBEVA et al., 2001; LACAVA et al., 2006). Sua aplicabilidade se relaciona ao estudo de comunidades endofíticas de diversas espécies vegetais como batata (GARBEVA et al., 2001), citros (ARAÚJO et al., 2002), banana (THOMAS et al.,

2008), pupunheira (ALMEIDA et al., 2009), abacaxi (ABREU-TARAZI et al., 2010) e eucalipto (ANDREOTE et al., 2009a, 2009b), todos demonstrando que o DGGE pode auxiliar no estudo da diversidade microbiana independentemente da capacidade de crescerem ou não, em meio de cultura.

Para avaliar a comunidade endofítica com o uso da técnica de DGGE, deve-se ter o cuidado de minimizar interferências por parte das organelas vegetais (cloroplasto e mitocôndrias), realizando a escolha de *primers* que tenham maior sensibilidade com o gene 16S rDNA de bactéria (SUN et al., 2008; THOMAS; SOLY, 2009). Visando eliminar essa interferência, sugere-se o uso dos *primers* 799f (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1492r (LANE, 1991) para aumentar a concentração do DNA bacteriano antes da amplificação com grampo GC (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas espécies vegetais cultivadas *in vitro*, provenientes de três laboratórios: Laboratório de Fisiologia de Árvores do Departamento de Ciências Florestais; Laboratório de Cultura de Tecidos (CEBTEC) e Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, ambos do Departamento de Ciências Biológicas, todos pertencentes à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP – Piracicaba/SP. A Figura 2 ilustra as etapas que foram seguidas, bem como as diferentes análises que foram realizadas para avaliação da microbiota endofítica.

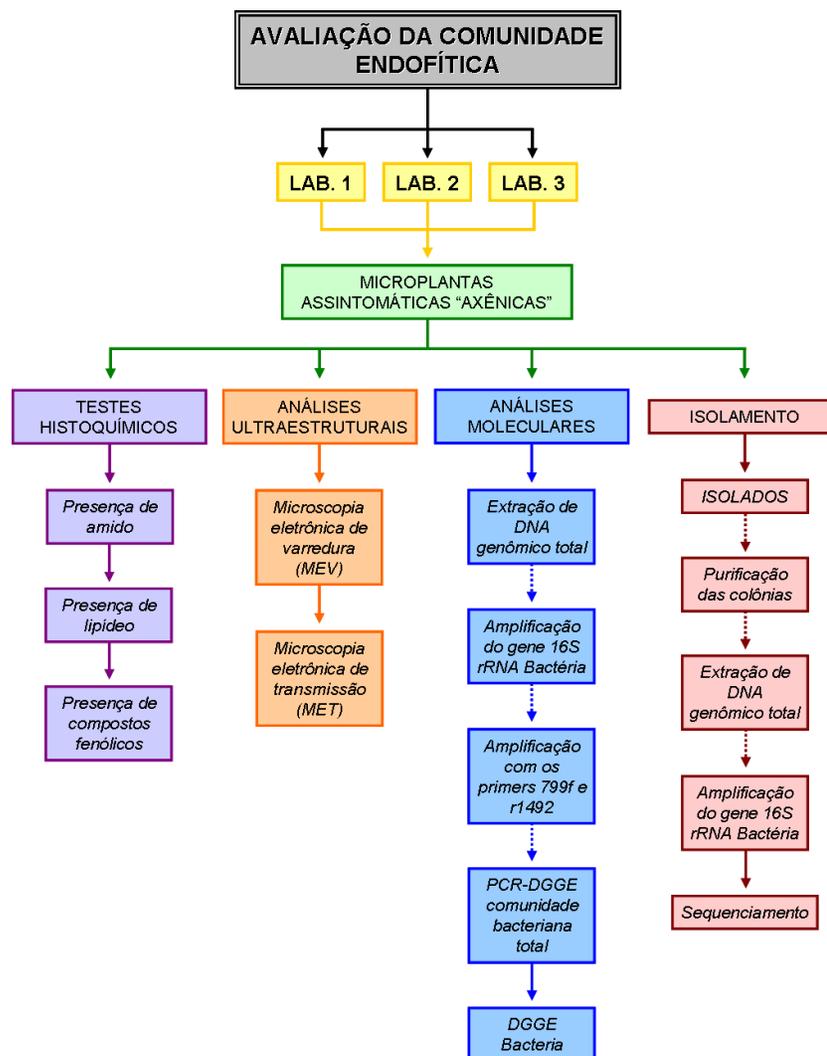


Figura 2 – Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho. Linhas contínuas representam os objetivos ou métodos de análises dos resultados. Linhas pontilhadas representam os procedimentos intermediários

#### 4.1 Material Vegetal

As espécies de microplantas estudadas foram: **Abacaxi** (*Ananas comosus*), **Cana-de-açúcar** (*Saccharum officinarum*), **Cúrcuma** (*Curcuma zedoaria*), **Eucalipto** (*Eucalyptus globulus*), **Manjeriço** (*Ocimum basilicum*), **Mogno** (*Swietenia macrophylla*), **Orquídea** (*Oncidium flexuosum*), **Pinheiro** (*Pinus taeda*), **Pupunheira** (*Bactris gasipaes*), **Sequóia** (*Sequoia sempervirens*), **Teca** (*Tectona grandis*) e **Violeta** (*Viola odorata*). Todas assintomáticas, consideradas axênicas, provenientes de cultivo *in vitro* e estabelecidas em protocolo de micropropagação, em fase de multiplicação por mais de 1 ano. A Tabela 1 mostra a distribuição das espécies de microplantas nos três laboratórios.

Tabela 1 – Distribuição das espécies de microplantas nos diferentes laboratórios, com a divisão das espécies comuns aos três laboratórios, consideradas por essa razão como controle entre as espécies e as demais espécies avaliadas

ESPÉCIE	LABORATÓRIO		
	1	2	3
CONTROLE	Abacaxi	Abacaxi	Abacaxi
	Orquídea	Orquídea	Orquídea
DEMAIS ESPÉCIES	Teca	Eucalipto	Manjeriço
	Pinheiro	Cana-de-açúcar	Mogno
	Sequóia	Cúrcuma	Pupunheira
	Violeta	Violeta	

Laboratório 1 = Fisiologia de Árvores (Dep. de Ciências Florestais), Laboratório 2 = Cultura de Tecidos (CEBTEC – Dep. de Ciências Biológicas) e Laboratório 3 = Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas (Dep. de Ciências Biológicas).

O controle foi constituído por duas espécies de microplantas (abacaxi e orquídea) provenientes dos três locais de cultivo (laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, laboratório de Cultura de Tecidos e laboratório de Fisiologia de Árvores). As demais espécies são provenientes de maneira aleatória, como mostra a tabela, nesses três laboratórios, Ao todo 12 espécies foram avaliadas, porém, 17 microplantas, devido às espécies que se repetem nos laboratórios, como é caso de abacaxi, orquídea e violeta.

As análises para confirmar a presença e identificar os microrganismos endofíticos foram descritas nos itens a seguir.

## **4.2 Microplantas**

### **4.2.1 Testes Histoquímicos**

As microplantas foram analisadas por meio de testes histoquímicos de colorações específicas segundo o componente celular a ser identificado, em cortes a fresco do terço mediano das lâminas foliares retiradas do primeiro nó completamente expandido de cada planta.

Para a caracterização de lipídeos utilizou-se Sudan Black B (PEARSE, 1968), de amido o reagente de Lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976), e de compostos fenólicos a solução aquosa de cloreto férrico (JOHANSEN, 1940). Após a coloração, os materiais foram montados em lâminas semi-permanentes, e fotomicrografados, atribuindo-se o critério de avaliação segundo os parâmetros: ausência (-) ou presença (+) das substâncias e, quantitativamente, classificados como pouco presente (+), moderadamente presente (++) ou intensamente presente (+++), de acordo com a intensidade das respostas aos testes aplicados, destacando-se que simultaneamente aos testes foram realizadas secções-controle.

## **4.2.2 Análises Ultraestruturais**

As avaliações por meio de microscopia eletrônica de varredura e transmissão foram realizadas no laboratório do Núcleo de Apoio à Pesquisa/ Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA/ESALQ/USP). Como forma de padronização das análises, as amostras foram constituídas da região mediana da lâmina foliar retirada do primeiro nó expandido de cada planta.

### **4.2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para localização da microbiota endofítica amostras, da região mediana da lâmina foliar retirada do primeiro nó expandido de cada microplanta, foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificado (Glutaraldeído 2,5 %, Formaldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2,  $\text{CaCl}_2$  0,001 M). Após a fixação as amostras foram lavadas três vezes por cinco minutos com tampão cacodilato de sódio 0,05 M, e deixadas em glicerina 30 % (em tampão cacodilato) por 2 horas. A seguir as amostras foram criofraturadas com nitrogênio líquido e desidratadas em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100 %) e pela técnica do ponto crítico de  $\text{CO}_2$ , em aparelho Balzers CPD 030. As amostras foram aderidas, com fita dupla face de carbono, a um suporte adequado (*stubs*) e submetidas ao recobrimento com ouro-paládio em metalizador BAL-TEC SCD 050 por 180 segundos. Finalmente foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS, DSM 940 A), utilizando-se 80  $\mu\text{A}$  de amperagem e 15 kV de voltagem.

### **4.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para visualização da microbiota endofítica foram seccionadas as lâminas foliares das microplantas em pequenos segmentos e esses fixados por 24 horas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) tamponado com cacodilato de sódio 0,2 M, em pH 7,2. Após esse período foram lavados no tampão cacodilato de sódio 0,05 % durante 5 minutos por três vezes. A seguir as amostras foram fixadas durante 1 hora com

tetróxido de ósmio a 1 % (v/v), lavadas por três vezes com água destilada, pré-coradas com acetato de uranila 2,5 %, pernoite a 4 °C, desidratadas gradualmente em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100 %). A infiltração pela Spurr, foi realizada gradativamente, primeiro com cetona 100 % e resina pura, numa proporção 1:1 (metade de acetona 100 % e metade de resina pura) por 5 horas e a segunda com resina pura pernoite em temperatura ambiente. Posteriormente, a resina foi polimerizada em estufa a 70 °C durante 72 horas. Os cortes foram examinados ao microscópio eletrônico de transmissão. Os blocos foram cortados em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT) com lâmina de diamante (450). As secções obtidas com aproximadamente 70 nm de espessura foram montadas em telas de 200 mesh, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900) operando em 50 kV.

#### **4.2.3 Análise Molecular**

As análises moleculares foram realizadas no laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), com a orientação da Profa. Dra. Siu Mui Tsai.

Visando conhecer a estrutura e a diversidade bacteriana endofítica das microplantas assintomáticas foram utilizados métodos baseados na análise da heterogeneidade de ácidos nucléicos por meio de amplificação por PCR específica para o gene 16S rRNA, seguida pelo método de PCR-DGGE. Para todas as análises o procedimento iniciou-se com a desinfestação superficial das microplantas (ARAÚJO et al., 2002). Visando confirmar o sucesso do procedimento de desinfestação superficial, fragmentos das microplantas e alíquotas da água esterilizada utilizada para a lavagem final foram plaqueados em meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar, Difco). As placas foram incubadas a 28 °C por sete dias para verificação de um possível crescimento bacteriano. Diante dos resultados desse teste, foram utilizadas para análises posteriores, somente as amostras de plantas que não foram consideradas contaminadas.

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e as reações de sequenciamento no sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Após cada PCR realizada, uma alíquota de 5 µL de cada produto foi avaliada em comparação com o marcador 100 pb (Invitrogen) após corrida eletroforética a 90 V por 30 minutos em gel de agarose 1 %, usando tampão TSB (BRODY; KERN, 2004). Os géis foram documentados usando o programa Kodak digital science 1D (Scientific Imaging Systems). Quando necessário, as amostras também foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

#### **4.2.3.1 Extração do DNA Genômico Total das Microplantas**

A extração do DNA total das amostras foi realizada segundo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Para tanto, foram utilizadas microplantas inteiras e assintomáticas. Cada amostra constituiu-se de 200 mg de tecido fresco que foram trituradas em N<sub>2</sub> líquido. O tecido triturado foi exposto a 700 µL de tampão de extração (CTAB 2 % (p/v); NaCl 1,4 M; Tris HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM) e incubado por 30 min a 65 °C, seguido por duas extrações: a primeira com 450 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e a segunda com 450 µL de fenol tamponado. Após centrifugação de 5 minutos a 13.000 x g o DNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol a -20 °C por 30 a 60 min. O precipitado obtido foi novamente centrifugado e posteriormente lavado com etanol 70 % e 100 %. Após secagem o DNA foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) e posteriormente tratado com 2 µL de RNase (10 mg/mL) por 30 min a 37 °C.

Um volume de 5 µL de DNA foi carregado em gel de agarose 1 % (p/v), corado com brometo de etídeo em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004) e comparado com os padrões Low DNA Mass ladder (Invitrogen) para estimar a quantidade de DNA e/ou λ/Hind III (Invitrogen) para verificar a integridade da molécula de DNA extraída. Os géis foram documentados usando o programa Kodak digital science 1D (Scientific Imaging Systems). As amostras também foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

#### 4.2.3.2. Amplificação do Gene 16S rRNA de Bacteria

Para a amplificação de uma região específica do gene 16S rRNA de *Bacteria* foi utilizado o seguinte conjunto de iniciadores fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e rD1 (5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3') (WEISBURG et al., 1991) - da empresa IDT – Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville – IA, EUA. As amplificações foram feitas em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10 X, 0,1 mM de cada dNTP (0,25 µL), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (0,75 µL), 5 pmol de cada iniciador (1 µL), 1 U de PlatinumR Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (0,2 µL), 1 µL da amostra de DNA total e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; e 72 °C por 10 minutos.

Com as mesmas amostras de DNA foi realizada outra PCR. Desta vez o intuito foi garantir que o DNA bacteriano eventualmente encontrado, fosse realmente procedente de alguma bactéria endofítica. Para tanto foram utilizados os oligonucleotídeos 799f (5'AAC MGG ATT AGA TAC CCK G 3') (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) 1492r (5'TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (LANE, 1991). A reação de amplificação (PCR) foi feita em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10 X, 0,1 mM de cada dNTP (0,25 µL), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (0,75 µL), 5 pmol de cada oligonucleotídeo (1 µL), 1U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (0,2 µL), 1 µL da amostra de DNA e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 s, anelamento a 53 °C por 40 s e extensão a 72 °C por 40 s, extensão final a 72 °C por 10 minutos. Ao final do programa as mostras permaneceram no termociclador a 4 °C.

#### 4.2.3.3 PCR-DGGE

Os produtos resultantes das primeiras amplificações, descritas no item anterior, foram utilizados como DNA molde (~20 ng) para a reação com os *primers* universais F984/GC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCA ACG CGA AGA ACC TTA C 3') e r1378 (5'CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') (HEUER et al., 1997), usando 30 ciclos com temperatura de anelamento a 59 °C. A reação de PCR-DGGE foi preparada para um volume final de 25 µL, usando 2,5 µL de tampão para PCR 10x, 0,2 mM de cada dNTP, 5 pmol de cada primer, 1 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (0,2 µL), com 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> e presença de 0,25 µL formamida deionizada. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 94 °C por 4 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 59 °C por 1 min e 72 °C por 2 min; e 72 °C por 10 min.

#### 4.2.3.4 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

O DGGE foi realizado usando o sistema phorU2 (Ingeny, Goes, Holanda). O protocolo da técnica de DGGE foi adaptado de Muyzer, de Waal e Uitterlinden (1993). Os produtos amplificados na segunda reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6 % (p/v) em tampão TAE 0,5x (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,0). O gel foi preparado com gradiente desnaturante linear 45-65 % (onde 100 % de desnaturação significa 7 M de uréia e 40 % de formamida). O gel foi submetido à eletroforese vertical por 4 h a 200 V em temperatura constante de 60 °C. Após a eletroforese o gel foi corado com nitrato de prata 0,2 % e fotodocumentados. As imagens do gel foram normalizadas e os perfis foram analisados utilizando-se a plataforma do software BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths). A tolerância com respeito ao posicionamento das bandas foi de 1 %. A análise de agrupamento hierárquico foi feita usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) e a correlação foi calculada baseada nos coeficientes de Pearson (curva densitométrica), Jaccard e Dice (presença/ausência). A análise de componentes principais (PCA, do inglês principal component analysis) foi realizada usando a

plataforma do software BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths) e os pacotes do CANOCO for Windows 4.5 (Biometris).

#### **4.2.4 Isolamento de Microrganismos Endofíticos**

A unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri (15 mL de meio de cultura) com 50  $\mu$ L de cada solução diluída ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) de tecido macerado ou com oito fragmentos de tecido vegetal. As colônias obtidas foram repicadas em meio LB (Luria Broth “Luria-Bertani”, Difco) e purificadas pelo método de estrias. Amostras das colônias purificadas foram crescidas sob agitação, por 48 horas em meio LB e parte foi armazenada em solução de glicerol 50 % em congelador a  $-80$  °C, enquanto a outra parte teve seu DNA extraído.

##### **4.2.4.1 Primeira Fase**

Amostras, contendo 1 g, de microplantas “axênicas” das diferentes espécies foram trituradas em almofariz autoclavado ( $125$  °C,  $1,3$  atm, por 20 minutos), com 3 mL de solução tampão PBS ( $8\text{g.L}^{-1}$  de NaCl;  $0,2$   $\text{g.L}^{-1}$  de KCl;  $1,44$   $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $0,24$   $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), em pH 7,4. Esse procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Alíquotas foram utilizadas para diluições ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) e plaqueamentos em seis diferentes meios de cultura (sólidos e líquidos): TSA (Tryptic Soy Agar, Difco), TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) LB (Luria Broth “Luria-Bertani”, Difco), BDA (Batata, Dextrose, Agar), PCAT ( $2$   $\text{g.L}^{-1}$  de ácido azeláico;  $0,2$   $\text{g.L}^{-1}$  de asparagina;  $0,2$   $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $4$   $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $4$   $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $0,02$   $\text{g.L}^{-1}$  de extrato de levedura;  $20$   $\text{g.L}^{-1}$  de agar; em pH 5,7) e BG-11 (ALLEN, 1968). Além do método de trituração, também foi realizado o método de fragmentação do tecido vegetal, sendo os fragmentos colocados nos cinco diferentes meios para o isolamento. Os cultivos foram posteriormente incubados à  $28$  °C em estufa bacteriológica, onde o desenvolvimento de colônias foi avaliado na primeira semana (diariamente) e a partir da segunda semana (semanalmente), durante quatro meses, considerando-se a possibilidade de haver endófitos fastidiosos.

Cabe salientar que nesta fase de pré-teste foi realizada uma repetição, com o objetivo de avaliar os diferentes métodos de isolamento e os diferentes meios. Além disso, a fim de isolar o efeito manipulador e ambiente na presença ou ausência dos microrganismos endofíticos, foi realizado um experimento paralelo, no qual, todas as 17 plantas foram multiplicadas por um único manipulador e mantidas num único ambiente. Perfazendo nessa fase um total de 34 plantas. A Figura 3 ilustra com detalhes esta primeira fase.

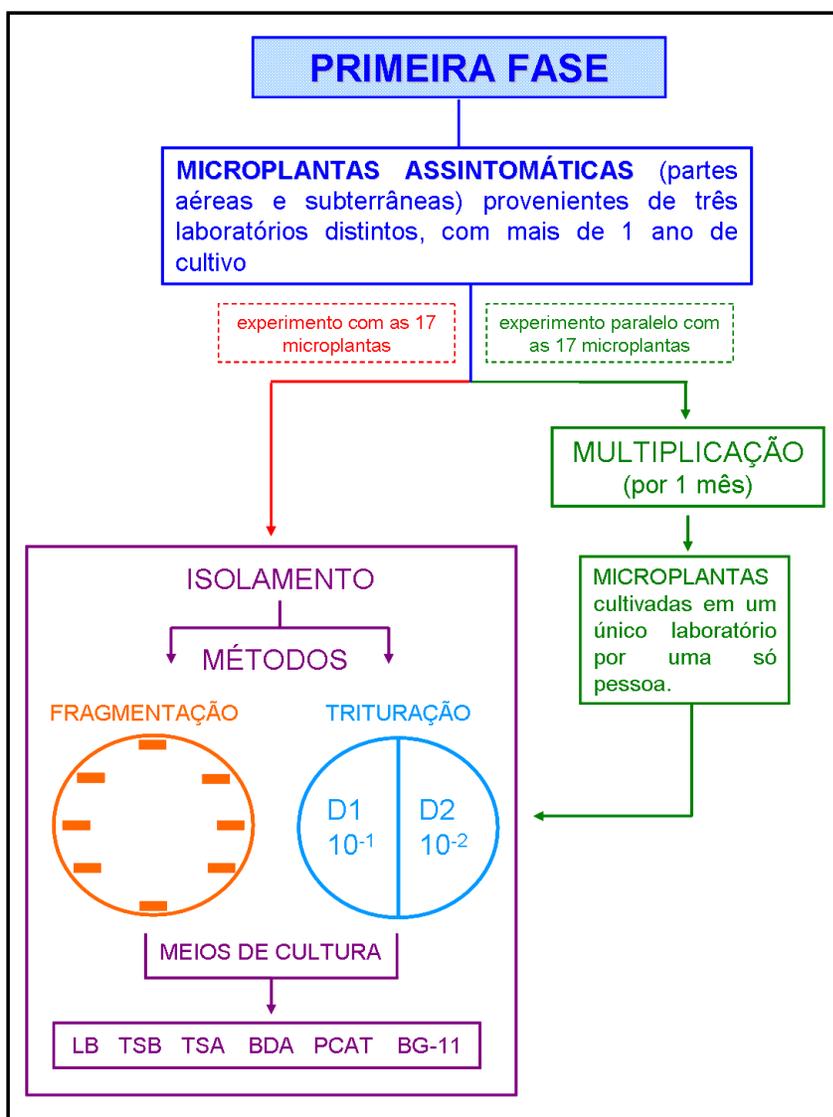


Figura 3 – Ilustra a primeira fase do isolamento, na qual se observa as microplantas selecionadas dos três laboratórios e submetidas diretamente ao isolamento (experimento com as 17 microplantas), e aquelas selecionadas, multiplicadas e posteriormente submetidas ao isolamento (experimento paralelo com as 17 microplantas)

#### 4.2.4.2 Segunda Fase

De acordo com os resultados obtidos na primeira fase, realizou-se a segunda etapa de isolamento (Figura 4), sendo escolhido o método de trituração, utilizando-se 1 g de tecido vegetal triturado com 3 mL de solução tampão PBS e plaqueadas (100 µL) diretamente em meio LB com três repetições. Os cultivos foram posteriormente incubados à 28 °C em estufa bacteriológica, onde o desenvolvimento de colônias foi avaliado na primeira semana (diariamente) e a partir da segunda semana (semanalmente), durante quatro meses, considerando-se a possibilidade de haver endófitos fastidiosos.

