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

**Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento
in vitro de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**

Katherine Derlene Batagin Piotto

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

**Piracicaba
2013**

Katherine Derlene Batagin Piotto
Engenheira Florestal

**Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento
in vitro de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2013**

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

Piotto, Katherine Derlene Batagin

Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage / Katherine Derlene Batagin Piotto.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

157 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Bactérias 2. Clonagem 3. Eucalipto 4. Fertilização "in vitro" 5. Fixação de nitrogênio 6. Micropropagação vegetal 7. Microrganismos endofíticos I. Título

CDD 634.9734
P662a

*Aos meus queridos padrinhos, amigos e pais científicos
Cristina e Marcílio de Almeida*

Ofereço

*À minha família,
Meu esposo Fernando,
aos meus pais Erivelto e Suelly
e aos meus irmãos Augusto e Gustavo
por todo amor, carinho, dedicação, por sempre
acreditarem em mim e nunca medirem esforços
para que esse sonho um dia se concretizasse,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa a concretização de um grande sonho, acalentado durante anos e seria impossível realizá-lo sem o apoio das pessoas e instituições que menciono a seguir, com enorme gratidão.

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as maravilhas que tem feito por mim.

Ao orientador, padrinho e pai científico, Prof. Dr. Marcílio de Almeida, agradeço imensamente por todos esses anos de orientação, dedicação, amizade e confiança em mim depositados.

À Dra. Cristina Vieira de Almeida, minha querida madrinha por ser muito mais que uma co-orientadora, por ser uma mãe para mim, agradeço por todo carinho, amor, amizade e pela imensa colaboração nas correções deste trabalho.

Ao Prof. Fernando Dini Andreote, pela colaboração e auxílio na execução desse trabalho.

Ao Prof. Antonio Natal Gonçalves e ao Prof. Ricardo Antunes de Azevedo, pela colaboração e disponibilização de seus laboratórios.

Ao amigo José Roberto Romanini (Beto) por toda ajuda, pelas altas risadas e por sempre me auxiliar em tudo, sou-lhe imensamente grata.

Ao doutorando Fábio Lino Soares Júnior (Dig) por toda ajuda, colaboração e paciência a cada dúvida minha.

À Maria Solizete Granziol Silva, pela atenção e carinho dedicados durante todos esses anos de pós-graduação.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Ciências Biológicas, a toda equipe de secretários e assistentes pela eficiência e colaboração nos serviços prestados em todos os momentos.

A CAPES pela bolsa concedida durante todo o curso.

À Faculdade de Ciência Sociais e Agrárias de Itapeva (FAIT) por contribuir na minha formação.

Aos meus pais Erivelto e Suely Batagin, que são a razão do meu viver. Mesmo estando longe, participaram, como sempre, ativamente na minha vida. Vocês são o meu porto seguro, obrigada por todas as noites que me ouviram chorar e por todas que vibraram pelas minhas conquistas, por todo amor, confiança e incentivo, que me fizeram ser perseverante em busca desse sonho. Amo vocês!!!

Aos meus amados e queridos irmãos Augusto e Gustavo, que sempre estiveram em meus pensamentos e no meu coração. Amo demais vocês!!!

Ao meu melhor amigo, companheiro, confidente e esposo Fernando Angelo Piotto, por todo carinho, atenção e amor. Pelas noites em claro comigo no laboratório, sempre me auxiliando, me incentivando, me escutando, bem como pela paciência e intensa colaboração na construção e realização desse sonho.

A todos os meus familiares, pela compreensão e amor, em especial às minhas tias Sônia, Marisa, Milva e ao meu avô Zacarias por toda ajuda e incentivo desde a minha graduação.

Ao meu avô Augusto e minhas avós Maria e Lourdes que lá do céu me acompanham, sempre estiveram e estarão em meu coração.

A minhas queridas cunhadas Eline e Najela, por toda amizade e carinho.

A minha segunda família, seu Sebastião e Mara Piotto, as minhas queridas cunhadas Tania e Flavia, e as minhas pequeninas Maria Laura e Marjorie, obrigada por me tornar parte dessa família tão maravilhosa.

A minha família “morfogênese”, meus estimados amigos de laboratório Érika, Eveline, Fabiane, Francisco, Gabriela, Germana, Gilvano, Leandro, Livia, Marília, Natália, Priscila, Rafaella, Raquel que são muito mais que amigos, são como irmãos para mim.