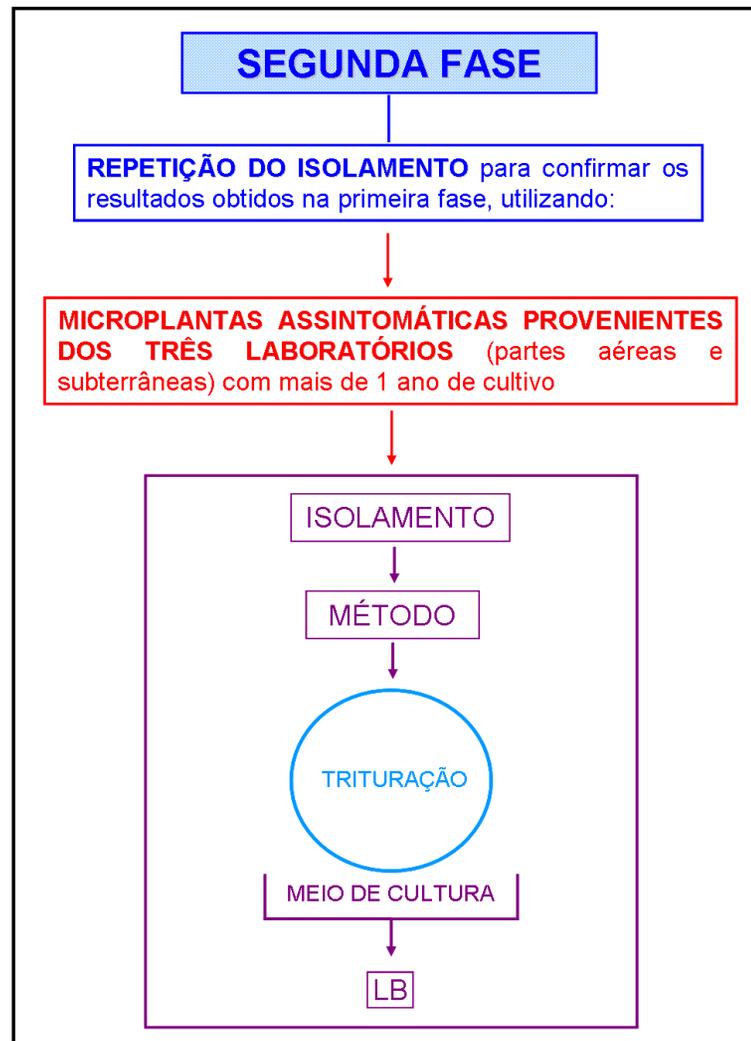


Figura 4 – Ilustração detalhada dos procedimentos da segunda fase do isolamento, na qual se utilizou as microplantas provenientes dos três laboratórios, isoladas por trituração no meio LB

### 4.3 Isolados

#### 4.3.1 Extração do DNA dos Microrganismos Isolados

Para a extração do DNA dos isolados microbianos, os mesmos foram subcultivados em meio LB líquido e alíquotas (1,5 mL) da cultura foram centrifugadas a 13.000 x g por 60 segundos e as células ressuspensas em 200 µL de tampão de extração A (Triton X 20 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris HCl pH 8,0 10 mM, EDTA pH 8,0 1 mM). A seguir, foram adicionados 200 mg de pérolas de vidro (0,1), 100 µL de fenol, 100 µL de CIA (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico), vortexados por três minutos e acrescentados 200 µL de TE (Tris pH 8,0 1 M e EDTA pH 8,0 0,5 M). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13.000 x g por 5 minutos. A solução sobrenadante foi retirada e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, e adicionados 1000 µL de etanol 100 %. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13.000 x g por 4 minutos. A solução sobrenadante foi descartada e o *pellet* ressuspensado com 400 µL TE (Tris pH 8,0 1 M e EDTA pH 8,0 0,5 M) e 10 µL de acetato de amônio 4 M). As amostras foram homogeneizadas, com posterior adição de 1000 µL de etanol 100 % e centrifugação a 13.000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* seco em concentrador por 10 minutos foi ressuspensado em 40 µL de Tris-RNase e incubado a 37 °C por 30 minutos.

O DNA extraído foi quantificado por meio de espectrofotometria, adotando-se 1,0 de densidade óptica a 260 nm (DO<sub>260</sub>) como sendo igual a 50 ng de DNA/µL.

#### 4.3.2 Amplificação do Gene 16S rRNA de *Bacteria*

Para a amplificação de uma região específica do gene 16S rRNA de *Bacteria* foi utilizado o seguinte conjunto de iniciadores fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e rD1 (5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3') (WEISBURG et al., 1991) - da empresa IDT – Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville – IA, EUA. As amplificações foram feitas em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10 X, 0,1 mM de cada dNTP (0,25 µL), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (0,75 µL), 5 pmol de cada *primer* (1 µL), 1 U de PlatinumR

Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (0,2  $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA total (~20 ng) e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As amplificações foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos; e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Ao final do programa as amostras permaneceram no termociclador a 4 °C. Para cada amostra, uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  do produto da PCR foi avaliada em comparação com os marcadores Low DNA Mass ladder (Invitrogen) e 100 pb (Invitrogen), após corrida eletroforética a 90 V por 30 minutos em gel de agarose 1 %, usando tampão TSB (BRODY; KERN, 2004).

Em seguida, os produtos foram purificados com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences) conforme as instruções do fabricante e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). As amostras purificadas foram submetidas a reações de sequenciamento utilizando-se, separadamente, 1  $\mu\text{L}$  (5 pmol) de cada um dos primers fD1 e rD1 (WEISBURG et al.,1991), 200 ng de DNA, 2  $\mu\text{L}$  de DYEnamic (DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, GE Healthcare Life Sciences), 3  $\mu\text{L}$  de tampão de diluição 2,5x (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . As reações foram conduzidas nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação a 95 °C por 20 s, anelamento a 55 °C por 15 s, extensão a 60 °C por 60 s. Ao final do programa as amostras permaneceram no termociclador a 4 °C.

### 4.3.3 Sequenciamento

Após as reações as amostras foram precipitadas para o sequenciamento conforme instrução do fabricante. Adicionou-se 2  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio/EDTA e 60  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. O material foi misturado em agitador automático (vortex) e centrifugado 12000 rpm, por 15 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70 %. Foi realizada nova mistura em vortex e centrifugação a 12000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi removido e as amostras

levadas ao concentrador de DNA (Eppendorf) por 10 min. Depois de secas as amostras foram ressuspensas em 10  $\mu$ L de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) e agitadas em vortex por 10 min.

O sequenciamento foi realizado no sequenciador capilar automático modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas tiveram seus cromatogramas analisados e posteriormente foram editadas utilizando o pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) a fim de estabelecer as sequências consenso e remover as bases com baixa qualidade. O nível de exigência mínimo foi de 600 bases e Phred com qualidade de base acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas). As sequências consenso foram comparadas por similaridade com sequências de nucleotídeos disponibilizadas no banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando o programa nucleotide blast do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Microplantas

#### 5.1.1 Testes Histoquímicos

Com relação aos resultados obtidos nos testes histoquímicos foi possível observar uma grande variedade de respostas, devido principalmente às características intrínsecas de cada espécie estudada, o que torna difícil afirmar que exista uma relação direta entre os microrganismos e a produção de qualquer um dos compostos avaliados. A Tabela 2 evidencia a relação dos resultados do acúmulo de amido, lipídeo e compostos fenólicos de cada microplanta.

Nas microplantas assintomáticas de abacaxi e de orquídea dos três laboratórios é possível verificar a semelhança nas respostas aos reagentes, e nas demais microplantas verifica-se a diversidade de respostas, inerentes às características de cada espécie (Figuras 5, 6 e 7).

Em todas as microplantas estudadas (Figura 5), exceto para a microplanta mogno (Figura 5Q), foi possível observar em maior ou menor intensidade a presença de compostos fenólicos, na forma de pequenas pontuações marrom escuro, em todo o mesofilo, sobre as células do parênquima, bainha do feixe vascular, como é o caso da microplanta de cana-de-açúcar (Figura 5K), e também na epiderme, como nas microplantas de cúrcuma e manjerição (Figura 5I-J). Tais compostos são metabólitos secundários provenientes da rota do ácido chiquímico ou da rota do ácido mevalônico (CUNHA; ROQUE, 2005; KUKLINSKI, 2000; NASCIMENTO-SILVA; CHINALIA; PAIVA, 2008).

A presença desses compostos pode auxiliar a planta de diversas formas, como suporte mecânico, atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, contra herbivoria, ataque de patógenos, ação alelopática e proteção contra radiação UV (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; SANTOS et al., 2009; TAIZ; ZEIGER, 2004). Muitos desses compostos, como a antocianina, carotenóides e óleos essenciais podem influenciar na

polinização, na dispersão de frutos e sementes e na simbiose radicular com bactérias (MARTINS et al., 1994; SANTOS et al., 2009).

Tabela 2 – Mostra a relação das microplantas e os resultados dos testes histoquímicos realizados, para amido, lipídeo e compostos fenólicos

PLANTA	AMIDO	LIPÍDEO	COMPOSTOS FENÓLICOS
ABACAXI 1	-	+++	++
ABACAXI 2	-	+++	++
ABACAXI 3	-	+++	++
ORQUÍDEA 1	-	+++	++
ORQUÍDEA 2	-	+++	++
ORQUÍDEA 3	-	+++	++
PINHEIRO 1	-	+++	+++
SEQUÓIA 1	-	+++	+++
TECA 1	-	+	+
VIOLETA 1	-	+++	++
VIOLETA 2	-	+++	++
CANA-DE-AÇÚCAR 2	-	++	++
CÚRCUMA 2	-	+++	+
EUCALIPTO 2	-	+	++
MANJERICÃO 3	-	+++	+
PUPUNHEIRA 3	-	+++	++
MOGNO 3	+	++	-

Nota: Os números junto aos nomes das plantas representam respectivamente os laboratórios: 1 = Fisiologia de Árvores, 2 = Cultura de Tecidos e 3 = Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, e os sinais (-) ou (+) representam respectivamente ausência ou presença das substâncias e, quantitativamente, classificados como pouco presente (+), moderadamente presente (++) ou intensamente presente (+++), de acordo com a intensidade das respostas aos testes aplicados.

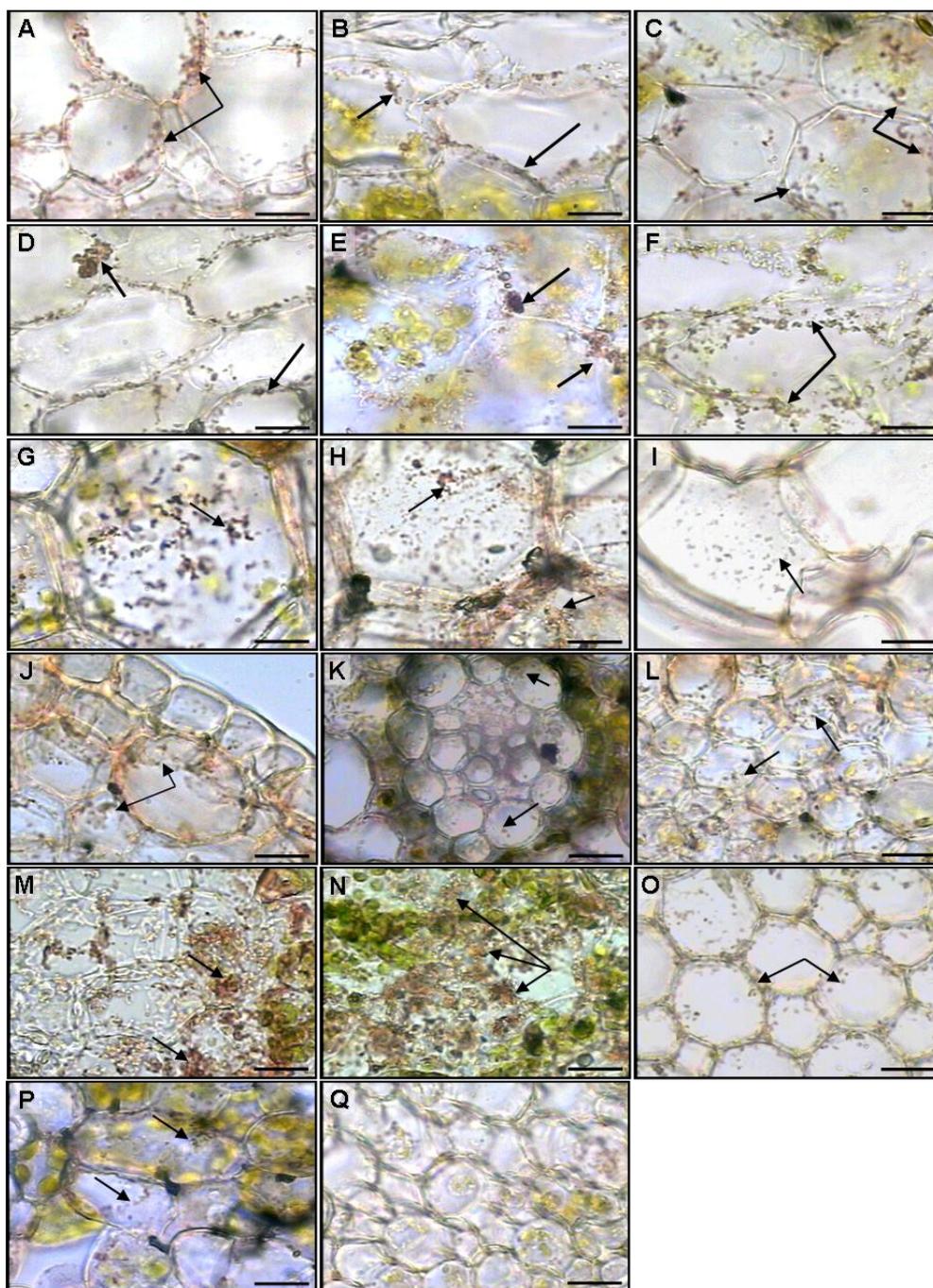


Figura 5 – Reação histoquímica de compostos fenólicos em secções transversais do terço médio da lâmina foliar das microplantas. A: Abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores. B: Abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos. C: Abacaxi do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. D: Orquídea do laboratório de Fisiologia de Árvores. E: Orquídea do laboratório de Cultura de Tecidos. F: Orquídea do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. G: Violeta do laboratório de Cultura de Tecidos. H: Violeta do laboratório de Fisiologia de Árvores. I: Cúrcuma. J: Manjerição. K: Cana-de-açúcar. L: Eucalipto. M: Pinheiro. N: Sequóia. O: Teca. P: Pupunheira. Q: Mogno. Sendo que na figura (Q) a reação foi negativa e nas demais a reação foi positiva na forma de pontuações marrom escuro (setas) em células da bainha do feixe vascular (K), células da epiderme (I e J) e células do mesófilo (demais). Barra = 20µm

Há indícios de que os endófitos podem atuar no sistema de defesa da planta, contribuindo para uma mudança estrutural na célula que envolve, entre outras coisas, a mudança da parede celular com deposição de polissacarídeos como a calose, e a infiltração de compostos fenólicos que contribuem com a compactação dos polissacarídeos da matriz celular, e quando formados nos espaços intercelulares da célula hospedeira podem restringir o crescimento de fungo, criando um ambiente fungistático (BENHAMOU; KLOEPPER; TUZUN, 1998). Tal característica de defesa tem sido verificada em diversos estudos e explorada como um potencial uso para controle biológico de diversos fitopatógenos, o que mostra o importante papel que esses endófitos podem desempenhar nas plantas.

Madhaiyan et al. (2004) relataram que bactérias do gênero *Methylobacterium* induziram resistência sistêmica em plantas de arroz, que por sua vez, produziram compostos fenólicos e proteínas de resposta contra *Rhizoctonia solani*, e afirmaram ainda, que a atividade da bactéria e o aumento no acúmulo desses compostos está diretamente relacionada com o patógeno, com as condições fisiológicas e o genótipo da planta. Trotel-Aziz et al. (2008) afirmaram que *Acinetobacter lwoffii* é um importante agente de biocontrole de *Botrytis cinerea* em uva, por induzir respostas de defesa na planta, pela produção de fenilalanina amônia liase (PAL) que é uma enzima chave na síntese de ácido salicílico e compostos fenólicos, ambos associados com a resistência na planta.

Em relação à reação histoquímica para lipídeos, as respostas foram todas positivas (Figura 6) na forma de pontuações e contornos que variam de azul escuro a preto nas paredes das células de todos os tecidos do mesofilo e azul mais claro nas células de ambas as epidermes e cutícula, variando de uma espécie para outra somente na intensidade da reação.

Para as microplantas de eucalipto e teca, a reação se deu com mais intensidade nas células de ambas as epidermes (Figuras 6O) e na cutícula (Figura 6L), havendo uma reação menos expressiva nas células do mesofilo, já nas demais espécies essa reação foi oposta, sendo mais intensa justamente no mesofilo (Figuras 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H, 6J, 6K, 6N, 6M, 6P e 6Q).

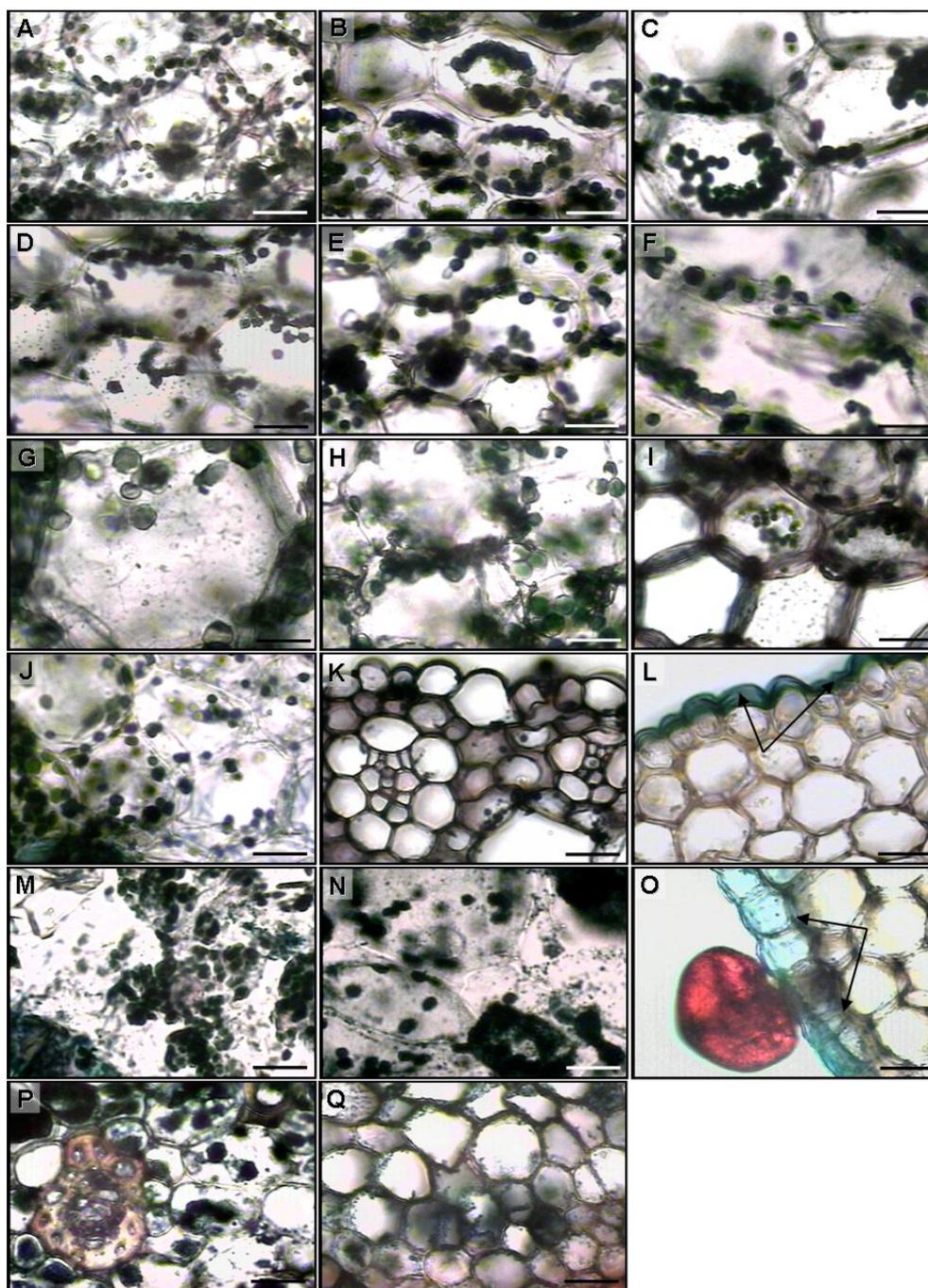


Figura 6 – Reação histoquímica de lipídeos em secções transversais do terço médio da lâmina foliar das microplantas. A: Abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores. B: Abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos. C: Abacaxi do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. D: Orquídea do laboratório de Fisiologia de Árvores. E: Orquídea do laboratório de Cultura de Tecidos. F: Orquídea do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. G: Violeta do laboratório de Cultura de Tecidos. H: Violeta do laboratório de Fisiologia de Árvores. I: Cúrcuma. J: Manjeriço. K: Cana-de-açúcar. L: Eucalipto. M: Pinheiro. N: Sequóia. O: Teca. P: Pupunheira. Q: Mogno. Sendo que em todas as figuras as reações foram positivas, variando de azul escuro a preto nas paredes celulares de todos os tecidos do mesofilo (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, M, N, P e Q) e azul mais claro (setas) nas células epidérmicas (O) e cutícula (L). Barra = 20µm

Os lipídeos, além de constituintes das membranas celulares, podem auxiliar na prevenção de perda excessiva de água e na resistência a doença (MENEZES; SILVA; MELO-DEPINNA, 2003; TAIZ; ZEIGER 2004). Sob o ponto de vista da cultura de tecidos a água pode ser um fator limitante em situações extremas, quando o subcultivo não ocorre regularmente, de maneira geral o suprimento de água para a microplanta é ideal.

A reação histoquímica para amido foi negativa em todas as espécies, exceto para as microplantas de mogno (Figura 7Q), na qual se pôde observar a presença de grânulos de amido nas células do parênquima paliçádico. A ausência nas demais espécies (Figura 7) pode ser explicada pelo fato de que as condições de cultura de tecidos representam um ambiente controlado e que supri todas as necessidades nutricionais das microplantas, pelo uso de meios de cultivo balanceados e adequados a cada espécie, não havendo, portanto a necessidade de acumular substâncias de reserva como é o caso do amido.

Cabe salientar, neste aspecto, que as microplantas podem ser consideradas como heterotróficas, tendo sua fotossíntese alterada pelo teor de açúcares exógenos disponíveis no meio de cultura (ESCALONA et al., 2003; TICHÁ et al., 1998; VAN LE; SAMSON; DESJARDINS, 2001). A heterotrofia ou mixotrofia contribui para a reciclagem dos produtos da respiração celular fazendo com que a fotossíntese deixe de ser a principal fonte de carbono (ABREU-TARAZI, 2010).

Além disso, o fato de a reação com amido ter sido negativa, no terço médio da lâmina foliar, para a maioria das microplantas representa uma resposta comum a grande parte das espécies, podendo ser benéfica do ponto de vista metabólico, uma vez que o amido pode afetar diretamente as reações fotossintéticas da planta, pois dificulta a chegada do dióxido de carbono aos sítios de carboxilação da Rubisco (NASCIMENTO-SILVA; CHINALIA; PAIVA, 2008).

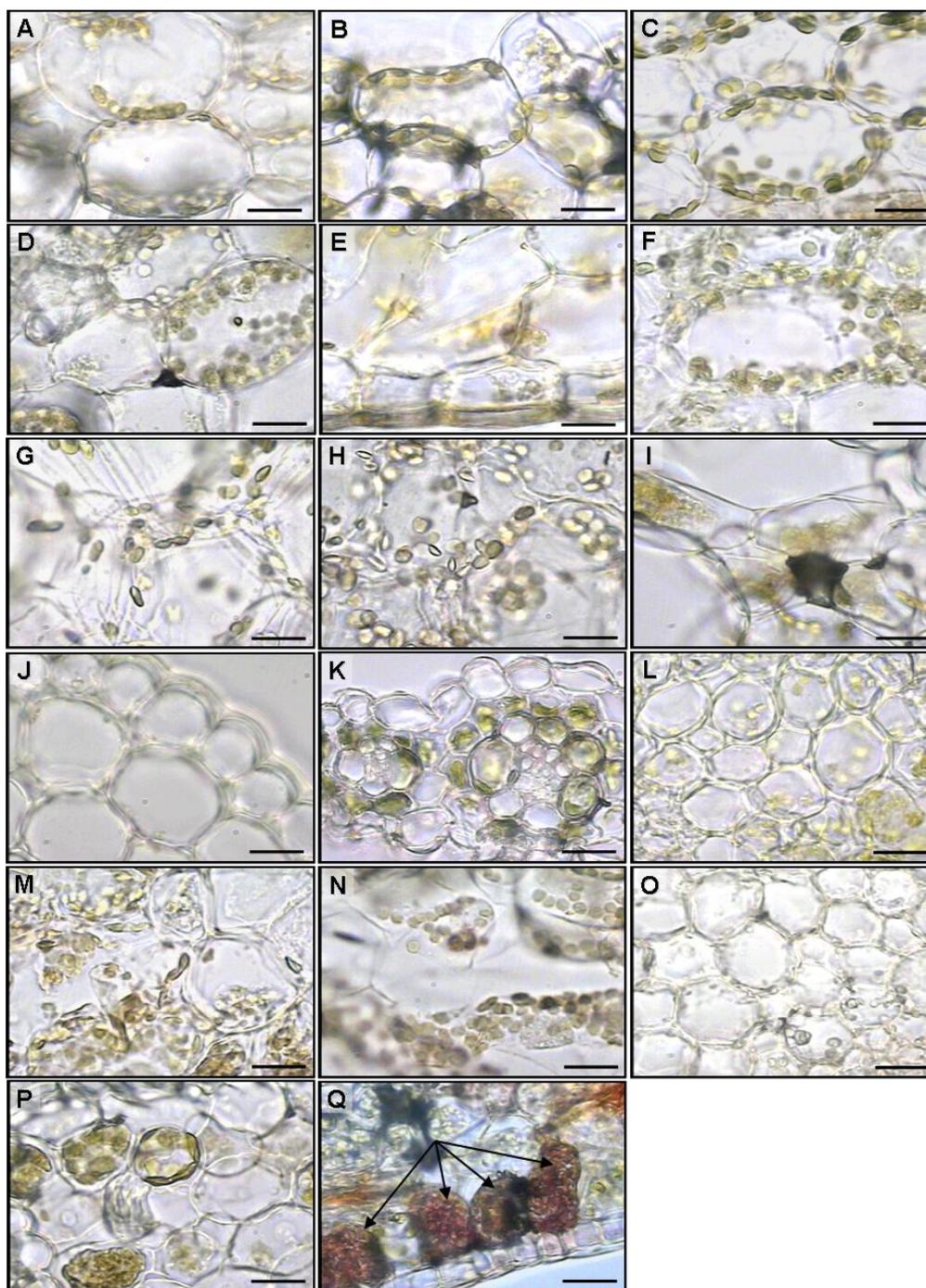


Figura 7 – Reação histoquímica de lipídeos em secções transversais do terço médio da lâmina foliar das microplantas. A: Abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores. B: Abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos. C: Abacaxi do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. D: Orquídea do laboratório de Fisiologia de Árvores. E: Orquídea do laboratório de Cultura de Tecidos. F: Orquídea do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. G: Violeta do laboratório de Cultura de Tecidos. H: Violeta do laboratório de Fisiologia de Árvores. I: Cúrcuma. J: Manjerição. K: Cana-de-açúcar. L: Eucalipto. M: Pinheiro. N: Sequóia. O: Teca. P: Pupunheira. Q: Mogno. Sendo que somente na figura (Q), verifica-se reação positiva com presença de grânulos de amido (setas) nas células do parênquima paliçádico. Barra = 20µm

Poucos são os trabalhos que descrevem as características de acúmulo de componentes nas plantas por meio de testes histoquímicos, o que dificulta sobremaneira a comparação dos resultados obtidos com a literatura, principalmente trabalhos que retratem as espécies do presente estudo salientando que tais trabalhos se restringem à verificação de espécies de interesse farmacológico ou medicinal. Além disso, somente um trabalho que conseguisse obter plantas verdadeiramente axênicas poderia ser capaz de comprovar a responsabilidade ou participação de um determinado microrganismo na produção e acúmulo desses compostos.

### **5.1.2 Análise Ultraestrutural**

#### **5.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise ultraestrutural por meio da MEV permitiu observar os microrganismos endofíticos colonizando diversos tecidos da lâmina foliar das microplantas assintomáticas, consideradas axênicas, como epiderme, parênquima e bainha do feixe vascular. As células bacterianas estão presentes nas paredes internas, sem padrão de distribuição nas células, os formatos e tamanhos tiveram pequenas variações nas microplantas, podendo caracterizar uma diversidade de microrganismos.

Para as microplantas assintomáticas de abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores, foi possível verificar a presença de dois grupos básicos de microrganismos no parênquima clorofiliano, o primeiro constituído por microrganismos maiores com formato arredondado (Figura 8A) e o segundo, por microrganismos menores de formato que varia de arredondado a bastonete (Figuras 8B-C). Já nas microplantas assintomáticas de abacaxi dos laboratórios de Cultura de Tecidos e de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, foi possível verificar a presença de microrganismos um pouco menores (Figuras 8D-I) e de formato arredondado, presentes nas células do parênquima clorofiliano e bainha do feixe vascular.

Em todas as microplantas de abacaxi foi evidente a formação de biofilmes por aglomerados bacterianos intracelulares (Figuras 8A, 8C, 8E, 8F e 8G). Os biofilmes microbianos são complexos e análogos a tecidos organizados de espécies superiores,

compostos por polissacarídeos, que envolvem a superfície de tecidos protegendo-o contra a dessecação, pois tendem a absorver água e formar um microclima saturado que protege não só o vegetal como os microrganismos associados, auxiliando no estabelecimento da planta, principalmente em ambientes inóspitos, no crescimento e na proteção contra o ataque de patógenos (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; BARROW; OSUNA-AVILA; REYES-VERA, 2004).

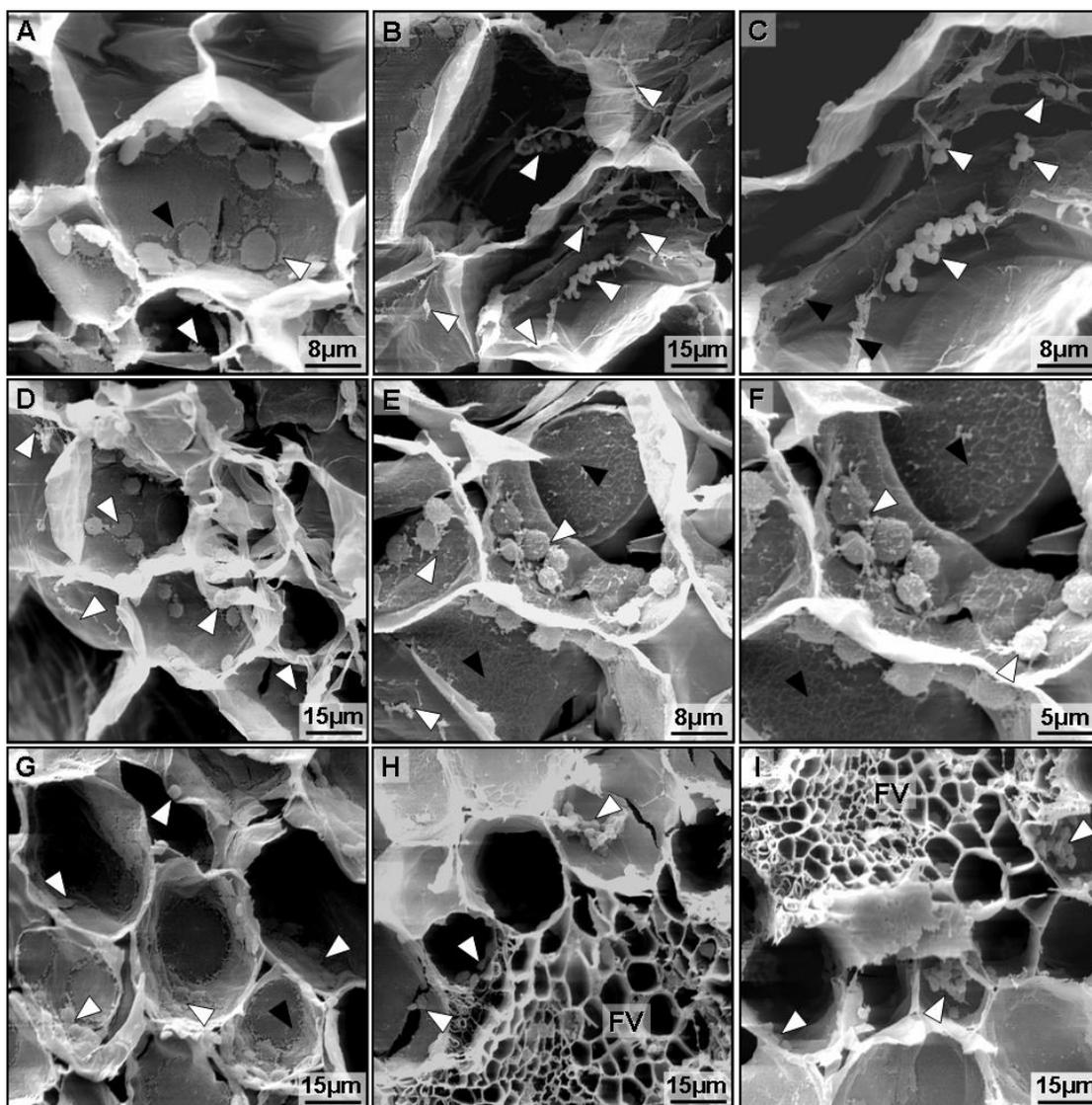


Figura 8 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas de abacaxi. A – C: Laboratório de Fisiologia de Árvores. D – F: Laboratório de Cultura de Tecidos. G – I: Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. Com destaque aos microrganismos (setas brancas) colonizando as células parenquimáticas (A, B, C, D, E, F e G) e da bainha do feixe vascular (H e I), além da produção de biofilme (setas pretas)

Nas microplantas assintomáticas de orquídea (Figura 9), foi possível observar bactérias muito semelhantes em formato às encontradas em abacaxi, colonizando os tecidos da lâmina foliar, inclusive com formação de biofilmes (Figura 9B, 9E, 9H), mesmo não tendo havido resultado no isolamento. O fato de se verificar microrganismos num tecido não garante o seu isolamento, podendo se tratar de microrganismos fastidiosos (não cultiváveis). Esses resultados comprovam a eficácia e rapidez de métodos diretos e independentes de cultivo para a investigação da microbiota endofítica presente nas microplantas.

Nas demais microplantas estudadas foi possível observar a presença, de moderada a alta, de microrganismos colonizando os tecidos do terço médio da lâmina foliar (Figuras 10, 11 e 12). Em microplantas assintomáticas de violeta dos dois laboratórios, cúrcuma e manjerição (Figura 10) observam-se microrganismos semelhantes em formato e tamanho com os encontrados nas microplantas de abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores.

Outro padrão de microrganismos pode ser observado em microplantas de cana-de-açúcar, eucalipto, pinheiro e sequóia (Figura 11), pois, além dos microrganismos de formato arredondado semelhantes aos das outras microplantas, existe um aglomerado dentro das células do parênquima (Figuras 11C, 11E, 11G e 11L), podendo ser a associação das bactérias e o biofilme produzido, dando a impressão de ser uma “massa”. Dong et al. (1994) trabalhando com cana-de-açúcar observaram claramente em MEV tais aglomerações de mucilagem, aferindo sua importância na fixação dessas bactérias nas paredes celulares. Além disso, segundo Watnick e Kolter (2000), as bactérias ao se associarem a biofilmes são favorecidas e resistem à ação de patógenos, antibióticos e detergentes. Neste contexto, ressalta-se, ainda o trabalho de Abreu-Tarazi (2010), no qual reafirma a importância dos biofilmes e o seu papel na absorção e translocação de antibióticos pelas raízes de microplantas de abacaxi.

Cabe destacar uma semelhança das bactérias de cana-de-açúcar observadas na Figura 11B, com as observadas no trabalho de Franke-Whittle et al. (2005), que inocularam *Gluconacetobacter sacchari*, isoladas de plantas de cana-de-açúcar, em microplantas axênicas de cana-de-açúcar e observaram em MEV, podendo ser as bactérias inoculadas ou endofíticas já presentes nas microplantas. Além disso, os

mesmos autores revelaram a existência dessas bactérias isoladas ou em grupos de até quatro células, nos espaços intercelulares e intracelulares de células do parênquima de microplantas de cana-de-açúcar.

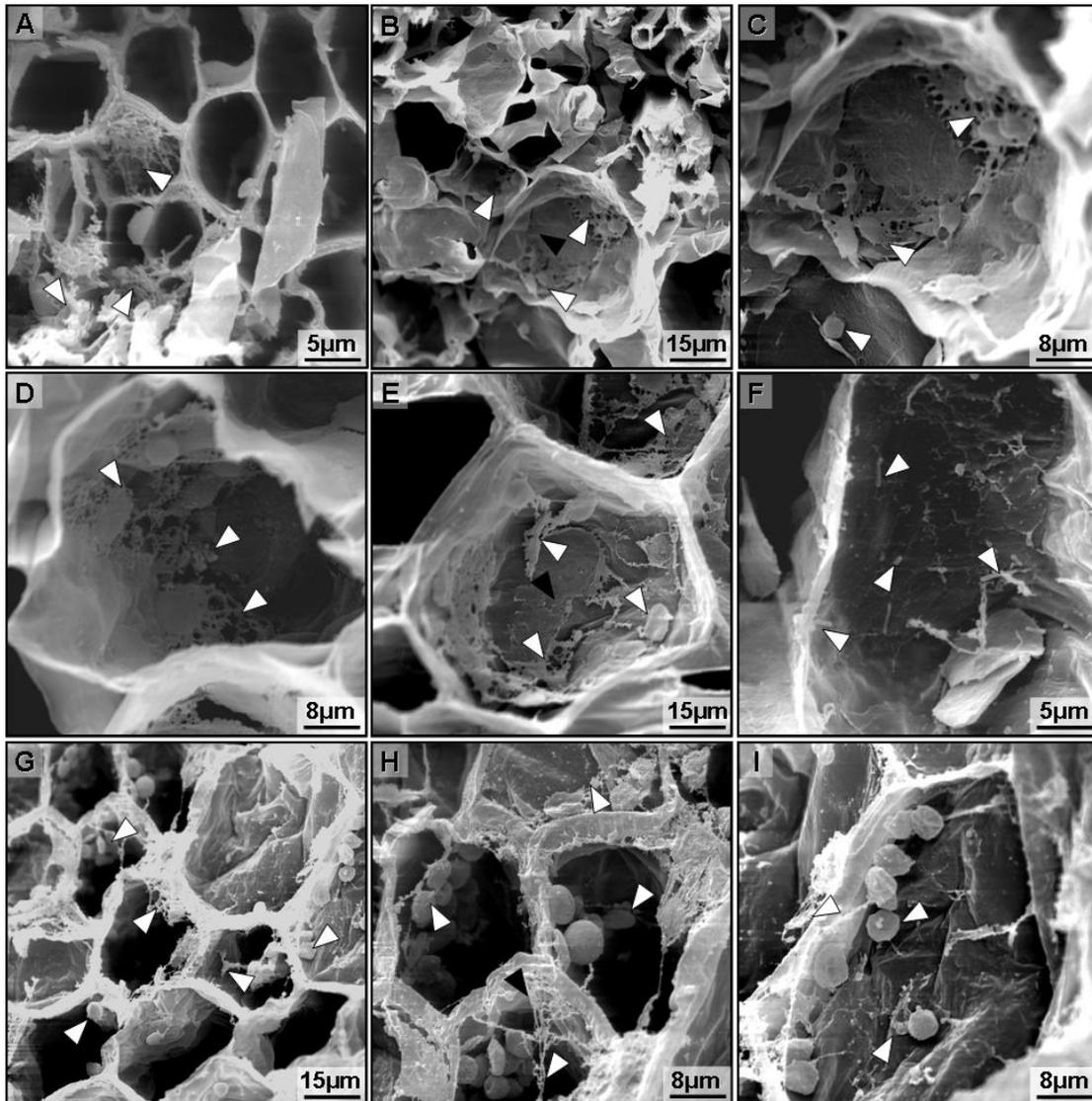


Figura 9 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas de orquídea. A – C: Laboratório de Fisiologia de Árvores. D – F: Laboratório de Cultura de Tecidos. G – I: Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. Com destaque aos microrganismos (setas brancas) colonizando as células parenquimáticas do mesofilo, além da produção de biofilme (setas pretas)

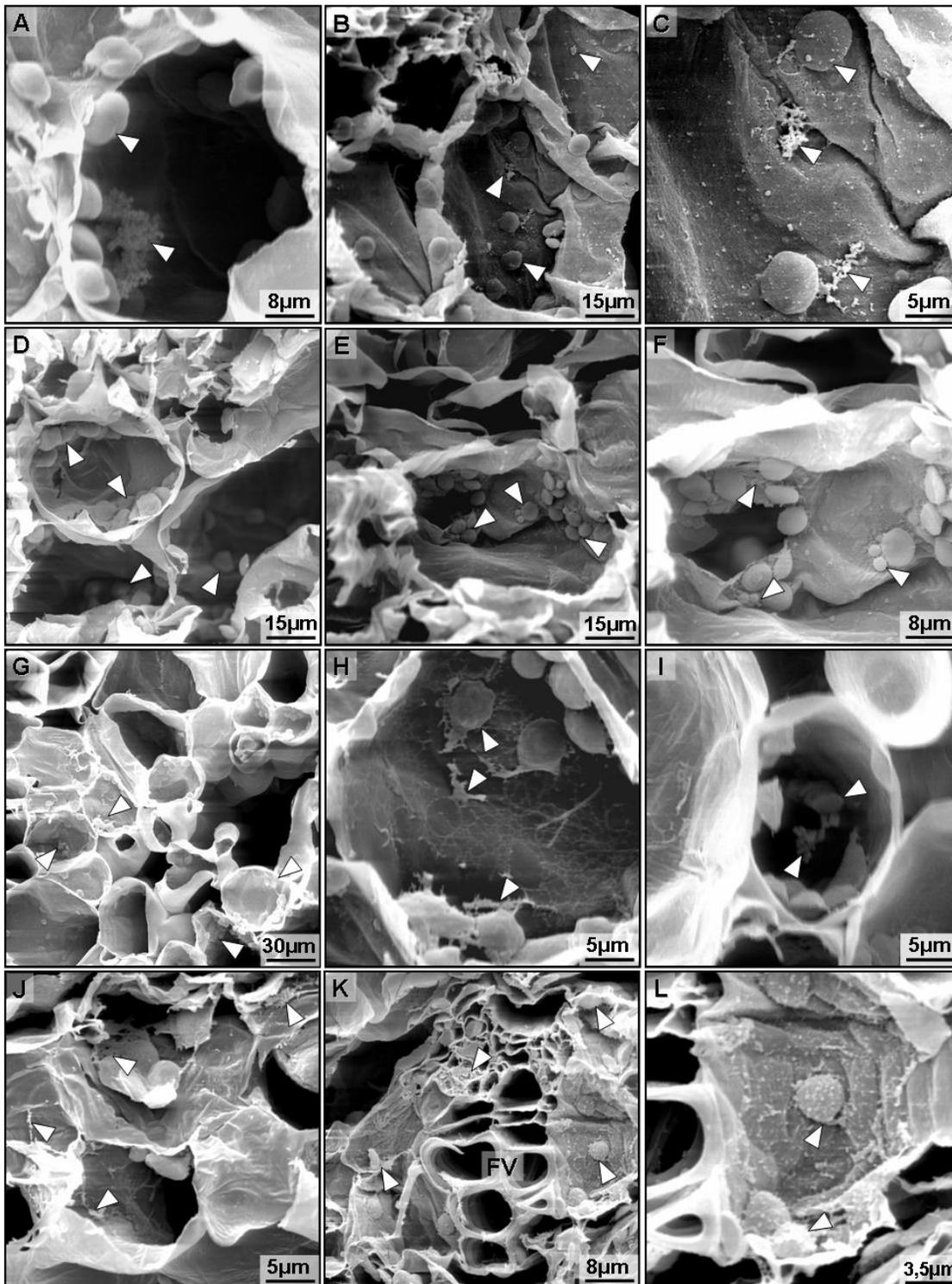


Figura 10 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas. Com destaque às bactérias (setas brancas) presentes nas células parenquimáticas e da bainha do feixe vascular (FV). A – C: Violeta do laboratório de Cultura de Tecidos. D – F: Violeta, do laboratório de Fisiologia de Árvores. G – I: Cúrcuma. J – L: Manjerição

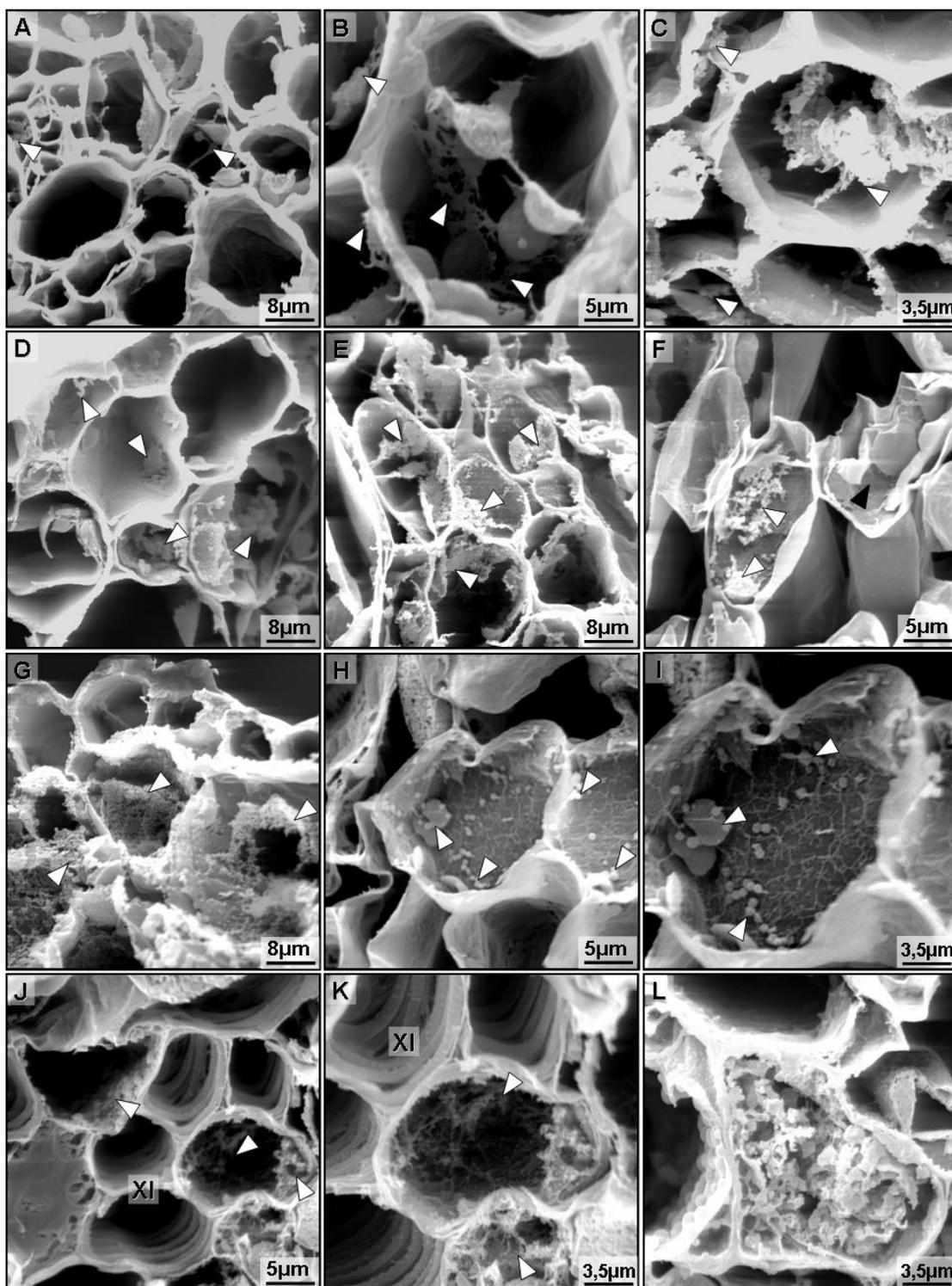


Figura 11 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas. Com destaque às bactérias (setas brancas) presentes nas células parenquimáticas, da bainha do feixe vascular (FV). A – C: Cana-de-açúcar. D – F: Eucalypto. G – I: Pinheiro. J – L: Sequóia. Sendo XI = xilema