Aos meus queridos amigos do Polo de Licenciatura em Ciências/USP, Prof^a Taitiany Bonzanini, Prof. Quirino Carmello, Prof^a Rosebelly Marques, Carol, Cindy, Emerson, Helen, Isabela, Michel, Reinaldo, Rodrigo, Rosilda, Thomas, Vanessa e Valéria.

As minhas amigas Débora, Solange, Shirley, Vânia e Tais, que mesmo longe sempre estarão no meu coração.

Sei que muitas foram as minhas falhas durante a vida e posso estar falhando neste momento, esquecendo-me de alguém, por esse motivo peço desculpas, e agradeço a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho. Aquele que por ventura tenha esquecido e por qualquer que tenha sido a sua contribuição, sou-lhe muito grata.

*“Mude as suas opiniões, mantenha os seus princípios,
troque suas folhas e mantenha suas raízes”*

Victor Hugo

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	17
LISTA DE TABELAS	23
LISTA DE QUADROS	25
1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	31
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1 <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden & Cambage.....	33
3.2 Propagação clonal de <i>Eucalyptus</i>	35
3.3 Cultivo <i>in vitro</i>	36
3.4 Morfogênese x Fitorreguladores.....	39
3.5 Interação endófito x plantas	41
3.6 Inoculação artificial de bactérias endofíticas (Bacterização)	44
3.7 Micropropagação x Endófitos	46
3.8 Estresse oxidativo	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Infraestrutura	53
4.2 Material vegetal	53
4.3 Micropropagação.....	54
4.3.1 Fonte de explantes.....	54
4.3.2 Desinfestação dos explantes.....	55
4.3.3 Introdução <i>in vitro</i>	55
4.3.4 Subcultivos	55

4.3.5 Tratamentos.....	56
4.3.6 Aclimatização.....	58
4.4 Análises realizadas nas microcepas de <i>E. benthamii</i>	59
4.4.1 Avaliações do desenvolvimento dos clones.....	60
4.4.2 Avaliações anatômicas dos clones	60
4.4.3 Avaliações bioquímicas nas microcepas	61
4.4.3.1 Análise da produção de malondialdeído (MDA).....	61
4.4.3.2 Determinação do teor de nitrogênio das microcepas.....	61
4.5 Análises das colônias bacterianas manifestadas.....	62
4.5.1 Cultivo e isolamento das colônias bacterianas manifestadas	63
4.5.2 Identificação Molecular dos isolados por BOX-PCR	63
4.5.3 Sequenciamento	64
4.5.4 Análises bioquímicas dos isolados bacterianos	65
4.5.4.1 Produção de Ácido-Indol Acético (AIA) dos isolados	65
4.5.4.2 Fixação biológica de nitrogênio dos isolados.....	66
4.5.5 Estabelecimento da curva de crescimento bacteriano e determinação das Unidades Formadoras de Colônias	67
4.5.5.1 Preparação do pré-inóculo e inóculo	68
4.5.5.2 Curva de crescimento e determinação das Unidades Formadoras de colônias (UFC) dos isolados bacterianos.....	68
4.6 Bacterização <i>in vitro</i> dos isolados em diferentes espécies de eucaliptos	69
4.7 Análises estatísticas	69
5 RESULTADOS	71
5.1 Análises das microcepas de <i>E. benthamii</i>	71
5.1.1 Desenvolvimento dos clones na presença e ausência de manifestações endofíticas nas diferentes etapas da micropropagação.....	71
5.1.1.1 Etapa de multiplicação das microcepas.....	72

5.1.1.2 Etapa de alongamento das microcepas	75
5.1.1.3 Etapa de aclimatização das microestacas.....	81
5.1.2 Anatomia dos clones na presença e ausência de manifestações endofíticas ..	83
5.1.3 Produção de malondialdeído (MDA) pelos clones de <i>E. benthamii</i> na presença e ausência de manifestação endofítica	91
5.1.4 Teor de nitrogênio nas microcepas na presença e ausência de manifestação endofítica.....	93
5.2 Avaliações das colônias bacterianas manifestadas	95
5.2.1 Isolamento e cultivo da microbiota manifestada.....	95
5.2.2 Identificação dos isolados bacterianos por BOX-PCR	96
5.2.3 Identificação dos isolados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	98
5.2.4 Análises bioquímicas realizadas nos isolados bacterianos manifestados em microcepas de <i>E. benthamii</i>	101
5.2.4.1 Capacidade de produção de AIA.....	101
5.2.4.2 Capacidade de fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos	103
5.2.5 Curva de crescimento e determinação das Unidades Formadoras de colônias (UFC) dos isolados bacterianos	104
5.3 Bacterização em microcepas de <i>E. benthamii</i> e <i>E. cloeziana</i>	108
6 DISCUSSÃO	113
7 CONCLUSÕES	133
REFERÊNCIAS.....	135

RESUMO

Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage

A presença de bactérias na base de microplantas estabelecidas *in vitro*, acarreta o descarte da cultura, tornando a técnica onerosa. Entretanto, há de se considerar que nem sempre a presença dos microrganismos afeta o desenvolvimento das plantas em diferentes fases da micropropagação, inferindo que essas colônias são resultantes de exsudações de endófitos da espécie cultivada. Neste contexto, o presente trabalho visou verificar as possíveis influências da manifestação bacteriana endofítica no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii*. Para tanto, foram utilizados quatro clones (BP101; BP115, BP118 e BP120), em duas etapas de desenvolvimento: multiplicação e alongamento e, embora o processo *in vitro* fosse o principal foco da pesquisa, as análises estenderam-se para a fase de aclimatização, ou seja, desenvolvimento *ex vitro*. As microcepas foram mantidas *in vitro* sob dois tipos de manifestações bacterianas, as quais por sua vez, foram distintas quanto à coloração em: manifestação de colônias amarelas e manifestação de colônias brancas e, o controle, sem manifestação. Para compreender o desenvolvimento das microplantas na presença dos microrganismos, foram avaliados os parâmetros referentes ao incremento em massa seca, número de brotações, brotações alongadas e enraizamento, bem como características anatômicas e bioquímicas (produção de malondealdeído e teor de nitrogênio) das mesmas. Por meio da identificação molecular por BOX-PCR os isolados bacterianos foram agrupados e posteriormente identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. As linhagens bacterianas identificadas foram analisadas quanto à produção de AIA e fixação de nitrogênio, sendo as linhagens com os melhores resultados utilizadas na bacterização de microcepas de duas diferentes espécies de eucalipto (*E. benthamii* e *E. cloeziana*). Os resultados evidenciaram que nem toda presença microbiana *in vitro* é prejudicial às plantas micropropagadas, pelo contrário, observou-se que na maioria dos casos em *E. benthamii*, as manifestações possuem efeito neutro ou benéfico, promovendo o desenvolvimento das microplantas. As manifestações brancas e/ou amarelas constituíram uma associação de bactérias, com alta especificidade na interação endófito/microplanta. As análises moleculares identificaram similaridade com seis gêneros bacterianos: *Curtobacterium* (Actinobacteria), *Bacillus* e *Aneurinibacillus* (Firmicutes), *Delftia* (Betaproteobacteria), *Bradyrhizobium*, e *Novosphingobium* (Alphaproteobacteria), onde alguns deles mostraram-se comuns nos diferentes clones, sendo a *Curtobacterium* presente em todas as manifestações de todos os clones de *E. benthamii* analisados. Os resultados obtidos com a bacterização de diferentes espécies de eucalipto reforçam a especificidade da microbiota endofítica manifestada com seu hospedeiro, uma vez que a introdução de um isolado (inóculo) pode ocasionar alteração no equilíbrio do sistema de interação estabelecido, acarretando na redução ou simplesmente mantendo estável a taxa de crescimento das microplantas. Dessa forma, diante do atual panorama das biofábricas, as quais descartam inúmeras microplantas cultivadas *in vitro* em decorrência das manifestações bacterianas, evitar o descarte das microcepas e controlar sua manifestação, representa minimizar consideravelmente os prejuízos para as empresas e setores de pesquisas.

Palavras-chave: Eucalipto; Microrganismos Endofíticos; Especificidade; Interação; Bacterização

ABSTRACT

***In vitro* performance of the bacterial manifestations on *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage clones development**