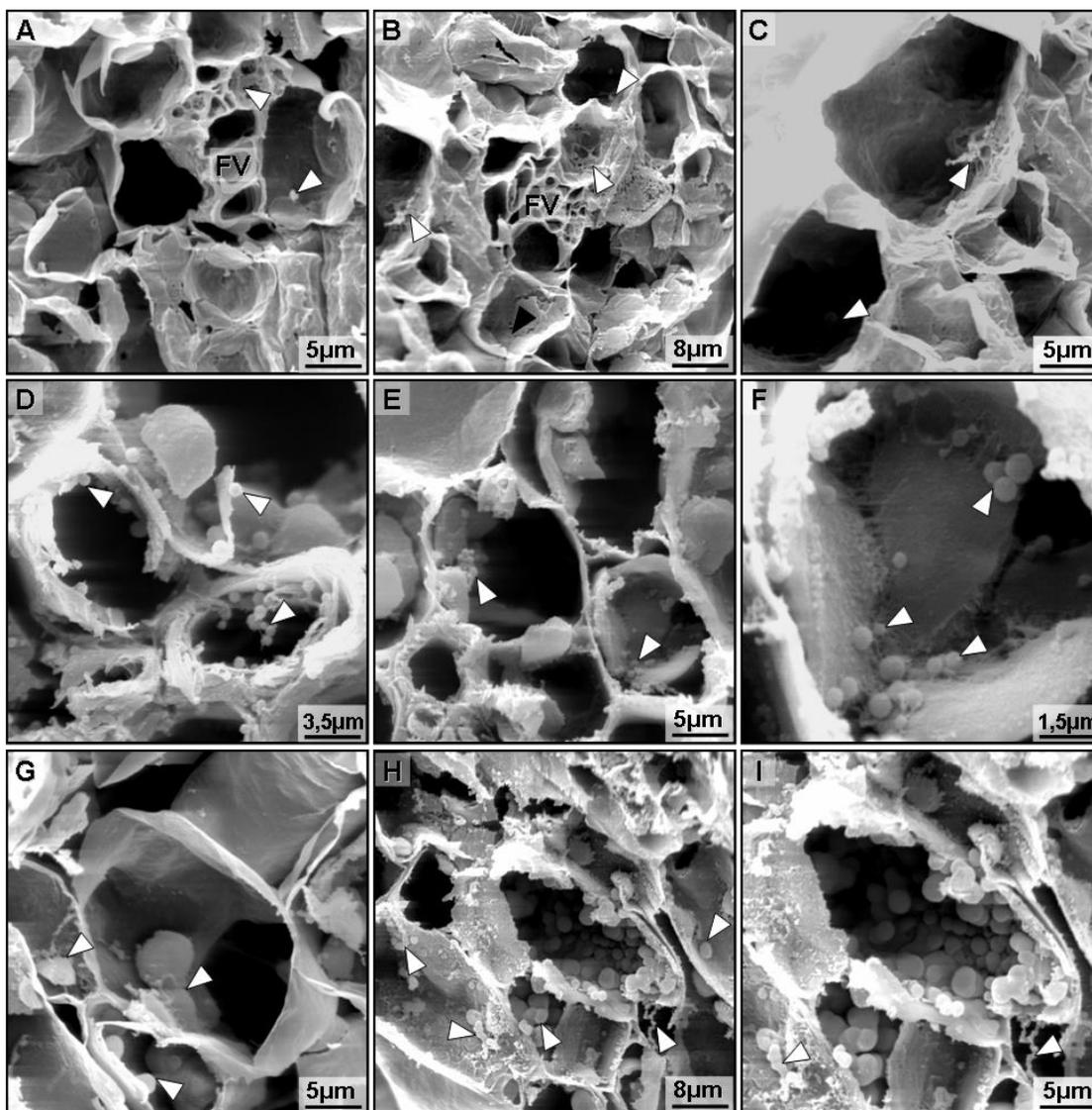


Figura 12 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas. Com destaque às bactérias (setas brancas) presentes nas células parenquimáticas e da bainha do feixe vascular (FV). A – C: Teca. D – F: Pupunheira. G – I: Mogno

As imagens das microplantas assintomáticas de mogno (Figuras 12G-I) evidenciam a existência predominante de um grupo de microrganismos arredondados relativamente pequenos. Em pupunheira essas células microbianas são ainda menores (Figuras 12D-F), o que comprova uma diversidade de espécies que colonizam os tecidos de plantas arbitrariamente classificadas como axênicas. A morfologia das células bacterianas se assemelha com a morfologia de algumas células encontradas no trabalho de Almeida et al. (2009) com microplantas assintomáticas de pupunheira.

Almeida et al. (2009) utilizaram a microscopia eletrônica de varredura como ferramenta importante para comprovar a existência de endosimbiontes em microplantas assintomáticas de pupunheira, relataram, que a manutenção desses microrganismos no processo de micropropagação indica que são muito estáveis e importantes para o desenvolvimento da planta, desempenhando importante papel no seu metabolismo.

### **5.1.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A análise ultraestrutural com MET permitiu a visualização pormenorizada das células do terço médio da lâmina foliar das microplantas, e de seus respectivos constituintes, bem como a presença frequente de células bacterianas colonizando os espaços intercelulares e intracelulares.

Nas microplantas assintomáticas de abacaxi e de orquídea pertencentes aos três laboratórios foi possível observar a presença de células bacterianas no meio intracelular, retidas na pequena porção do citoplasma, entre a parede celular e o tonoplasto (Figuras 13A, 13B, 13F, 13I, 14A, 14C, 14F e 14G) ou no citoplasma de células mais jovens (Figuras 13E, 13G, 13H, 14B e 14I), ou próximas ao cloroplasto (Figuras 13C, 13D, 14D e 14H), ou ainda no vacúolo (Figura 14E).

A variação de formatos e tamanhos, assim como o observado em MEV, foi evidenciada com MET, encontrando-se formatos cocóides ou arredondados e de bastonetes, o que comprova, uma diversidade de espécies colonizando as microplantas assintomáticas, consideradas axênicas, além disso, é possível verificar algumas células bacterianas associadas a outras (Figuras 13A, 13D, 13E, 13G, 13H, 14A, 14B, 14D, 14E, 14G, 14H e 14I) e algumas isoladas (Figuras 13B, 13C, 13F, 13I, 14C e 14F).

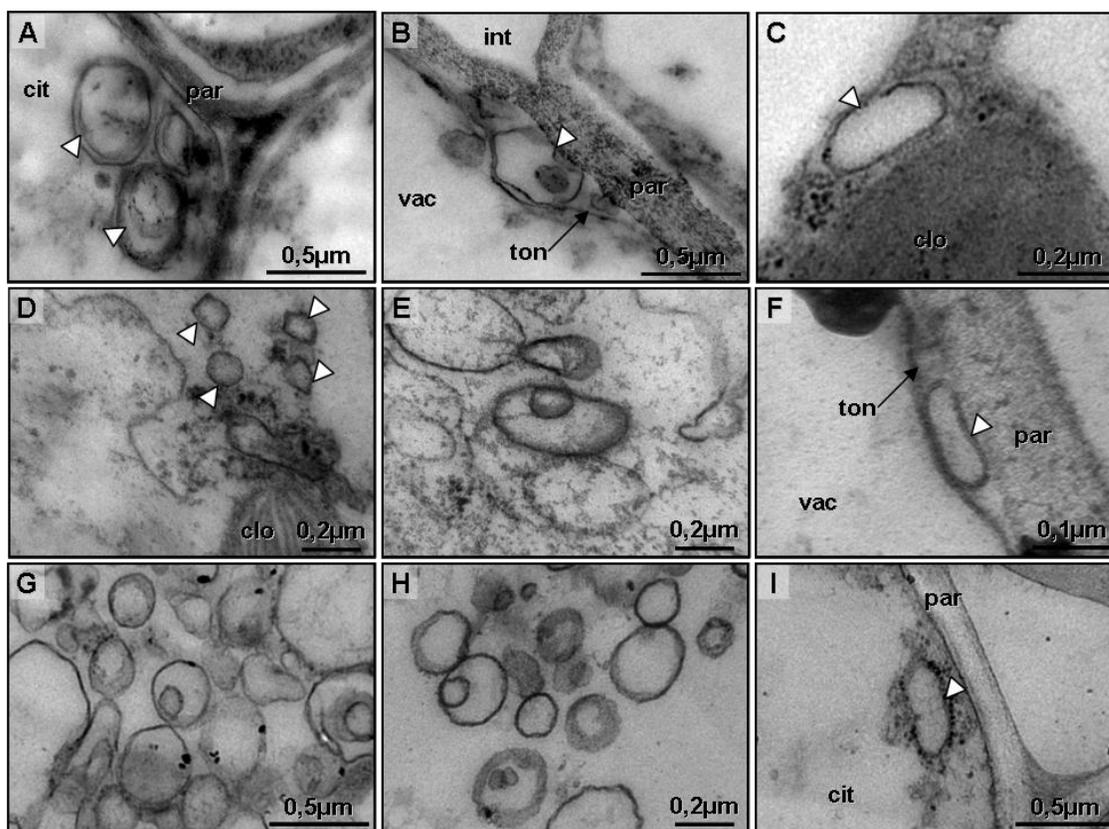


Figura 13 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas de abacaxi. A – C: Laboratório de Fisiologia de Árvores. D – F: Laboratório de Cultura de Tecidos e G – I: Laboratório de Morfogenese e Biologia Reprodutiva de Plantas. Nas quais se observa as células bacterianas (setas brancas), com diferentes tamanhos e formatos, que variam de cocóides (A, B, D, G e H), bastonetes (C, E, F e I). Sendo, cit= citoplasma; par= parede celular; vac= vacúolo; ton= tonoplasto; int= espaço intercelular; clo= cloroplasto

Nas demais microplantas pode-se observar a diversidade bacteriana pela morfologia das células, com predomínio de células arredondadas e bastonetes, assim como as encontradas em microplantas de abacaxi e orquídea. O padrão de distribuição nas células, também se assemelha muito às microplantas supracitadas: células bacterianas no meio intracelular, retidas na pequena porção do citoplasma, entre a parede celular e o tonoplasto (Figuras 15F, 15F, 15G, 15H, 15I, 15J, 15K, 16F, 16G, 16H, 16J, 16K, 16L, 17A, 17B, 17C, 17G, 17H e 17I), ou no citoplasma de células mais jovens (Figuras 15A, 15B, 15C, 15D, 16A, 16C, 16D, 16E e 17E), ou próximas ao cloroplasto (15E, 15L, 17D e 17F).

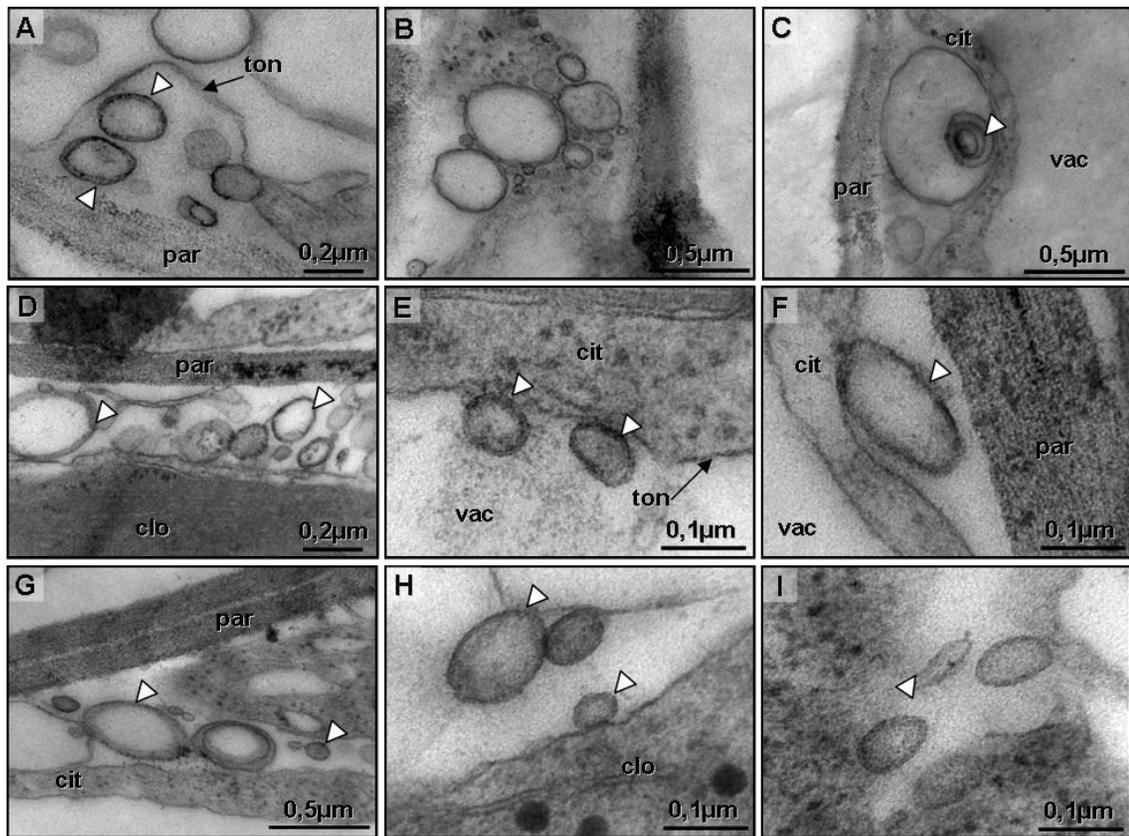


Figura 14 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas de orquídea. A – C: Laboratório de Fisiologia de Árvores. D – F: Laboratório de Cultura de Tecidos e G – I: Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. Nas quais se observa as células bacterianas (setas brancas), com diferentes formatos de cocóides (A, B, D, E, G e H), bastonetes (F e I), cilíndricas com membranas internas (C). Sendo, cit= citoplasma; par= parede celular; vac= vacúolo; ton= tonoplasto; clo= cloroplasto

Em microplantas assintomáticas de pinheiro foi possível observar, além das células bacterianas, predominantemente, em formato de bastonetes, a produção de uma matriz polimérica aderida à superfície das paredes celulares externas, ou seja, no apoplasto (Figura 16I), podendo ser a produção de biofilmes, com sua função e importância já ressaltadas.

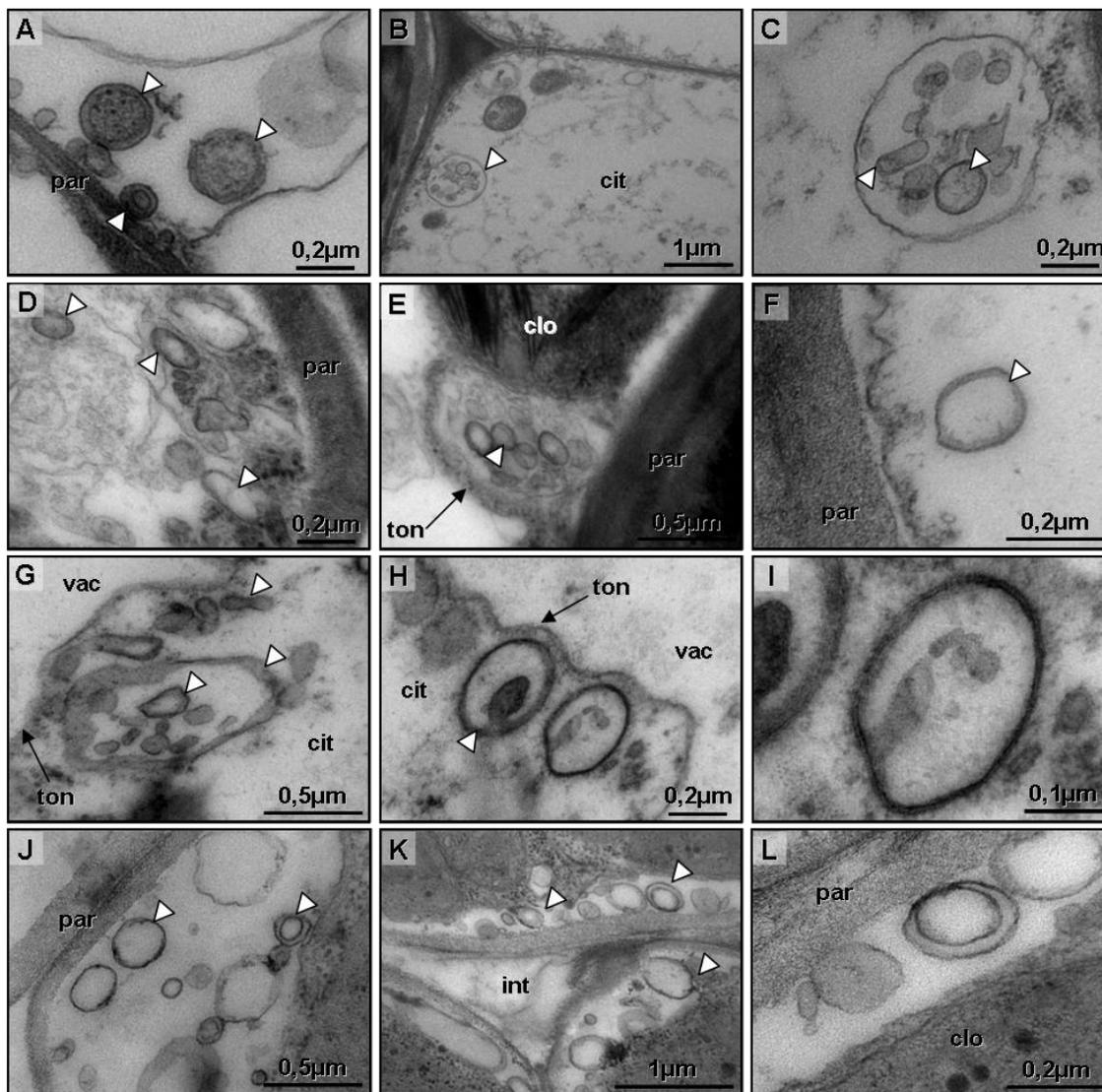


Figura 15 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas. A – C: Violeta do laboratório de Cultura de Tecidos. D – F: Violeta do laboratório de Fisiologia de Árvores. G – I: Cúrcuma. J – L: Manjeriço. Nas quais se observa as células bacterianas (setas brancas) no citoplasma, com diferentes formatos de cocóides (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L), bastonetes (C, D, G e K). Sendo, cit= citoplasma; par= parede celular; vac= vacúolo; ton= tonoplasto; int= espaço intercelular; clo= cloroplasto

A exceção à regra foi verificada nas microplantas de cana-de-açúcar, nas quais, além de bactérias presentes nos espaços intracelulares, foi possível observar, frequentemente, a presença de células bacterianas nos espaços intercelulares (Figura 16B). A observação de bactérias no apoplasto é tecnicamente difícil, uma vez que qualquer bactéria livre no apoplasto pode ser lavada com facilidade durante o processo de preparação normal para MET. Segundo Dong et al. (1994), o que permite a

visualização dessas bactérias é o fato de estarem próximas à parede celular e imersas em uma mucilagem que se adere às paredes que revestem os espaços intercelulares. Existem fortes indícios de que essas bactérias que colonizam os espaços intercelulares de cana-de-açúcar e outras gramíneas como arroz, sejam endofíticas fixadoras de nitrogênio (ELBELTAGY et al., 2001), sendo *Acetobacter*, *Azoarcus*, e *Herbaspirillum* as principais bactérias encontradas em gramíneas (JAMES; OLIVARES, 1998; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998). Elbeltagy et al. (2001), em trabalho com arroz e Dong et al. (1994), com cana-de-açúcar, encontraram bactérias morfológicamente muito semelhantes às observadas neste trabalho e da mesma forma, habitando os espaços intercelulares.

Cabe destacar que em algumas microplantas houve o predomínio de células bacterianas associadas, que em muitos casos estão agrupadas e compartimentalizadas por membranas, formando verdadeiras bolsas, como ocorre nas microplantas de violeta cultivadas nos dois laboratórios (Figuras 15C-D), cúrcuma (Figura 15G), eucalipto (Figuras 16D-F), pinheiro (Figura 16G), sequóia (Figura 16J), teca (Figuras 17A-C) e pupunheira (Figuras 17D e 17E). Em microplantas de teca essa estrutura vesicular parece ser ainda mais organizada, com presença de membranas (Figura 17B), podendo ser o início da formação de alguma estrutura bacteriana (bacteriossomo).

Essa formação de vesículas com grupos de colônias de bactérias foi relatada em microplantas de pupunheira por Almeida et al. (2009) corroborando nossos resultados obtidos no presente trabalho, com essa espécie, bem como sustenta a possibilidade desse arranjo se fazer presente nas demais espécies de microplantas.