The occurrence of bacteria growing together with microplants *in vitro* conditions frequently lead to discard of the material, increasing the costs on the micropropagation techniques. However, the microorganisms presence on the bacterial cultures do not always affect the plant development during the different phases of micropropagation because the bacteria colony probability are originated from self microplants as endophytic manifestations. This study evaluated the possible influences of the endophytic bacterial manifestation in the development of *Eucalyptus benthamii* growing on *in vitro* conditions. To access the evaluations were used four clones (BP101, BP115, BP118 e BP120) in two phases of microplants *in vitro* development: multiplication and elongation. The microstumps were grown under two different kinds of bacterial manifestations, distinguishable by colors in: white colony manifestations, yellow colony manifestations and no manifestations (control). To elucidate the microstumps development under the microorganisms presence, were evaluated referent parameters to the dry mass increasing, number of shoots, elongated shoots and rooting, as well as anatomical and biochemical characteristics alterations (malondialdehyde and nitrogen content). After bacterial isolation, they were grouped and identified by BOX-PCR, using partial sequencing of 16S rRNA gene. On the sets of the identified bacteria were analyzed for the AIA production and the nitrogen fixation, and those with better results were used to bacterizate another microstumps of two different *Eucalyptus* species (*E. benthamii* and *E. cloeziana*). The results indicate that the presence of *in vitro* microorganisms and microstumps together not always affect negatively the plant development. In opposite, bacterial manifestations brought benefits, stimulating the microstumps growth or do not affecting the growth of *E. benthamii* *in vitro* conditions. Actually, the white and yellow manifestations represents clusters of different bacteria, with high specificity in the interaction microstumps and endophytic. Molecular approaches identified through similarity analysis, six bacterial genus: *Curtobacterium* (Actinobacteria), *Bacillus* and *Aneurinibacillus* (Firmicutes); *Delftia* (Betaproteobacteria), *Bradyrhizobium* and *Novosphingobium* (Alphaproteobacteria). The occurrences of several of the bacteria were common among some clones, and *Curtobacterium* was present in all clones of *E. benthamii* analyzed. The results obtained by bacterization of two different *Eucalyptus* species confirmed that there is a high specificity between endophytic microorganisms' manifestations and its host plants, because the artificial bacteria introduction can causes alterations on the equilibrium of the establishment system of plant-microorganism interactions, reducing or stabilizing growth rates on microstumps. Considering the current situation about the biofactories, which usually discard great amount of cultivate microplants *in vitro* because of the bacterial manifestation, it's possible avoid these plant discard and make a control of their manifestations, with the intention to minimize substantially the losses in biofactories and also in research laboratories.

Keywords: *Eucalyptus*; Endophytic Microorganisms; Specificity; Interaction; Bacterization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Detalhe do minijardim clonal de <i>Eucalyptus benthamii</i>	54
Figura 2 - Minicepas de <i>E. benthamii</i> mantidas em: A) jardim clonal, B) Segmentos nodais utilizados como explantes e introduzidos em meio de cultura MS, C) Brotações provenientes do desenvolvimento das gemas axilares, onde os segmentos nodais foram subcultivados; D) Subcultivos das microcepas	54
Figura 3 - Representação esquemática da sequência metodológica adotada para análise das microplantas	59
Figura 4 - Representação esquemática da sequência metodológica utilizada para as análises das microcepas, das colônias bacterianas isoladas e da bacterização <i>in vitro</i>	62
Figura 5 - Concentrações de Ácido-Indol Acético ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA puro em água destilada) para leitura da curva padrão no espectrofotômetro com absorvância de 530 nm	66
Figura 6 - Representação esquemática da sequência metodológica utilizada para o estabelecimento da curva de crescimento e determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	67
Figura 7 - Microcepas de <i>E. benthamii</i> em diferentes condições <i>in vitro</i> : A) Sem Manifestação bacteriana endofítica (SM); B) Sob Manifestação de Colônias Amarelas (MCA); C) Sob Manifestação de Colônias Brancas (MCB)	71
Figura 8 - Clones de <i>E. benthamii</i> meio para multiplicação na presença e ausência de manifestação endofítica. A-C) Clone BP 101: sem manifestação (A), manifestação de colônias brancas (B) e manifestação de colônias amarelas (C). D-F) Clone BP 115: sem manifestação (D), manifestação de colônias brancas (E) e manifestação de colônias amarelas (F); G-I) Clone BP118: sem manifestação (G), manifestação de colônias brancas (H) e manifestação de colônias amarelas (I). J-L) Clone BP120: sem manifestação (J), manifestação de colônias brancas (K) e manifestação de colônias amarelas (L)	72

Figura 9 - Representação gráfica dos valores médios do incremento em: A) Massa seca e B) Número de brotações por microcepas de clones de *Eucalyptus benthamii* aos 30 dias de cultivo na etapa de multiplicação. (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro) 74