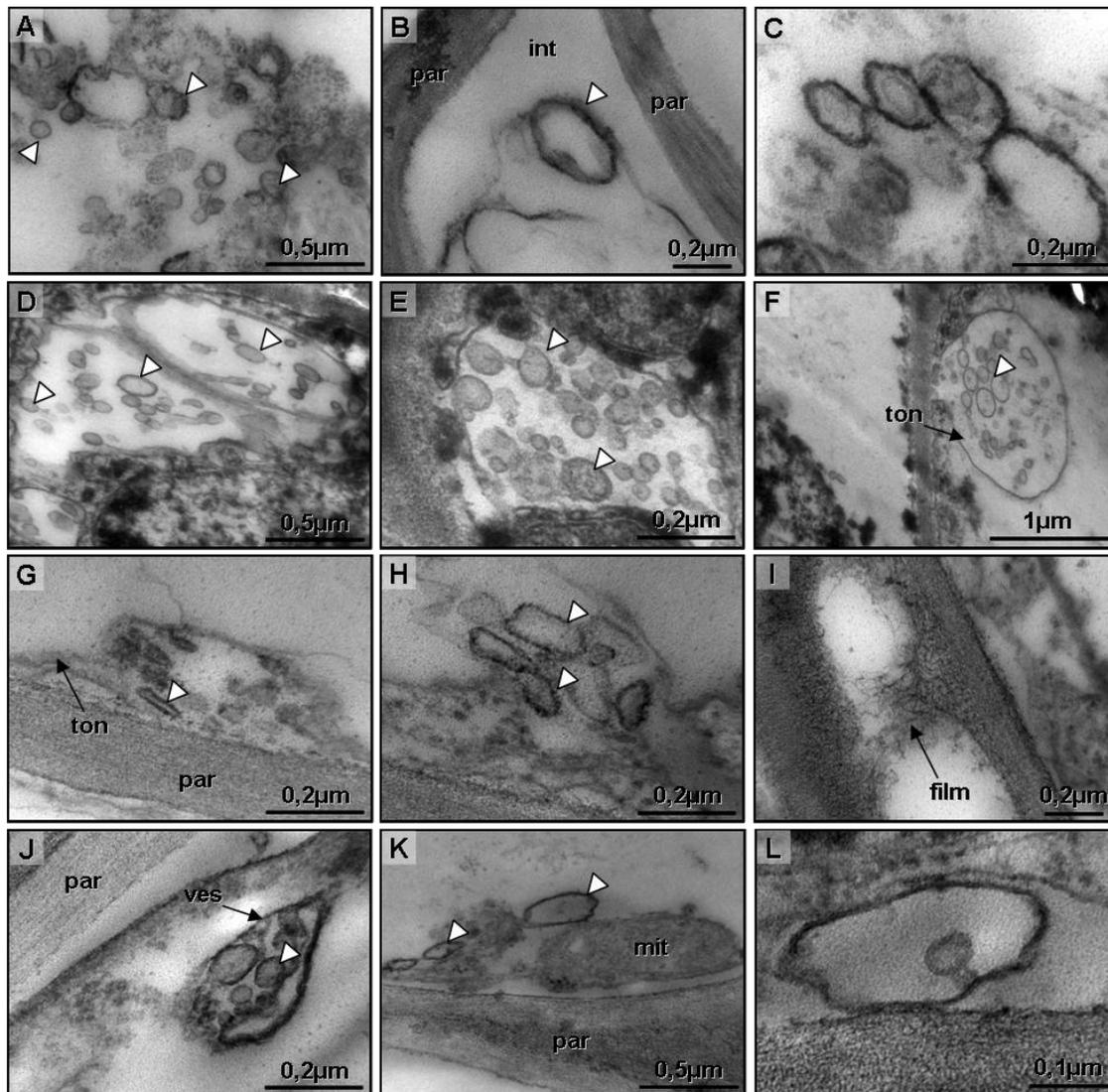


Figura 16 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas. A – C: Cana-de-açúcar. D – F: Eucalipto. G – I: Pinheiro. J – L: Sequóia. Nas quais se observa as células bacterianas (setas brancas) no citoplasma, com diferentes formatos de cocóides (A, B, D, E, F, G e J), bastonetes (C, D, G, H, K e L). Sendo, par= parede celular; int= espaço intercelular; ton= tonoplasto; film= biofilme; ves= vesícula, mit= mitocôndria

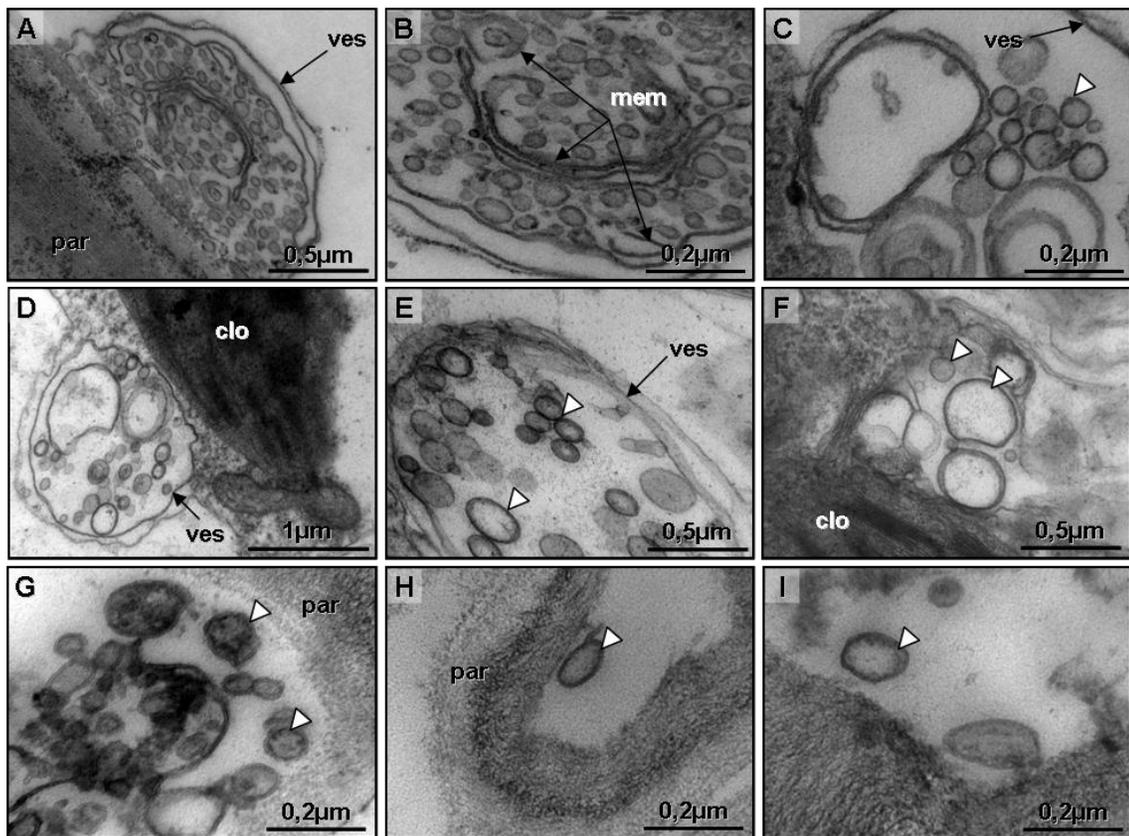


Figura 17 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas. A – C: Teca. D – F: Pupunheira. G – I: Mogno. Nas quais se observa as células bacterianas (setas brancas), com diferentes tamanhos e formatos, que variam de cocóides (A, B, C, D, G e I), bastonetes (A, B, E, G e H), bem como a formação de estruturas membranosas que englobam as bactérias. Sendo, par= parede celular; ves= vesícula; clo=cloroplasto; mem= membranas.

### 5.1.3 Análise Molecular

#### 5.1.3.1 Extração do DNA Genômico Total das Microplantas

O DNA extraído das amostras apresentou alto rendimento e qualidade, quando comparadas com padrão molecular e de massa, permitindo o prosseguimento às análises moleculares previstas. Dessa forma, é possível concluir que o protocolo de extração foi eficiente para obtenção de DNA em quantidade e qualidade adequadas, como verificado em outros trabalhos que utilizaram protocolos de extração semelhantes ao utilizado no presente estudo (AUSUBEL et al., 2005; SUN et al., 2008; THOMAS et al., 2007).

### 5.1.3.2 Amplificação do Gene 16S rRNA de *Bacteria*

Os produtos de PCR com aproximadamente 1500pb (Figura 18), foram obtidos em quantidade suficiente para futuras reações. Esse resultado indicou que, nas microplantas assintomáticas e aparentemente axênicas, há a presença do gene 16S rRNA de *Bactéria*. A região 16S rDNA é conservada nos procariotos e mínimas modificações na sua composição distinguem as espécies, por essa razão, constitui a região de identidade dos procariotos e sua amplificação dentro do DNA genômico total da microplanta, confirma a existência dessas bactérias nos seus tecidos (REIS Jr. et al., 2002).

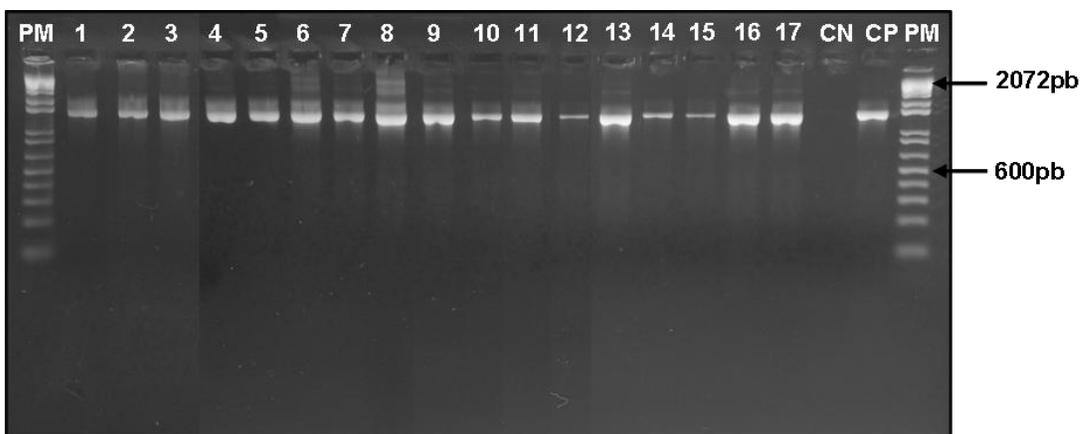


Figura 18 – Resultado da amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria* com os oligonucleotídeos fD1 e rD1 a partir do DNA total das microplantas (parte aérea e subterrânea) assintomáticas dos três laboratórios. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, sendo PM – padrão de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), **1** = Orquídea do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, **2** = Teca, **3** = Orquídea do laboratório de Fisiologia de Árvores, **4** = Manjerição, **5** = Orquídea do laboratório de Cultura de Tecidos, **6** = Cúrcuma, **7** = Abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos, **8** = Violeta do laboratório de Cultura de Tecidos, **9** = Pupunheira, **10** = Mogno, **11** = Cana-de-açúcar, **12** = Eucalipto, **13** = Abacaxi do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, **14** = Sequóia, **15** = Pinheiro, **16** = Violeta do laboratório de Fisiologia de Árvores, **17** = Abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores, CN – controle negativo, CP – controle positivo

Estudos moleculares permitem a avaliação direta da diversidade estrutural de comunidades microbianas, evitando etapas de cultivos bacterianos, assim, regiões variáveis de gene 16S ribossomal podem ser amplificadas a partir do DNA extraído de qualquer organismo na natureza, utilizando *primers* específicos de regiões conservadas de bactéria (GARBEVA et al., 2001). Dessa forma, a análise do gene de 16S rRNA tem

sido utilizada, juntamente com outras técnicas no estudo da diversidade endofítica (GARBEVA et al., 2001; LACAVA et al., 2006; REITER et al., 2003; SUN et al., 2008).

A comunidade científica tem questionado a eficácia dos métodos de análise independentes de cultivo para endófitos, principalmente, no tocante a amplificação do gene 16S rRNA de *Bactéria*, devido ao fato de que o DNA total extraído da planta, inclui DNAs que não são propriamente da comunidade endofítica, havendo, por tanto, a possibilidade de superestimar a comunidade ou ainda, aferir sua existência de maneira equivocada. Quando se admite que a partir do processo evolutivo de endossimbiontes, bactérias que viviam livres, hoje fazem parte da célula como organelas (cloroplasto e mitocôndria) (DOOLITTLE, 1998; SELOSSE; ALBERT; GODELLE, 2001), pode-se esperar que do processo de amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria* resulte na amplificação do DNA cloroplastidial (16S rDNA) e mitocondrial (18S rDNA), e não de uma comunidade bacteriana endofítica (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; SUN et al., 2008).

No entanto, Chelius e Triplett (2001), desenharam um *primer* para amplificar diretamente as sequências bacterianas endofíticas de raízes de milho e seu uso tem sido relatado em diversos estudos com endofíticos (IDRIS et al., 2004; MÜLLER; DÖRING, 2009; SUN et al., 2008; ULRICH; ULRICH; EWALD, 2008) para minimizar as interferências que essas organelas causam no estudo da comunidade endofítica de plantas. Chelius e Triplett (2001) desenharam o *primer* 799f (5'AAC MGG ATT AGA TAC CCK G 3') que amplifica a maioria das sequências bacterianas, pois possui alta especificidade com gene 16S rRNA de *Bactéria*, excluindo o DNA cloroplastidial, e gerando um produto mitocondrial de aproximadamente 1,5 vezes o tamanho do produto bacteriano.

Dessa forma, na tentativa de excluir essas interferências, utilizou-se o par de oligonucleotídeos 799f (5'AAC MGG ATT AGA TAC CCK G 3') (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1492r (5'TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (LANE, 1991), que juntos permitem a amplificação de dois produtos, um mitocondrial de aproximadamente 1090pb e outro bacteriano de 735pb, os quais podem ser separados eletroforicamente em gel de agarose (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; SUN et al., 2008). As Figuras 19 e 20 mostram os produtos amplificados com os *primers* 799f e 1492r (dois fragmentos): um produto de 700pb a 800pb e outro de 1000pb a 1100 pb.

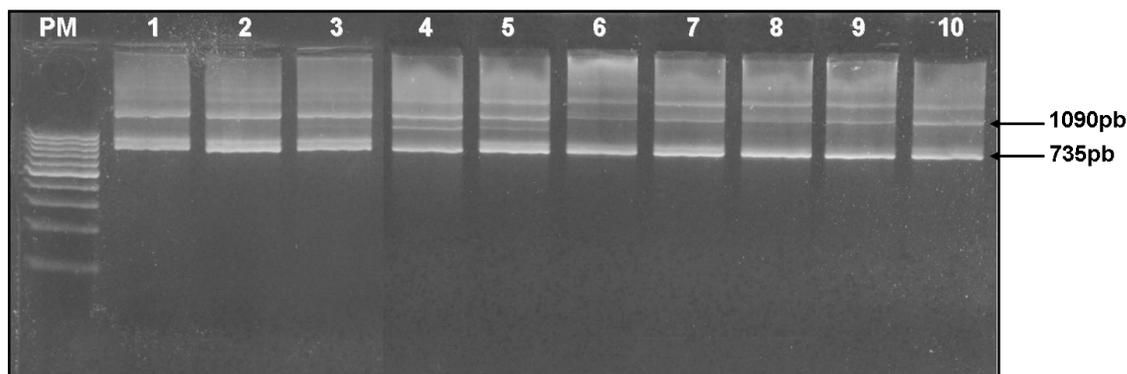


Figura 19 – Resultado da amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria* com os oligonucleotídeos 799f e 1492r para exclusão do gene 16S cloroplastidial a partir do DNA total das microplantas assintomáticas dos três laboratórios. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, sendo PM – padrão de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), **1** = Cana-de-açúcar, **2** = Teca, **3** = Eucalipto, **4** = Manjeriço, **5** = Orquídea do laboratório de Cultura de Tecidos, **6** = Cúrcuma, **7** = Abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos, **8** = Violeta do laboratório de Cultura de Tecidos, **9** = Pupunheira, **10** = Mogno

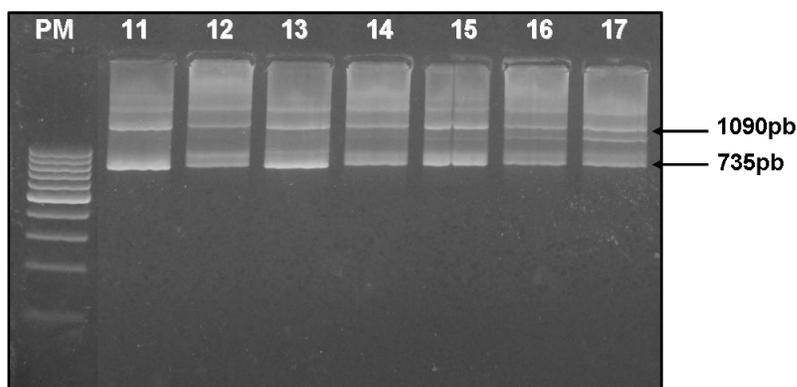


Figura 20 – Resultado da amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria* com os oligonucleotídeos 799f e 1492r para exclusão do gene 16S cloroplastidial a partir do DNA total das microplantas assintomáticas dos três laboratórios. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, sendo PM – padrão de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), **11** = Abacaxi do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, **12** = Orquídea do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, **13** = Sequóia, **14** = Pinheiro, **15** = Violeta do laboratório de Fisiologia de Árvores, **16** = Abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores, **17** = Orquídea do laboratório de Fisiologia de Árvores

Os perfis eletroforéticos mostram o esperado e corroboram com os existentes na literatura, nos quais verificam-se a obtenção de duas bandas no gel, confirmando a presença de DNA bacteriano, proveniente da comunidade endofítica. Além disso, evidenciam a eficiência do *primer* 799f em excluir as interferências geradas pelas

organelas e eliminar possíveis dúvidas, geradas na análise independente de cultivo, acerca da existência de uma comunidade endofítica nas microplantas do presente trabalho.

### **5.1.3.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)**

A técnica de PCR-DGGE permitiu uma análise independente do cultivo da comunidade bacteriana em estudo, tendo como limite de detecção, grupos que representam ao menos 1% da comunidade bacteriana total. A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) possibilita a separação dos produtos de PCR de acordo com suas sequências de pares de bases, e não de acordo com os tamanhos dos fragmentos de DNA, como a maioria das técnicas de *fingerprint* genético (GARBEVA et al., 2001; MUYZER, 1999; MUYZER; SMALLA, 1998). Assim, teoricamente, cada banda no gel representa uma espécie ou um grupo de espécies de bactéria, e a imagem final do gel corresponderá a um padrão referente à comunidade bacteriana das microplantas estudadas.

A Figura 21 mostra no perfil do gel de DGGE as comunidades bacterianas endofíticas associadas a cada microplanta. Pode-se observar que algumas bandas estão presentes em todas as microplantas independente do laboratório e da espécie, indicando que alguns grupos de bactérias se associam às plantas de maneira muito específica, não sofrendo influência do ambiente (laboratório) nem das diferentes formas de condução e micropropagação adotadas nestes laboratórios (Figura 21 setas vermelhas). Outros grupos aparecem somente em determinada espécie de planta, podendo estar relacionados a algum nicho específico ou alguma especificidade em colonizar determinada espécie ao invés de outra (Figura 21 círculos azuis).

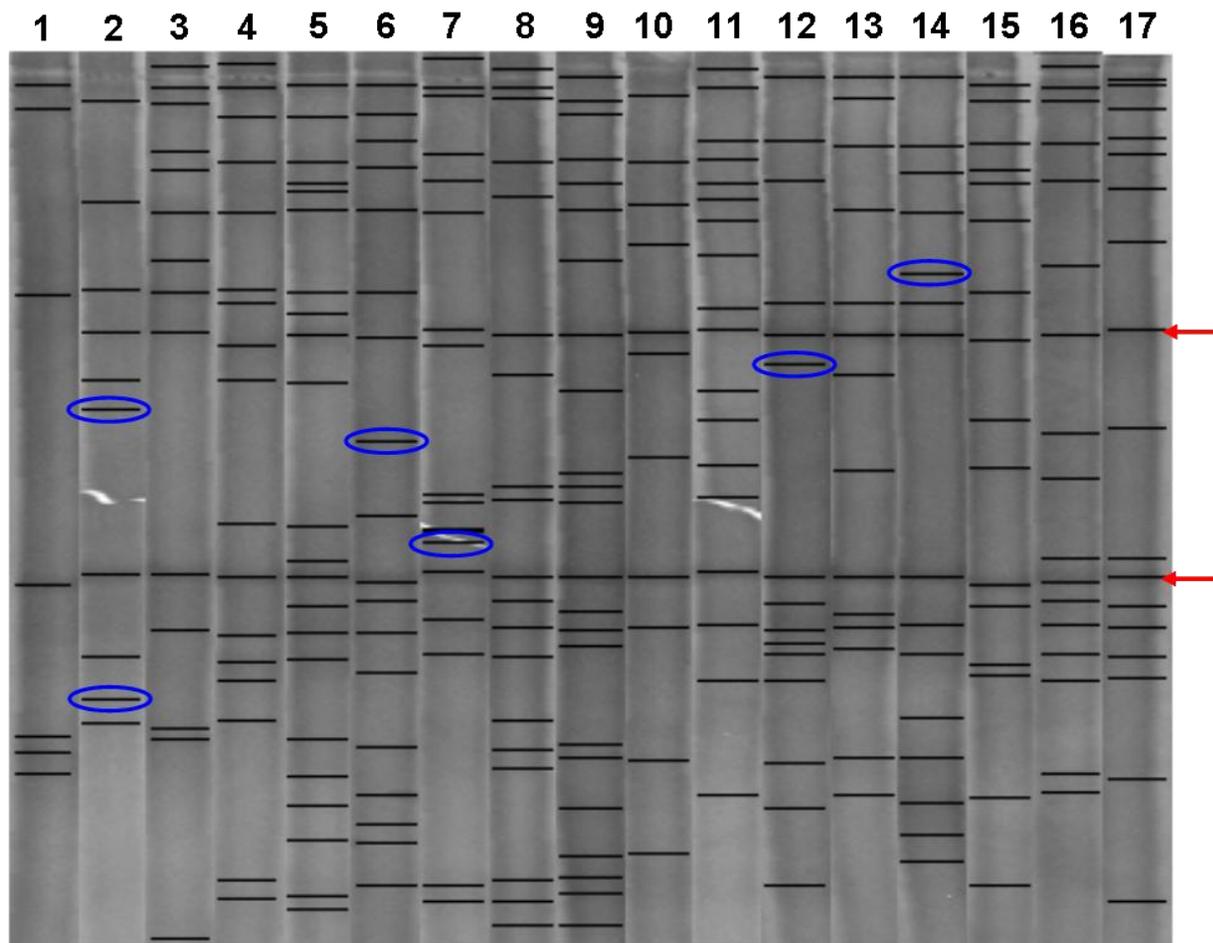


Figura 21 – Gel de DGGE de comunidades bacterianas associadas às microplantas sendo: **1** = Violeta do laboratório de Cultura de Tecidos, **2** = Mogno, **3** = Eucalipto, **4** = Cana-de-açúcar, **5** = Pupunheira, **6** = Cúrcuma, **7** = Orquídea do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, **8** = Manjeriço, **9** = Abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores, **10** = Teca, **11** = Abacaxi do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, **12** = Violeta do laboratório de Fisiologia de Árvores, **13** = Sequóia, **14** = Pinheiro, **15** = Abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos, **16** = Orquídea do laboratório de Cultura de Tecidos, **17** = Orquídea do laboratório de Fisiologia de Árvores. Círculos azuis indicam bandas raras (aparecem somente em uma microplantas). Seta vermelha indica as bandas comuns a todas as microplantas

A partir do perfil de DGGE foi elaborada a Tabela 3, na qual estima-se numericamente a diversidade das espécies bacterianas, a partir da visualização e contagem das bandas que aparecem no perfil para cada microplanta. Inferindo-se, dessa forma, a diversidade de espécies de bactérias que colonizam os tecidos das respectivas microplantas.

Tabela 3 – Número de bandas observadas em gel de DGGE nas diferentes microplantas

MICROPLANTAS	BANDAS		
	TB	BC	BR
Violeta 2	7	2	0
Mogno	10	2	2
Eucalipto	14	2	2
Cana-de-açúcar	17	2	0
Pupunheira	22	2	1
Cúrcuma	18	2	3
Orquídea 3	17	2	3
Manjeriço	19	2	1
Abacaxi 1	24	2	1
Teca	11	2	1
Abacaxi 3	18	2	0
Violeta 1	15	2	1
Sequóia	14	2	0
Pinheiro	15	2	3
Abacaxi 2	16	2	0
Orquídea 2	17	2	1
Orquídea 1	17	2	0

Nota: TB = Total de bandas; BC = Bandas comuns; BR = Bandas raras. Os números junto aos nomes das plantas representam respectivamente os laboratórios: 1 = Fisiologia de Árvores, 2 = Cultura de Tecidos e 3 = Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas.

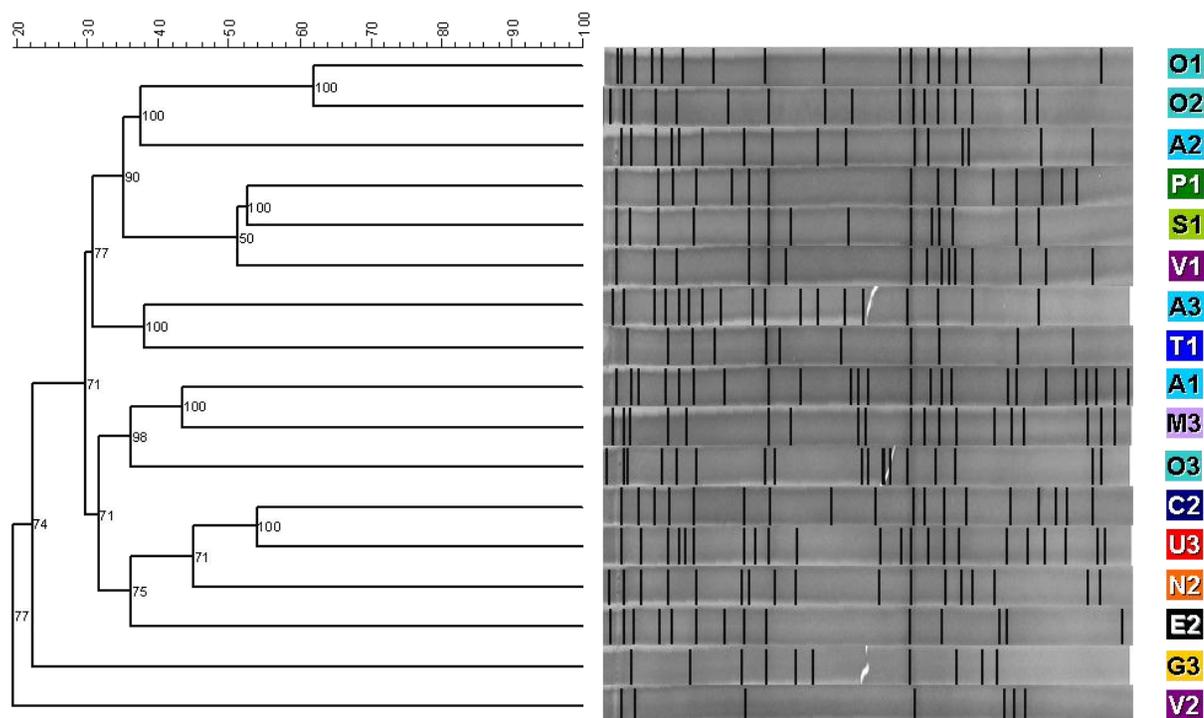
Cabe salientar que os parâmetros usados para confeccionar a Tabela 3 levaram em conta as bandas visíveis no gel, na qual TB representa o total de bandas que apareceram no perfil de cada microplanta, BC representa o número de bandas que aparecem em todas as microplantas e BR são as bandas que aparecem somente em uma microplanta.

A partir da Tabela 3 pode-se observar que a microplanta violeta cultivada no laboratório de Cultura de Tecidos, apresentou o menor número de bandas (7), ao passo que, a microplanta de abacaxi cultivada no laboratório de Fisiologia de Árvores apresentou o maior número de bandas (24). Estes números refletem, teoricamente, o número de espécies de bactérias presentes na microplanta e, conseqüentemente, na

diversidade da comunidade endofítica. Teoricamente, pois, segundo Boon et al. (2002) o número e a intensidade das bandas num gel de DGGE não representa a abundância das espécies dentro da comunidade microbiana, um organismo pode produzir mais de uma banda no DGGE, devido aos seus múltiplos e heterogêneos *operons* de RNA, por outro lado, sequências parciais de 16S rDNA nem sempre permitem a distinção entre espécies, tanto que, uma única banda no DGGE pode representar várias espécies com sequências parciais de 16S idênticas.

Além disso, ainda segundo os autores, uma mistura de rDNAs pode apresentar diferentes concentrações de sequências menores e não serem amplificadas suficientemente para serem visualizadas como uma banda no gel de DGGE. Desta forma, o padrão de bandas reflete somente o rDNA mais abundante na comunidade microbiana (GARBEVA et al., 2001). Por esta razão, a DGGE tem sido usada para determinar a diversidade genética da comunidade bacteriana total ou de uma população sem caracterização de seus indivíduos, sendo uma medida indicativa e não absoluta do grau de diversidade (BOON et al., 2002; MUYZER, 1999).

As análises de agrupamento hierárquico foram realizadas usando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*), testando os coeficientes de Pearson (curva densitométrica), Jaccard e Dice (presença/ausência) para cálculo da matriz de distância dos perfis de bandas reveladas para as comunidades de *Bacteria*. Tornando possível verificar, de maneira satisfatória, a topologia global obtida com a matriz de distância calculada com os diferentes coeficientes, no entanto, o agrupamento obtido com o coeficiente de Jaccard revelou a melhor similaridade entre os perfis analisados (Figura 22).



<b>E</b> Eucalipto	<b>A</b> Abacaxi	<b>P</b> Pinheiro	<b>U</b> Pupunha
<b>C</b> Curcuma	<b>O</b> Orquídea	<b>V</b> Violeta	<b>N</b> Cana
<b>T</b> Teca	<b>S</b> Sequóia	<b>M</b> Manjerição	<b>G</b> Mogno
1 = Laboratório de Fisiologia de �rvores			
2 = Laboratório de Cultura de Tecidos			
3 = Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas			

Figura 22 – Agrupamento hierárquico da comunidade bacteriana total de cada microplanta, realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correla o de Jaccard

O dendrograma mostrou a presença de bandas específicas e de bandas comuns em cada microplanta, assim como verificado na Figura 21 e Tabela 3. As diferenças nas comunidades bacterianas existentes nas microplantas de abacaxi dos três laboratórios, provavelmente se devem ao fato de que mesmo se tratando de uma mesma espécie, apresentam procedências distintas de propágulos iniciais, considerando-se ainda, a forma como foram conduzidos no estabelecimento *in vitro* da cultura para cada laboratório, além de serem indivíduos diferentes e não clones, admitindo-se a possibilidade de ocorrência de sele o de alguns endófitos em rela o a outros, ou até

mesmo, e principalmente, o favorecimento de uma determinada comunidade em detrimento de outra. Tal diferença pode ter ocorrido, também, nas microplantas de orquídea dos três laboratórios e de violeta dos dois laboratórios (Fisiologia de Árvores e de Cultura de Tecidos).

De acordo com Pamphile e Azevedo (2002), a especificidade da associação endófito e planta hospedeira é influenciada através de um ou mais fatores ambientais, além de fatores genéticos da planta na interação com o endofítico. Quando se trata de cultura de tecidos, alguns aspectos macroambientais são desconsiderados, como estresse hídrico, balanço nutricional, por se tratar de um ambiente controlado. No entanto, alguns aspectos microambientais podem influenciar drasticamente a manutenção e diversidade endofítica. Dessa forma, as condições bioquímicas e fisiológicas das células estabelecidas pelo organismo hospedeiro, podem influenciar de forma distinta, levando a uma seleção diferencial de microrganismos associados (ANDREOTE et al., 2009b; IZUMI et al., 2008; PAMPHILE; AZEVEDO, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; STURZ; NOWAK, 2000;).

Outro aspecto fundamental para as diferenças na comunidade endofítica de cada microplanta é a competição interna entre os endófitos no processo de colonização dos tecidos vegetais. Tal competição representa o estabelecimento de alguns endófitos em detrimento de outros, pela competição nutricional e exclusão de nichos, que se estabelece quando alguns (denominados de competentes) se proliferam mais rapidamente pela planta hospedeira e modulam condições fisiológicas do vegetal para sua manutenção, estabelecendo uma relação benéfica com a planta (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008).

As semelhanças entre as comunidades endofíticas das microplantas podem estar relacionadas com a ecologia desses grupos de bactérias, que têm uma dinâmica populacional diretamente relacionada com o metabolismo vegetal e também com a disponibilidade de nutrientes que modulam a ocupação de nicho e estrutura das comunidades bacterianas (ANDREOTE et al., 2009a; BATTIN et al., 2007; BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT, 2003; IZUMI et al., 2008).

A distribuição das comunidades bacterianas também foi representada pela Análise de Componentes Principais (PCA), na qual se observa a dispersão das

microplantas, sem um agrupamento definido. Dessa forma, a PCA (Figura 23) comprova a existência de uma diversidade bacteriana, caracterizada por diferenças estruturais na composição das comunidades, independente do laboratório e das condições de cultivo a que essas microplantas foram submetidas. Se os microrganismos, a que o presente estudo se refere, fossem meras contaminações inerentes a falhas no sistema de micropropagação, todos os resultados apresentados deveriam, agrupar as espécies de cada laboratório separadamente, formando três grandes grupos, o que não acontece, permitindo aferir que os microrganismos estão associados de uma maneira muito mais específica e consistente do que se supunha.

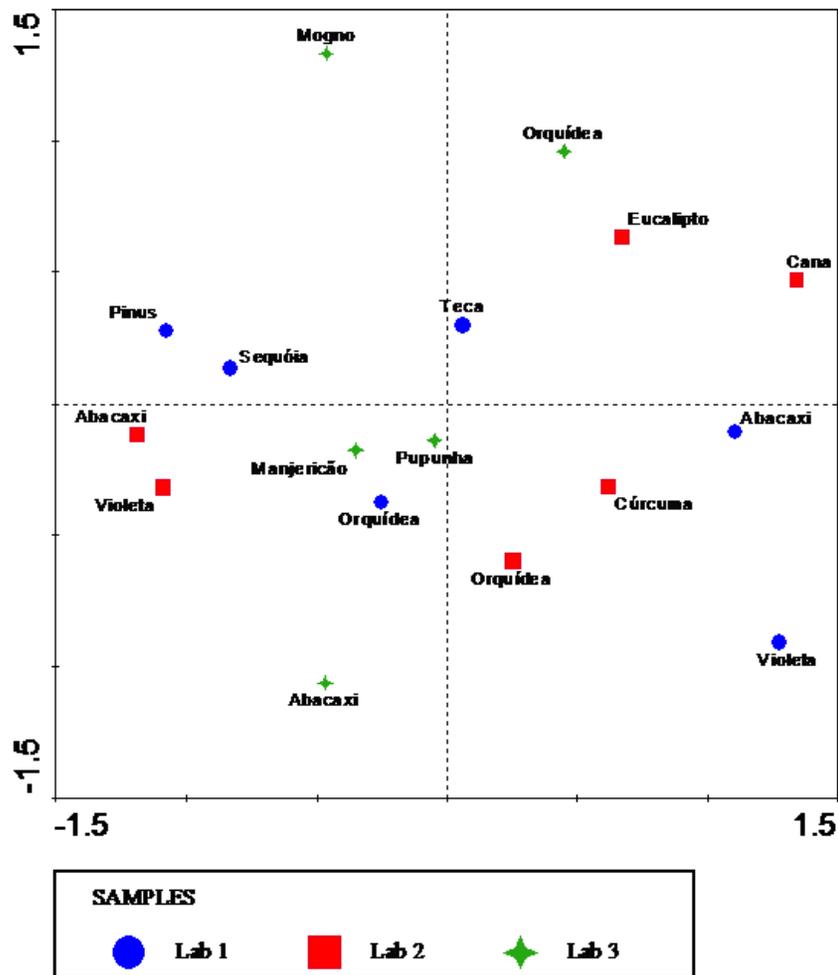


Figura 23 – Agrupamento por PCA com base nos perfis de bandas de DGGE das comunidades bacterianas totais associadas às diferentes microplantas. Sendo: Lab 1 = Laboratório de Fisiologia de Árvores, Lab 2 = Laboratório de Cultura de Tecidos, Lab 3 = Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas

A PCA é importante para evidenciar o padrão de distribuição das microplantas de acordo com a diversidade bacteriana nela existente. Segundo, Ferreira et al. (2009) a análise de agrupamento por dendrogramas de similaridade dispõe as variáveis de forma unidimensional, o que prejudica uma visualização mais clara das relações existentes entre os grupos, em contrapartida, a análise multivariada, como por exemplo, a PCA, é capaz de fornecer maiores detalhes destas interações em função de decompor a variação dos dados em vários componentes e de dispor a informação de forma multidimensional.

Sendo assim, os resultados moleculares e histológicos apresentados confirmam que a planta é um suporte onde diferentes nichos estão dispostos para serem colonizados por bactérias e que diferentes grupos bacterianos têm capacidade de colonização distinta diante desses nichos. (QUADT-HALLMANN; HALLMAN; KLOEPFER, 1997; ABREU-TARAZI, 2010; ABREU-TARAZI et al., 2010).

#### **5.1.4 Isolamento**

O isolamento permitiu verificar que nas microplantas assintomáticas de abacaxi provenientes do laboratório de Fisiologia de Árvores houve o crescimento de dois microrganismos aparentemente distintos, devido à conformação de suas colônias. Uma colônia, de coloração rosa brilhante (Figura 24A) de formato arredondado, cresceu em meio BDA após três semanas, e outra colônia de coloração branca opaca e com grandes projeções semelhantes a ramos, cresceu em meio TSB após duas semanas (Figura 24B).

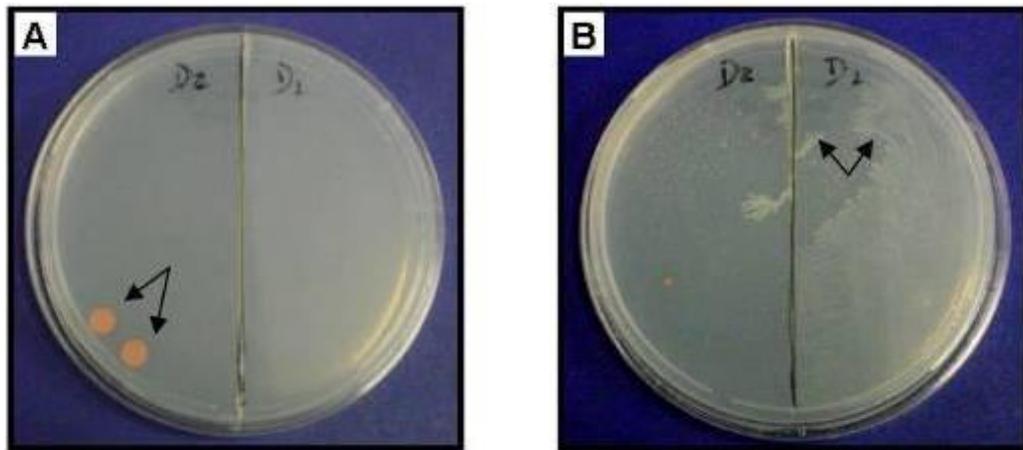


Figura 24 – Isolamento de microrganismos de microplantas assintomáticas de abacaxi provenientes do laboratório de Fisiologia de Árvores, pelo método de trituração, em que D1 = diluição de  $10^{-1}$  e D2 = diluição de  $10^{-2}$ . A – Meio BDA com desenvolvimento de colônias rosas (setas) e B – Meio TSB com desenvolvimento, predominante, de colônias brancas com projeções (setas)

No isolamento das microplantas assintomáticas de abacaxi pertencentes ao laboratório de Cultura de Tecidos observou-se, após três semanas, tanto nas diluições como na fragmentação de quase todos os meios testados, a presença predominante de colônias de coloração rosa brilhante (Figuras 25A e 25B), além disso, observou-se, após duas semanas no meio TSA, a presença de colônias de coloração branca opaca e com grandes projeções semelhantes a ramos (Figura 25C).

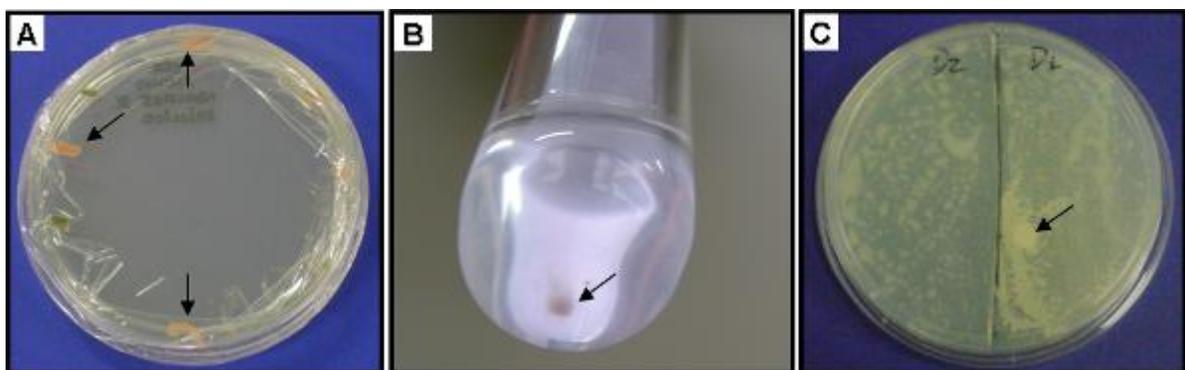


Figura 25 – Isolamento de microrganismos, em microplantas assintomáticas de abacaxi provenientes do laboratório de Cultura de Tecidos. A – Meio TSB com fragmentos da parte aérea e da raiz, cobertos por colônias bacterianas de coloração rosa (setas). B – Meio BG-11 com crescimento uniforme de colônia rosa (seta). C – Meio TSA com crescimento de algumas colônias de bactérias, dentre elas a de coloração branca opaca com projeções (seta), sendo que D1 = diluição de  $10^{-1}$  e D2 = diluição de  $10^{-2}$

Para as microplantas assintomáticas de abacaxi pertencente ao laboratório Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, assim como nas anteriores, observou-se a presença de colônias de coloração rosa brilhante de formato arredondado, após três semanas em meio LB (Figura 26A). Após duas semanas, na maioria dos meios, observou-se a presença de colônias de coloração amarela brilhante de formato arredondado e sem projeções (Figura 26B), diferentes das que ocorreram nas outras microplantas de abacaxi.

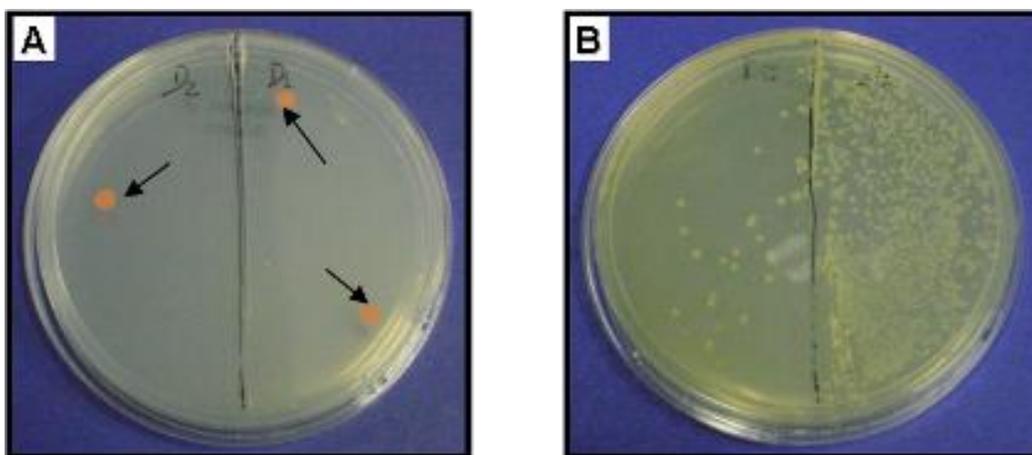


Figura 26 – Isolamento de microrganismos em microplantas assintomáticas de abacaxi provenientes do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, pelo método de trituração, em que D1 = diluição de  $10^{-1}$  e D2 = diluição de  $10^{-2}$ . A – Meio LB, sendo que as setas evidenciam as colônias rosas e B – Meio TSA colônias amarelas, brilhantes e arredondadas

Para as microplantas de violeta pertencente ao laboratório de Cultura de Tecidos, eucalipto, cúrcuma, manjeriço e pupunheira, obteve-se o isolamento de microrganismos semelhantes independente do laboratório e da espécie vegetal.

Nas microplantas assintomáticas de cúrcuma observou-se, após duas semanas de cultivo, em todos os meios de cultura testados, o crescimento de colônias arredondadas branco/amareladas restritas ao fragmento ou ao espalhamento das diluições (Figuras 27A e 27B).

Nas microplantas de manjeriço e pupunheira, além do crescimento das colônias semelhantes às da cúrcuma (Figuras 27C e 27F), observou-se, após duas semanas, o crescimento de colônias branco/amareladas com maiores projeções do centro para a

periferia, semelhantes a ramos, nos meios LB para manjeriço e BDA para pupunheira (Figuras 27D e 27E).

Nas microplantas assintomáticas de eucalipto (Figuras 27G, 27H e 27I) observou-se, após três a quatro semanas, o crescimento exclusivo de colônias arredondadas, brilhantes e de coloração rosa (setas das Figuras 27G e 27H), muito semelhantes às encontradas em abacaxi dos três laboratórios. Já nas microplantas de violeta do laboratório de Cultura de Tecidos, observou-se o crescimento de duas diferentes colônias, uma de coloração branca opaca (seta da Figura 27J) em meio TSB e outra de coloração rosa brilhante, menos intensa e mais restrita que a branca (Figura 27K), com crescimento nos meios BDA, PCAT, LB e BG-11 (Figura 27L).

Já para as microplantas de Orquídeas pertencentes aos três laboratórios, Violeta, Teca, Pinheiro, Sequóia pertencentes ao laboratório de Fisiologia de Árvores, Cana-de-açúcar pertencente ao laboratório de Cultura de Tecidos e Mogno pertencente ao laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, não se obteve quaisquer microrganismo. Apesar disso, vários gêneros bacterianos, inclusive espécies de *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Acetobacter*, *Bacillus*, e *Azospirillum*, foram descritos como endofíticos de cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2003; DONG et al., 1995; FRANKE-WHITTLE et al., 2005; JAMES et al., 2001).

O não isolamento de microrganismos endofíticos, não representa sua inexistência nas plantas, o que ocorre muito frequentemente para a maioria dos endófitos devido à dificuldade de isolamento que muitos apresentam, havendo a necessidade de métodos mais controlados e meios muito específicos para que isso ocorra, por essa razão é que muitos trabalhos, na atualidade, utilizam outras técnicas de análise, em sua maioria técnicas moleculares. Os resultados ultraestruturais e moleculares, apresentados anteriormente, comprovam a existência de endófitos independente do sucesso de seu isolamento.

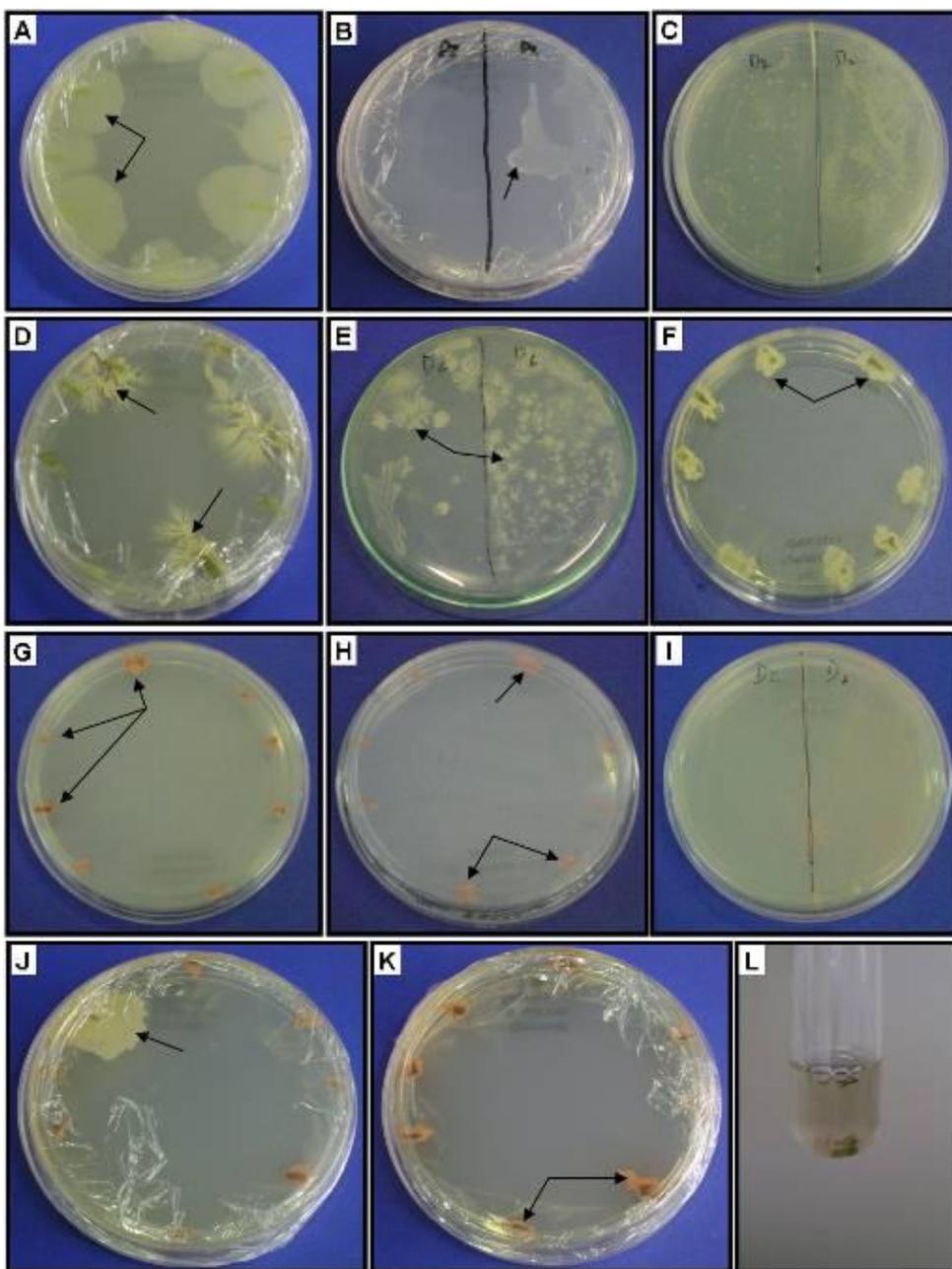


Figura 27 – Isolamento de microrganismos presentes nas diferentes microplantas assintomáticas pertencentes aos três laboratórios. A e B – Correspondem ao isolamento de microplantas de cúrcuma (meio TSB e PCAT respectivamente), mostrando o crescimento das colônias (setas). C e D – Isolamento de microplantas de manjerição (ambos em meio LB), com destaque às projeções do centro para a periferia das colônias bacterianas (setas). E e F – Isolamento de microplantas de pupunheira (meios BDA e TSB, respectivamente), com detalhe no crescimento e morfologia das colônias (setas). G a I – Isolamento de microplantas de eucalipto (G e I – meio LB e H – meio PCAT), nas quais as setas indicam o desenvolvimento das colônias de bactérias. J a L – Isolamento de microplantas de violeta pertencente ao laboratório de Cultura de Tecidos evidenciando (setas) em J a colônia de coloração branca (meio TSB), em K e L o crescimento de colônias rosa (meio LB e BG-11, respectivamente). Sendo que em B, C, E e I tem-se D1 = diluição de  $10^{-1}$  e D2 = diluição de  $10^{-2}$

Tradicionalmente, a abundância bacteriana é medida por meio de métodos dependentes de cultivo, no entanto, a maioria dos microrganismos na natureza ainda não podem ser cultivados, pois as exigências de crescimento de muitas espécies microbianas não são conhecidas (REITER et al., 2003) e o seu crescimento sob condições de laboratório depende do estado fisiológico das células no inoculo (DAIMS; WAGNER, 2007). Dessa forma, outras técnicas estão sendo utilizadas para minimizar as desvantagens do cultivo microbiano, como técnicas moleculares que aplicam os genes 16S rRNA como marcadores filogenéticos (REITER et al., 2003; SUN et al., 2008).

No experimento paralelo (em que todas as 17 microplantas foram multiplicadas por um único manipulador e mantidas em um único ambiente), verificou-se que as respostas de isolamento para todas as microplantas foram muito semelhantes. Tal resultado se configura como o dado mais importante da primeira fase, pois mostra a existência de uma microbiota endofítica persistente que se desenvolve independentemente das condições de armazenamento e manipulação das microplantas. De posse de tal informação, foi possível estabelecer que a segunda fase se constituía somente das 17 microplantas provenientes dos três laboratórios, uma vez que as respostas seriam as mesmas.

A primeira fase do isolamento permitiu, ainda, avaliar o comportamento dos microrganismos nos diferentes meios de cultura, para as diferentes microplantas. Além disso, ela mostrou qual método de isolamento foi o mais eficiente, sendo o método de trituração o melhor com relação ao de fragmentação, havendo o crescimento dos microrganismos de maneira mais uniforme e mais intensa. Araújo et al. (2001), trabalhando com plantas de citros, verificaram maior eficiência e rapidez de isolamento utilizando o método de trituração se comparado ao método de fragmentação.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, foi possível estabelecer a segunda fase para confirmar o isolamento da primeira e observar a recorrência dos microrganismos, descartando a hipótese de contaminação. Portanto, nesta segunda fase foram utilizadas somente as microplantas provenientes dos três laboratórios (de diferentes ambientes e vários manipuladores), tendo o meio LB como único meio de cultura e a trituração como único método de isolamento.

O meio LB foi escolhido por ter se mostrado mais eficiente para o crescimento de todos os isolados encontrados e também porque, a maioria dos microrganismos que cresceram em outros meios também cresceram em LB. Já o método de trituração foi escolhido, porém sem o uso de diluições, com o objetivo de potencializar o isolamento, uma vez que por se tratar de microrganismos endofíticos seu crescimento em meio de cultura é pouco expressivo, sendo que as diluições o tornam ainda mais difícil, como foi observado para alguns microrganismos isolados.

Por fim, na segunda fase obteve-se a comprovação do isolamento de endófitos, havendo grande semelhança com os resultados encontrados na primeira fase, mostrando que o isolamento foi eficiente para comprovar a existência de microrganismos endofíticos habitando os tecidos das diferentes microplantas, podendo-se aferir, ainda, que esses microrganismos foram muito semelhantes morfológicamente, independente dos laboratórios e dos manipuladores.

## **5.2 Isolados**

### **5.2.1 Sequenciamento**

O isolamento ocorreu com sucesso para as microplantas de abacaxi dos três laboratórios, violeta, eucalipto, cúrcuma pertencentes ao laboratório de Cultura de Tecidos, e manjerição e pupunheira pertencentes ao laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. Dessas seis espécies de microplantas foram selecionados alguns microrganismos de acordo com as características da colônia, mencionadas no item 5.1.4.

Os microrganismos selecionados foram submetidos à extração de DNA e à amplificação de gene 16S rRNA. A Figura 28 mostra o resultado da reação de PCR para os isolados selecionados, na qual pode-se verificar os produtos amplificados de aproximadamente 1500pb, em quantidades muito semelhantes, devido à intensidade das bandas.

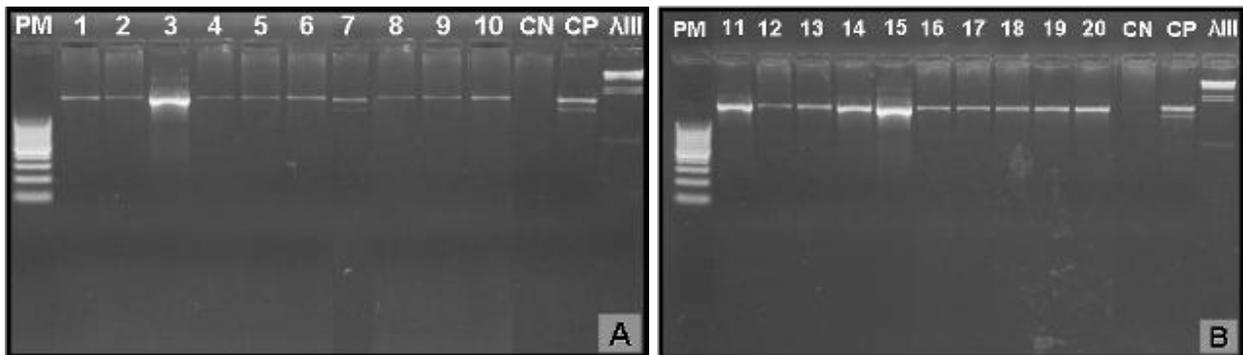


Figura 28 – Perfil eletroforético em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, mostrando a amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria* a partir do DNA dos isolados, sendo PM – padrão de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), **1, 2 e 5** = Isolados de Cúrcuma, **3 e 4** = Isolados de Manjeriço, **6 e 9** = Isolados de Violeta do laboratório de Cultura de Tecidos, **7 e 8** = Isolados de Abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos, **10** = Isolados de Eucalipto, **11** = Isolados de Eucalipto, **12 e 13** = Isolados de Pupunheira, **14 e 15** = Isolados de Abacaxi do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, **16** = Isolados de Abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos, **17 e 18** = Isolados de Abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores, **19** = Isolados de Manjeriço, **20** = Isolados de Abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos CN – controle negativo, CP – controle positivo,  $\lambda$ III – padrão molecular  $\lambda$ /Hind III (Invitrogen)

Após a amplificação e reação de sequenciamento parcial dos isolados identificou-se as espécies de bactérias *Bacillus pumilus*, *Bacillus firmus* (Tabela 4), *Methylobacterium* sp. (Tabela 5) e *Acinetobacter* sp. (Tabela 6).

### 5.2.1.1 Gênero *Bacillus*

Nas microplantas de manjeriço, pupunheira e cúrcuma obteve-se isolamento somente de *Bacillus pumilus* (Tabela 4), no entanto, foi possível verificar que existem diferenças entre estes isolados, uma vez que de acordo com as comparações no GenBank, as microplantas possuem duas linhagens cada. A ocorrência de diferentes linhagens de microrganismos numa mesma espécie hospedeira é muito comum e encontrado na literatura para outras espécies, como morango (DIAS et al., 2009), citros (ARAÚJO et al., 2002), ginseng (CHO et al., 2007).

Para as microplantas de pupunheira e cúrcuma foram identificadas as mesmas linhagens, no entanto, estas microplantas foram cultivadas em laboratórios diferentes, o que descarta a possibilidade de contaminação por práticas laboratoriais. Para as microplantas de abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores, somente uma linhagem

de *Bacillus pumilus* foi isolada, já para as microplantas de abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos duas linhagens foram identificadas, sendo uma linhagem (EU867387.1) igual para as duas microplantas.

Tabela 4 – Resultado da comparação da sequência parcial de 16S rRNA obtida a partir de isolados bacterianos provenientes das microplantas assintomáticas, os meios de cultura em que foram observados primeiro, o método de obtenção (fragmentação ou diluição), a linhagem e o grau de similaridade com as sequências

Microplanta/Meio de cultura	Similaridade	N ° Acesso	Espécie (NCBI)	Linhagem
Cúrcuma F (TSB)				
Violeta 2 F (TSB)				
Pupunheira F (TSB)	99%	EU867387.1	<i>Bacillus pumilus</i>	CCGE2027
Abacaxi 1 D (TSB)				
Manjeriçã D (LB)				
Abacaxi 2 D (BDA)				
Cúrcuma D (PCAT)				
Cúrcuma D (TSB)	99%	EU863189.1	<i>Bacillus pumilus</i>	EMt 21
Abacaxi 2 D (TSA)				
Pupunheira D (BDA)	98%			
Manjeriçã F (LB)	100%	EU867353.1	<i>Bacillus pumilus</i>	CCGE2083
Manjeriçã D (BDA)	98%			
Abacaxi 3 D (BG-11)	100%	GQ903397.1	<i>Bacillus firmus</i>	XJSL2-8

Nota: Os números junto aos nomes das plantas representam respectivamente os laboratórios: 1 = Fisiologia de Árvores, 2 = Cultura de Tecidos e 3 = Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. As letras que precedem o parênteses correspondem ao método de isolamento, sendo: D = diluição e F = fragmentação. As siglas dentro do parênteses correspondem ao meio de cultura utilizado.

Somente em microplantas de manjeriço foi encontrada a linhagem EU867353.1, podendo ser uma especificidade da bactéria, além disso, dentro dos grupos de microplantas, o manjeriço tem características aromáticas muito particulares, podendo estar ou não relacionada com os isolados encontrados.

O diferencial foi a microplanta de abacaxi do laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, em que não foram identificadas bactérias da espécie *Bacillus pumilus*, mas sim *Bacillus firmus*. Essa diferenciação pode ter ocorrido uma vez que mesmo sendo da mesma espécie, as microplantas de abacaxi tiveram a sua origem em regiões diferentes, a partir de propágulos diferentes, tais circunstâncias podem ser responsáveis por selecionar um grupo de microrganismos em detrimento de outro.

Bactérias do gênero *Bacillus* são comumente relatadas na literatura como microrganismos endofíticos benéficos, gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e colonizadores de diversas famílias de plantas (CHO et al., 2007; FORCHETTI et al., 2007). São consideradas bactérias promotoras de crescimento, com destaque à produção de auxinas e giberelinas por *Bacillus pumilus*, e fixadoras de nitrogênio (FORCHETTI et al., 2007; STURZ; NOWAK, 2000), solubilizam fosfato (FORCHETTI et al., 2007), são capazes de induzir resistência sistêmica nos vegetais (JUNG et al., 2006; ONGENA; JACQUES, 2008).

Espécies de *Bacillus* se constituem como um amplo potencial para utilização no controle biológico de fitopatógenos, e pela habilidade em formar esporos podem, ainda, fazer parte de formulações comerciais para aplicação no campo (DONG; ZHANG, 2006; FORCHETTI et al., 2007). São produtoras de antibióticos e antifúngicos que demonstraram forte ação inibitória contra fitopatógenos de mandioca, feijão, canola, trigo, dentre outras culturas economicamente importantes (RYAN et al., 2008). *Bacillus firmus* tem sido relatado, também, como importante no controle de nematóides (KEREN-ZUR et al., 2000).

Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* já foram isoladas de plantas saudáveis e com superfície desinfestadas de várias espécies vegetais incluindo citros (ARAÚJO et al., 2001; LACAVA et al., 2006; LIMA et al., 2005), feijão (LEE et al., 2005), milho (RAI et al., 2007; SOUZA, 2006), algodão (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990), cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2003); soja (BAI et al., 2002), batata (GARBEVA;

VEEN; ELSAS, 2003), banana (THOMAS et al., 2008), brássicas (WULFF; VAN VUURDE; HOCKENHULL, 2003), café (VEGA et al., 2005), morango (DIAS et al., 2009), girassol (FORCHETTI et al., 2007) dentre várias outras.

### 5.2.1.2 Gênero *Methylobacterium*

Na microplanta de eucalipto foi isolada somente uma espécie de bactéria *Methylobacterium* sp. e identificadas duas linhagens diferentes (Tabela 5). Díaz et al. (2009) realizou o isolamento da rizosfera de plântulas de *Eucalyptus globulus* e obteve com maior porcentagem de isolamento, bactérias do gênero *Bacillus*, o que não corresponde ao observado neste trabalho. A micropropagação pode ter, no caso de eucalipto, selecionado algumas bactérias em detrimento de outras.

Tabela 5 – Resultado da comparação da sequência parcial de 16S rRNA obtida a partir de isolados bacterianos provenientes das microplantas assintomáticas, os meios de cultura em que foram observados primeiro, o método de obtenção (fragmentação ou diluição), a linhagem e o grau de similaridade com as sequências

Microplanta/Meio de cultura	Similaridade	N ° Acesso	Espécie (NCBI)	Linhagem
Abacaxi 2 D (LB)	99%	EU741080.1	<i>Methylobacterium</i> sp.	13635G
Violeta 2 F (BG-11)				
Abacaxi 3 D (LB)	98%			
Eucalipto F (LB)				
Abacaxi 1 D (BDA)	90%	GQ228576.1	<i>Methylobacterium</i> sp.	C1FA3
Eucalipto D (LB)	98%			

Nota: Os números junto aos nomes das plantas representam respectivamente os laboratórios: 1 = Fisiologia de Árvores, 2 = Cultura de Tecidos e 3 = Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas. As letras que precedem o parênteses correspondem ao método de isolamento, sendo: D = diluição e F = fragmentação. As siglas dentro do parênteses correspondem ao meio de cultura utilizado.

Para as demais microplantas foram isoladas duas espécies, no caso de violeta e abacaxi, ambas do laboratório de Cultura de Tecidos e de abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores, foram isoladas as bactérias das espécies *Bacillus pumilus* e *Methylobacterium* sp., no entanto, para a microplanta de abacaxi do laboratório Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, além da *Methylobacterium* sp. foi isolado também *Bacillus firmus*.

Nas microplantas de abacaxi dos três laboratórios foi identificada apenas uma linhagem, contudo, nas microplantas de abacaxi pertencentes aos laboratórios de Cultura de Tecidos e de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas essa linhagem é a mesma, enquanto que para a microplanta de abacaxi do laboratório de Fisiologia de Árvores foi identificada uma linhagem diferente (Tabela 5).

Bactérias do gênero *Methylobacterium* são classificadas como  $\alpha$ -Proteobacteria, e possuem pigmentação rosa distintiva, são aeróbias, Gram-negativas, metilotróficas facultativa, capazes de crescer em meios com metanol, metilamina, formaldeído (MADHAIYAN et al., 2006a, 2006b; KNIEF et al., 2008). Tais bactérias já foram isoladas de várias espécies como, citros (ARAÚJO et al., 2001), pinheiro (PIRTTILÄ et al., 2000), crotalaria (ABDOULAYE et al., 2001), banana (THOMAS et al., 2008), amendoim (MADHAIYAN et al., 2006b), café (VEGA et al., 2005), pimenta (BENCHIMOL et al., 2000).

Através de métodos dependentes e independentes de cultivo descobriu-se que o gênero *Methylobacterium* é onipresente em plantas, como endofíticos, que possuem associação simbiótica na nodulação de raízes, e que por se tratar de uma metilotrófica, se beneficia da produção de metanol pela planta e de outros compostos derivados de carbono, desempenhando diferentes papéis (KNIEF et al., 2008), como fixação de nitrogênio (ABDOULAYE et al., 2001; ANDREOTE et al., 2009a; SY et al., 2001), promoção de crescimento, produzindo fitormônios (auxina e giberelinas) e estimulando a germinação (MADHAIYAN et al., 2004, 2005), capacidade de induzir respostas de defesa em plantas, além da possibilidade de interagir com alguns patógenos como *Xylella fastidiosa* (ANDREOTE et al., 2009a; ARAÚJO et al., 2002). Madhaiyan et al. (2006a) relataram a presença da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato –

deaminase (ACC), em *Methylobacterium*, envolvida na diminuição dos níveis de etileno e na alongação das raízes de canola.

O gênero *Methylobacterium* inclui 28 espécies descritas atualmente, colonizando diferentes nichos, como solo, lagos e o interior da planta (filosfera), o que sugere que ainda se conhece pouco a respeito de sua diversidade, e pela variedade de nichos a principal questão investigada é se são espécies adaptadas a diferentes ambientes e se elas exercem papéis ecológicos semelhantes nesses ambientes diferentes (KNIEF et al., 2008).

### 5.2.1.3 Gênero *Acinetobacter*

Assim como para os isolados anteriores, realizou-se primeiro a comparação das sequências com o banco de dados GenBank e identificou-se a espécie *Acinetobacter sp* em microplantas de abacaxi do laboratório de Cultura de Tecidos, como é possível verificar na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultado da comparação da sequência parcial de 16S rRNA obtida a partir de isolados bacterianos provenientes de microplantas assintomáticas de abacaxi, os meios de cultura em que foram observados primeiro, o método de obtenção (fragmentação ou diluição), a linhagem e o grau de similaridade com as sequências

Microplanta/Meio de cultura	Similaridade	N ° Acesso	Espécie (NCBI)	Linhagem
Abacaxi 2 D (BG-11)	98%	FJ694760.1	<i>Acinetobacter sp.</i>	DSM 7324

Nota: O número junto ao nome da planta representa o laboratório 2 = Cultura de Tecidos. A letra que precede o parênteses corresponde ao método de isolamento, sendo: D = diluição. A sigla dentro do parênteses corresponde ao meio de cultura utilizado.

Gammaproteobacteria é uma classe de diversos organismos dentro do filo Proteobacteria, seus membros desempenham importante papel biológico, participando de uma variedade de rotas metabólicas, inclusive fotossíntese, fixação de nitrogênio, oxidação de amônia (WILLIAMS; SOBRAL; DICKERMAN, 2007). Bactérias do gênero

*Acinetobacter* já foram isoladas de microplantas de banana (THOMAS et al., 2008), plantas de citros (LACAVA et al., 2006), plantas de arroz (SUN et al., 2008), videira (TROTEL-AZIZ et al., 2008).

Trotel-Aziz et al. (2008) trabalharam com *Acinetobacter lwoffii* e outras bactérias endofíticas de uva, como agentes no biocontrole de *Botrytis cinerea* e concluíram que, apesar do pouco conhecimento a respeito de *A. lwoffii*, ela induziu respostas de defesa na planta, como alta taxa de produção de lipoxigenase (LOX), produção de fenilalanina amonia liase (PAL) e quitinases, sendo indicada como importante agente de biocontrole de *B. cinerea*.



## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho comprova, por diferentes métodos de análise, a existência de uma comunidade endofítica, colonizando os tecidos de diferentes espécies de microplantas, provenientes de três laboratórios diferentes, o que exclui a possibilidade de contaminação e ressalta que essa comunidade existe e persiste independente dos métodos e condições de cultivo, quebrando o paradigma da existência de plantas “axênicas”, além de levantar um aspecto importante a ser considerado na cultura de tecidos, de que a assepsia é importante, porém, é impossível obter culturas assépticas, e que muito provavelmente, a partir de agora, os produtores e biofábricas terão de considerar não somente atribuições genéticas, mas, também, a comunidade endofítica presente, que pode atribuir características de interesse às plantas.



## REFERÊNCIAS

ABDOULAYE, S.Y.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B.

Methylotrophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 214-220, 2001.

ABREU-TARAZI, M.F. **Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia**. 2010. 137 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ABREU-TARAZI, M.F.; NAVARRETE, A.A.; ANDREOTE, F.D.; ALMEIDA, C.V.; TSAI, S.M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, p. 555-560, 2010.

ADAMS, A.S.; SIX, D.L.; ADAMS, S.M.; HOLBEN, W.E. *In Vitro* Interactions Between Yeasts and Bacteria and the Fungal Symbionts of the Mountain Pine Beetle (*Dendroctonus ponderosae*). **Microbial Ecology**, New York, v. 56, p. 460-466, 2008.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C.S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 96, p. 34-42, 2007.

AKHTAR, M.S.; SIDDIQUI, Z.A. *Glomus intraradices*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 74, p. 53-60, 2008.

ALBINO, U.B.; CAMPO, R.J. Efeito de fontes e doses de molibdênio na sobrevivência do *Bradyrhizobium* na fixação biológica de nitrogênio em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 527-534, 2001.

ALLEN, M.M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, Malden, v. 4, p. 1-4, 1968.

ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 467-470, 2005.

ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p. 1757-1764, 2009.

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

ÁLVARES, M.C.; CALDAS, L.S. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 415-420, 2002.

ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 417-432, 2009.

ANDREOTE, F.D.; ROCHA, U.N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; OVERBEEK, L.S. van. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 97, p. 389-399, 2010.

ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, R.L.T.; SALLES, J.F.; MARCON, J.; LABATE, C.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culture-independent assessment of rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic *Eucalyptus*. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, p. 82-93, 2009a.

ANDREOTE, F.D.; ROSSETTO, P.B.; MENDES, R.; AVILA, L.A.; LABATE, C.A.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1065-1073, 2009b.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI Jr., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

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

ARAVIND, R.; EAPEN, S.J.; KUMAR, A.; DINU, A.; RAMANA, K.V. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, p. 318-324, 2010.

ARRUDA, S.A. **Produção de propágulos de batata doce *Ipomea batatas* L. obtidos *in vitro* e submetidos a tratamentos prévios com fungicida e bactericida.** 2000. 42 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.

AUSUBEL, F.M; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley, 2005. v. 1.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. de. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 40-65, 2000.

BACILIO-JIMÉNEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; VALLE, M.V.; PÉREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZENTENO, E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 167-172, 2001.

BACON, C.W.; HINTON, D.M. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In: GNANAMANICKAM, S.S. (Ed.). **Plant-associated bacteria**. Amsterdam: Spinger, 2006. p. 155-194.

BAI, Y. M.; D'-Aoust, F.; SMITH, D.L.; DRISCOLL, B.T. Isolation of plantgrowth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 230-238, 2002.

BALACHANDAR, D.; SANDHIYA, G.S.; SUGITHA, T.C.K.; KUMAR, K. Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, p. 707-712, 2006.

BANDARA, W.M.M.S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S.A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 31, p. 645-650, 2006.

BARROW, J.R.; OSUNA-AVILA, P.; REYES-VERA, I. Fungal endophytes intrinsically associated with micropropagated plants regenerated from native *bouteloua eriopoda* torr. and *atriplex canescens* (pursh) nutt. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 40, p. 608-612, 2004.

BATTIN, T. J.; SLOAN, W. T.; KJELLEBER, G. S.; DAIMS, H.; HEAD, I. M.; CURTIS, T.P.; EBERL, L. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 76 - 81, 2007.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1183-1192, 2003.

BENCHIMOL, R.L.; CHU, E.Y.; MUTO, R.Y.; DIAS-FILHO, M.B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 1343-1348, 2000.

- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium wilt* of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, Heidelberg, v. 204, p. 153-168, 1998.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. P. **Botanical microtechnique and citochemistry**. Ames: Iowa State University Press, 1976. 326 p.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 139-149, 2003.
- BOON, N.; WINDT, W.; VERSTRAETE, W., TOP, E.M. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 39, p. 101-112, 2002.
- BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.
- CANBOLAT, M.Y.; BILEN, S.; ÇAKMAKÇI, R.; ŞAHIN, F.; AYDIN, A. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 42, p. 350-357, 2006.
- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The Diversity of *Archaea* and *Bacteria* in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p.252-263, 2001.
- CHENGALRAYAN, K.; ABOUZID, A.; GALLO-MEAGHER, M. *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Heidelberg, v. 41, p. 477-482, 2005.
- CHO, K.M.; HONG, S.Y.; LEE, S.M.; KIM, Y.H.; KAHNG, G.G.; LIM, Y.P.; KIM, H.; YUN, H.D. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. **Microbial Ecology**, New York, v. 54, p. 341-351, 2007.
- CHO, K.M.; MATH, R.K.; HONG, S.Y.; ISLAM, S.M.A.; MANDANNA, D.K.; CHO, J.J.; YUN, M.G.; KIM, J.M.; YUN, H.D. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (*kanjang*) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. **Food Control**, Oxford, v. 20, p. 402-406, 2009.
- CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special referencetoinducedsystemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, Jena, v. 164, p. 493-513, 2009.

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**, Oxford, v. 42, p. 669-678, 2010.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. New York: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

CUNHA, A.P.; ROQUE, O.R. Compostos fenólicos: características e origem biossintética. In: CUNHA, A.P. (Ed.). **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Guilbenkian, 2005. p. 212-224.

DAIMS, H.; WAGNER, M. Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 237-248, 2007.

DAMASCO, O.P.; GODWIN, I.D.; SMITH, M.K.; ADKINS, S.W. Gibberellic acid detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 36, p. 237-241, 1996.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A. de; CÂMARA, T.R. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 10, p. 391-403, 2002.

DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; TEIXEIRA, M.A.; ASSUMPÇÃO, L.C.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p. 189-195, 2009.

DÍAZ, K.; VALIENTE, C.; MARTÍNEZ, M.; CASTILLO, M.; SANFUENTES, E. Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p. 867-873, 2009.

DOBBELAERE, S.J.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 22, p. 107-149, 2003.

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; TAKAKI, G.M.C.; MARIANO, R.L.R.; MACIEL, G.A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 134-141, 2005.

DONG, L.Q.; ZHANG, K.Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 288, p. 31-45, 2006.

DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNARD, K.; MCCULLY, M.E. Further evidence that the N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1843-1846, 1995.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A Nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: a new role for the apoplast. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DOOLITTLE, W.F. You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. **Trends in Genetics**, London, v. 14, p. 307-311, 1998.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5285-5293, 2001.

EL-TARABILY, K.A. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 308, p. 161-174, 2008.

ESCALONA, M.; SAMSON, G.; BORROTO, C.; DESJARDINS, Y. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 39, p. 651-656, 2003.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HIJJER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FERREIRA, E.P.B.; NUNES, M.U.C.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Perfis de PCR-DGGE de comunidades bacterianas associadas ao rizoplane de milho sob diferentes doses de adubação com compostos orgânicos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, p. 41-50, 2009.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, 1998. v. 1, p. 21-43.

FIGUEIREDO, M.V.B.; MARTINEZ, C.R.; BURITY, H.A.; CHANWAY, C.P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, p.1187-1193, 2008.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, Bratislava, v. 62, p. 251-257, 2007.

FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 76, p. 1145-1152, 2007.

FRANKE-WHITTLE, I.H.; O'SHEA, M.G.; LEONARD, G.J.; WEBB, R.; SLY, L.I. Investigation into the ability of *Gluconacetobacter sacchari* to live as an endophyte in sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 271, p. 285-295, 2005.

GAMBOA, M.A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 156, p. 41-45, 2002.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, p.717-724, 2008.

GARBEVA, P.; VEEN, J.A. van; ELSAS, J.D. van. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 302-316, 2003.

GARBEVA, P.; OVERBEEK, L.S. van; VUURDE, J.W.L. van; ELSAS, J.D. van. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA Based PCR Fragments. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 369-383, 2001.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GOND, S.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, A.; KUMAR, V.; KHARWAR, R.N. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correeae (Rutaceae) from Varanasi (India). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 23, p. 1371-1375, 2007.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GOVINDARAJAN, M.; KWON, S.W.; WEON, H.Y. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 23, p. 997-1006, 2007.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 280, p. 239-252, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 44, p. 136-142, 2008.

GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 111, p. 206-211, 2001.

HARDOIM, P.R.; OVERBEEK, L.S. van; ELSAS, J.D. van. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.16, p. 463-471, 2008.

HARPER, J.K.; ARIF, A.M.; FORD, E.J.; STROBEL, G.A.; PORCO Jr., J.A.; TOMER, D.P.; ONEILL, K.L.; GRANT, D.M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities, **Tetrahedron**, Oxford, v. 59, p. 2471-2476, 2003.

HERNANDEZ, J.P.; BASHANA, L.E.; RODRIGUEZ, D.J.; RODRIGUEZ, Y.; BASHANA, Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, Issy les Moulineaux, v. 45, p. 88-93, 2009.

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

HOL, W.H.G.; PEÑA, E.; MOENS, M.; COOK, R. Interaction between a fungal endophyte and root herbivores of *Ammophila arenaria*. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 8, p. 500-509, 2007.

IDRIS, R.; KUFFNER, M.; BODROSSY, L.; PUSCHENREITER, M.; MONCHY, S.; WENZEL, W.W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 2667-2677, 2004.

IZUMI, H.; ANDERSON, I.C.; KILLHAM, K.; MOORE, E.R. Diversity of predominant endophytic bacteria in European deciduous and coniferous trees. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, p. 173-179, 2008.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 17, p. 77-119, 1998.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 747-760, 2001.

JANSA, J.; VOSÁTKA, M. *In vitro* and *post vitro* inoculation of micropropagated Rhododendrons with ericoid mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 125-136, 2000.

JENSEN, E.S.; HAUGGAARD-NIELSEN, H. How can increased use of biological N<sub>2</sub> fixation in agriculture benefit the environment? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 177-186, 2003.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 1940. 523 p.

JUNG, W.J.; JIN, Y.L.; PARK, R.D.; KIM, K.Y.; LIM, K.T.; KIM, T.H. Treatment of *Paenibacillus illinoisensis* suppresses the activities of antioxidative enzymes in pepper roots caused by *Phytophthora capsici* infection. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, p. 901-907, 2006.

KAMOUN, R.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Evidence for the occurrence of endophytic prokaryotic contaminants in micropropagated plantlets of *Prunus Cerasus* cv. 'Montmorency'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 57-59, 1998.

KANG, S.M.; JOO, G.J.; HAMAYUN, M.; NA, C.I.; SHIN, D.H.; KIM, H.Y.; HONG, J.K.; LEE, I.J. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, p. 277- 281, 2009.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, New York, v. 27, p.137-138, 1965.

KEREN-ZUR, M.; ANTONOV, J.; BERCOVITZ, A.; FELDMAN, K.; HUSID, A.; KENAN, G.; MARKOV, N.; REBHUN, M. *Bacillus firmus* formulations for the safe control of root-knot nematodes. **Proceeding of Brighton Crop Protection Conference on Pests and Diseases**, Brighton, v. 2A, p. 47-52, 2000.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 473-480, 2004.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis, v. 27, p. 29-43, 2007.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 853-862, 1997.

KNIEF, C.; FRANCES, L.; CANTET, F.; VORHOLT, J.A. Cultivation-independent characterization of *Methylobacterium* populations in the plant phyllosphere by automated ribosomal intergenic spacer analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2218-2228, 2008.

KOBAYASHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. . In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 199-236.

KOUR, A.; SHAWL, A.S.; REHMAN, S.; SULTAN, P.; QAZI, P. H.; SUDEN, P.; KHAJURIA, R.K.; VERMA, V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, p. 1115-1121, 2008.

KUKLINSKI, C. **Farmacognosia: estudio de lãs drogas y sustancias medicamentosas de origen natural**. Barcelona: Ed. Omega, 2000. 515 p.

KUMAR, C.G. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, p.13-17, 2002.

LACAVALA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 637-642, 2006.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Heidelberg, v. 41, p. 345-363, 2005.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley, 1991. p. 115-175.

LARRAN, S.; MÓNACO, C.; ALIPPI, H.E. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, p. 181-184, 2001.

LATA, H.; LI, X.C.; SILVA, B.; MORAES, R.M.; HALDA-ALIJA, L. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated *Echinacea* plants using 16S rRNA sequencing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, p. 353-359, 2006.

LEE, J.C.; LOBKOVSKY, E.; PLIAM, N.B.; STROBEL, G.A.; CLARDY, J. Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 60, p. 7076-7077, 1995.

LEE, K.D.; BAI, Y.; SMITH, D.; HAN, H.S.; SUPANJAN, I. Isolation of plant-growth-promoting endophytic bacteria from bean nodules. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Faisalabad, v. 1, p. 232-236, 2005.

LIMA, A.O.S.; QUECINE, M.C.; FUNGARO, M.H.P.; ANDREOTE, F.D.; MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W.L.; SILVA-FILHO, M.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Molecular characterization of a b-1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 68, p. 57-65, 2005.

LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, p. 13-19, 2006.

LIN, X.; LU, C.; HUANG, Y.; ZHENG, Z.; SU, W.; SHEN, Y. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 23, p. 1037-1040, 2007.

LIU, C.H.; CHEN, X.; LIU, T.T.; LIAN, B.; GU, Y.; CAER, V.; XUE, Y.R.; WANG, B.T. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 *in vitro* and identification of its antifungal components. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 76, p. 459-466, 2007.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; ZHOU, J. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 78, p. 241-247, 2008.

LONDE, L.N.; SOUSA, C.S.; VIEIRA, C.U.; BONETTI, A.M.; KERR, W.E. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio ms para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (anacardiaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, p. 94-100, 2007.

LOPES, C.A. Contaminações bacterianas em cultura de tecidos. **Boletim da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, Brasília, n. 13, p. 35-40, 1988.

- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; RYU, J.H.; SA, T.M. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 268-278, 2006a.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H.S.; HARI, K.; SUNDARAM, S.P.; SA, T.M. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 41, p. 350-358, 2005.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H.Y.; YANG, J.C. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 45, p. 315-324, 2004.
- MADHAIYAN, M.; SURESH-REDDY, B.V.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, p. 270-276, 2006b.
- MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 18, p. 145-155, 2008.
- MARTÍNEZ-MORALES, L.; SOTO-URZUA, L.; BACA, B.; SANCHEZ-AHEDO, J. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 228, p.167-173, 2003.
- MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1994. 220 p.
- MCINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 173, p. 337-342, 1995.
- MEJÍA, L.C.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. van; ARNOLD, A.E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G.J.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 46, p. 4-14, 2008.
- MELNICK, R.L.; ZIDACK, N.K.; BAILEY, B.A.; MAXIMOVA, S.N.; GUILTINAN, M.; BACKMAN, P.A. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**, Amsterdam, v. 46, p. 46-56, 2008.

- MENDOZA, A.R.; SIKORA, R.A. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **BioControl**, Dordrecht, v. 54, p. 263-272, 2009.
- MENEZES, N.L.; SILVA, D.C.; MELO-DEPINNA, G.F.A. Folha. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. p. 303-311.
- MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, p. 808-811, 1990.
- MÜLLER, P.; DÖRING, M. Isothermal DNA amplification facilitates the identification of a broad spectrum of bacteria, fungi and protozoa in *Eleutherococcus* sp. plant tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, p. 35-45, 2009.
- MUYZER, G. DGGE/ TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 317-322, 1999.
- MUYZER, G., SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Mini review. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, p. 127-141, 1998.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.
- NASCIMENTO-SILVA, O.; CHINALIA, L.A.; PAIVA, J.G.A. Caracterização histoquímica dos folíolos de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae Lindl.). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, p. 62-68, 2008.
- NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, London, v. 23, p. 6-8, 2005.
- NIELSEN, P.; SORENSEN, J. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 22, p. 183-192, 1997.
- NIETSCHKE, S.; MARQUES, S.V.; PEREIRA, M.C.T.; SALLES, B.; XAVIER, A.A.; FRANÇA, A.C.; LIMA, C. de; SILVA, L.S. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p. 989-991, 2006.
- NISHIMURA, T.; MEGURO, A.; HASEGAWA, S.; NAKAGAWA, Y.; SHIMIZU, M.; KUNOH, H. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from Mountain Laurel and its antifungal activity. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 68, p. 390-397, 2002.

OHTAKA, N.; NARISAWA, K. Molecular characterization and endophytic nature of the root-associated fungus *Meliniomyces variabilis* (LtVB3). **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 74, p. 24-31, 2008.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINE, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, R.P.; SILVEIRA, D.S.; SILVA, S.O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraploide (Grupo AAAB). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 73-78, 2001.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, p. 115-125, 2008.

OROS-SICHLER, M.; COSTA, R.; HEUER, H.; SMALLA, K. Molecular fingerprinting techniques to analyze soil microbial communities. In: van ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T. (Ed.). **Modern soil microbiology**. Madison: CRC Press, 2007. p. 355-386.

PAMPHILE, J.A.; AZEVEDO, J.L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 18, p. 391-396, 2002.

PANICKER, B.; THOMAS, P.; JANAKIRAM, T.; VENUGOPALAN, R.; NARAYANAPPA, S.B. Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum “Arka Swarna” and activation of endophytic bacteria. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 43, p. 614-622, 2007.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry**: theoretical and applied. Boston: Little Brown, 1968. 759 p.

PEREIRA, J.O.; CARNEIRO-VIEIRA, M.L.; AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 15, p. 37-40, 1999.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag. 1991. p. 179-197.

PICCOLO, S.L.; FERRARO, V.; ALFONZO, A.; SETTANNI, L.; ERCOLINI, D.; BURRUANO, S.; MOSCHETTI, G. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. **Annals of Microbiology**, Heidelberg, v. 60, p. 161-167, 2010.

PILEGGI, S.A.V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. 2006. 125 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PING, L.; BOLAND, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, p. 263-266, 2004.

PIRTTILÄ, A.M.; LAUKKANE, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLÄ, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3037-3077, 2000.

PIRTTILÄ, A.M.; PODOLICH, O.; KOSKIMÄKI, J.J.; HOHTOLA, E.; HOHTOLA, A. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, p. 47-55, 2008.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 577-582, 1997.

RAI, R.; DASH, P.K.; PRASANNA, B.M.; SINGH, A. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 23, p. 853-858, 2007.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, London, v. 6, p. 139-144, 1998.

REIS Jr., F.B.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Brasília: EMBRAPA, 2002. 33 p. (Série Documentos Brasília, 51).

REITER, B.; WERMBTER, N.; GYAMFI, S.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Endophytic *Pseudomonas* spp. populations of pathogen-infected potato plants analysed by 16S rDNA- and 16S rRNA-based denaturing gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 257, p. 397-405, 2003.

REVA, O.N.; SMIRNOV, V.V.; PETTERSSON, B.; PRIEST, F.G. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, p. 101-107, 2002.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrat at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p.208-212, 1963.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 278, p. 1-9, 2008.

SAIKKONEN, K. Forest structure and fungal endophytes. **Fungal Biology Reviews**, Oxford, v. 21, p. 67-74, 2007.

SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, p. 275-280, 2004.

SAKIYAMA, C.C.H.; PAULA, E.M.; PEREIRA, P.C.; BORGES, A.C.; SILVA, D.O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 117-121, 2001.

SANTOS, M.C.A.; FREITAS, S.P.; AROUCHA, E.M.M.; SANTOS, A.L.A. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 9, p. 24-30, 2009.

SANTOS, R.M.G.; RODRIGUES-FO, E.; ROCHA, W.C.; TEIXEIRA, M.F.S. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 19, p. 767-770, 2003.

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

SCRUGLI, A.; COGONI, A.; MELIS, G.V.; DEIDDA, D.; POMPEI, R. Biologic activity of endophytic fungi isolated from sardinian orchid roots. **Micologia Italiana**, Sardegna, v. 29, p. 29-37, 2000.

SELOSSE, M.; ALBERT, B.; GODELLE, B. Reducing the genome size of organelles favours gene transfer to the nucleus. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 16, p. 135-141, 2001.

SENTHILKUMAR, M.; MADHAIYAN, M.; SUNDARAM, S.P.; SANGEETHA, H.; KANNAIYAN, S. Induction of endophytic colonization in rice (*Oryza sativa* L.) tissue culture plants by *Azorhizobium caulinodans*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, p. 1477-1487, 2008.

SIEBER, T.N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, Oxford, v. 21, p. 75-89, 2007.

SILVANI, V.A.; FRACCHIA, S.; FERNÁNDEZ, L.; PÉRGOLA, M.; GODEAS, A. A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1259 - 1263, 2008.

SINGH, N.; PANDEY, P.; DUBEY, R.C.; MAHESHWARI, D.K. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, p. 1669-1679, 2008.

SOUZA, A.O. **Bactérias endofíticas de milho (*Zea mays* L.) e sua variabilidade genética analisada por RAPD**. 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

- SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, p. 185-195, 2004.
- STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; COELHO, L.C.B.B.; ARAUJO, J.M. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 76, p. 137-141, 2001.
- \_\_\_\_\_. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 83, p. 105-109, 2002.
- STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Issy les Moulineaux, v. 5, p. 535-544, 2003.
- STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of Rhizobacteria and the strategies required creating yield-enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 183-190, 2000.
- SUN, L.; LU, Z.; BIE, X.; LU, F.; YANG, S. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, p. 1259-1266, 2006.
- SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 415-424, 2008.
- SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Suita, v. 93, p. 88-90, 2002.
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 214-220, 2001.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2004. 719 p.
- TEJESVI, M.V.; MAHESH, B.; NALINI, M.S.; PRAKASH, H.S.; KINI, K.R.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H.S. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1535-1540, 2005.
- THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, p. 469-474, 2010.

THOMAS, P.; PRAKASH, G.S. Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 40, p. 603-607, 2004.

THOMAS, P.; SOLY, T. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 952-964, 2009.

THOMAS, P.; PRABHAKARA, B.S.; PITCHAIMUTHU, M. Cleansing the long-term micropropagated triploid watermelon cultures from covert bacteria and field testing the plants for clonal fidelity and fertility during the 7–10 year period *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, p. 317-329, 2006.

THOMAS, P.; SWARNA, G.K.; ROY, P.K.; PATIL, P. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, p. 55-63, 2008.

THOMAS, P.; KUMARI, S.; SWARNA, G.K.; PRAKASH, D.P.; DINESH, M.R. Ubiquitous presence of fastidious endophytic bacteria in field shoots and index-negative apparently clean shoot-tip cultures of papaya. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 26, p.1491-1499, 2007.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 61, p. 197-213, 2007.

TICHÁ, I.; CAP, F.; PACOVSKA, D.; HOFMAN, P.; HAISEL, D.; CAPKOVA, V.; SCHÁFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. **Physiology Plantarum**, Malden, v. 102, p. 155-162, 1998.

TING, A.S.Y.; MEON, S.; KADIR, J.; RADU, S.; SINGH, G. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **BioControl**, Dordrecht, v. 53, p. 541-553, 2008.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, 1998. v. 1, p. 11-20.

TROTEL-AZIZ, P.; COUDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 64, p. 21-32, 2008.

TROTSSENKO, Y.A.; IVANOVA, E.G.; DORONINA, N.V. Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. **Microbiology**, Moscow, v. 70, p. 623-632, 2001.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, p. 1414-1417, 1995.

ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ROCHA, P.S.G.; ALBUQUERQUE, C. Seleção *in vitro* de gemas de bananeira 'nanicão' tolerantes à salinidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 667-670, 2000.

ULRICH, K.; ULRICH, A.; EWALD, D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 63, p. 169-180, 2008.

VAN LE, Q.U.Y.; SAMSON, G.U.Y.; DESJARDINS, Y. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of *in vitro* plantlets of tomato (*L. esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO<sub>2</sub> concentration. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 158, p. 599-606, 2001.

VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J.S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, p. 371-380, 2005.

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

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R N.; GANGE, A.C. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and antimicrobial activity. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, p. 749-756, 2009.

VIRET, O.; PETRINI, O. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonia errabunda*). **Mycological Research**, Oxford, v. 98, p. 423-432, 1994.

VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Field performance of conventional vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa* spp., AAB group). **HortScience**, Alexandria, v. 31, p. 862-865, 1996.

WAKELIN, S.; WARREN, R.; HARVEY, P.; RYDER, M. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 40, p. 36-43, 2004.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 193, p. 249-253, 2000.

WATNICK, P., KOLTER, R. Miniriview: biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 2675-2679, 2001.

WEBER, O.B.; TERAQ, D.; ROCHA, L.S.; CORREIA, D.; SANTOS, F.J.S. Efeito de bactérias diazotróficas na produção do abacaxizeiro 'Cayenne Champac', sob irrigação, em dois níveis de adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, p. 249-253, 2004.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

WHITE Jr., J.F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A.C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 44, p. 13-37, 1993.

WILLIAMS, K.P.; SOBRAL, B.W.; DICKERMAN, A.W. A robust species tree for the Alphaproteobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 4578-4586, 2007.

WULFF, E.G.; VAN VUURDE, J.W.L.; HOCKENHULL, J. The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 463-474, 2003.

YONEZAWA, M.; USUKI, F.; NARISAWA, K.; TAKAHASHI, J.; HASHIBA, T. Anatomical study on the interaction between the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospira* and *Chinese cabbage*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 45, p. 367-371, 2004.

ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, p. 292-297, 2010.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)