Figura 10 - Clones de *E. benthamii* meio para alongamento na presença e ausência de manifestação endofítica. A-C) Clone BP 101: sem manifestação (A), manifestação de colônias brancas (B) e manifestação de colônias amarelas (C). D-F) Clone BP 115: sem manifestação (D), manifestação de colônias brancas (E) e manifestação de colônias amarelas (F). G-I) Clone BP118: sem manifestação (G), manifestação de colônias brancas (H) e manifestação de colônias amarelas (I). J-L) Clone BP120: sem manifestação (J), manifestação de colônias brancas (K) e manifestação de colônias amarelas (L). Setas em vermelho indicando as brotações alongadas 76

Figura 11 - Representação gráfica dos valores médios do incremento em: A) Massa seca e B) Número de brotações por microcepa de clones de *Eucalyptus benthamii* aos 30 dias de cultivo na etapa de alongamento. (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro) 77

Figura 12 - Microcepa de *E. benthamii* cultivada em meio para alongamento evidenciando o desenvolvimento de brotação alongada e raízes..... 78

- Figura 13 - Representação gráfica dos valores médios no número de brotações alongadas (brotações $\geq 1,5$ cm) de clones de *Eucalyptus benthamii* aos 30 dias de cultivo, na etapa de alongamento *in vitro*. (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro).....79
- Figura 14 - Clones de *E. benthamii* durante o processo de alongamento e aclimatização: A) Microcepa cultivada em meio para alongamento evidenciando brotações alongadas (setas vermelhas) e raiz (seta azul); B) Detalhe microestaca coletada *in vitro*; C) Microestacas no início do processo de aclimatização; D-F). Detalhe microestacas após 30 dias de aclimatização, evidenciando bom desenvolvimento da parte aérea e radicular.....81
- Figura 15 - Fotomicrografia do limbo foliar de microplantas de *E. benthamii* evidenciando; A) Mesofilo dorsiventral e glândula secretora; B) Detalhe da nervura central. Legenda: Epiderme adaxial (Ep. ad.), epiderme abaxial (Ep. ab.), estômato (Es), parênquima paliçádico (PP), parênquima lacunoso (PL), glândula secretora (GS), feixes vascular (FV)83
- Figura 16 - Fotomicrografia de folhas de clones de *E. benthamii* na presença e ausência de manifestações endofíticas durante a etapa de multiplicação. A-B). Clones sob manifestação de colônias amarelas e brancas (MCA e MCB, respectivamente), apresentando compostos fenólicos (setas vermelhas), principalmente nas glândulas secretoras; C-D) Clones cultivados sem manifestações endofíticas, não evidenciando reação positiva a compostos fenólicos. Legenda: epiderme adaxial (Ep. ad.); epiderme abaxial (Ep. ab.); estômato (Es); parênquima paliçádico (PP); parênquima lacunoso (PL); glândula secretora (GS); feixes vascular. Barras = 50 μ m.....85

- Figura 17 - Fotomicrografias de folhas de clones de *E. benthamii*, evidenciando a classificação por atribuição de notas conforme a intensidade de ocorrência de compostos fenólicos. A) Reação negativa (-); B) Baixa intensidade (+); C) Média intensidade (++) e D) Alta intensidade (+++). Legenda: Epiderme adaxial (Ep. ad.); epiderme abaxial (Ep. ab.); estômato (Es); parênquima paliçádico (PP); parênquima lacunoso (PL); glândula secretora (GS); feixes vascular (FV). Barras = 50 µm..... 86
- Figura 18 - Fotomicrografia de raízes de microplantas de *E. benthamii* : A) Corte transversal radicular evidenciando epiderme uniestratificada (Ep), endoderme (En), córtex (Cox), exoderme (Ex), periciclo (P) e cilindro vascular (CV); B) Detalhe do cilindro vascular tetrarco evidenciando o xilema (X) e floema (F) alternos, endoderme (En) e periciclo (P). Barras = 100 µm..... 87
- Figura 19 - Fotomicrografia de raízes de clones de *E. benthamii* na presença e ausência de manifestações endofíticas, durante a etapa de multiplicação. A-B) Clones sob manifestação de colônias amarelas e brancas (MCA e MCB, respectivamente), apresentando compostos fenólicos (setas vermelhas), principalmente no cilindro vascular; C-D) Clones cultivados sem manifestações endofíticas, não evidenciando reação positiva a compostos fenólicos. Legenda: epiderme (Ep); endoderme (En); córtex (Co); exoderme (Ex); periciclo (P); xilema (X); floema (F) e cilindro vascular (CV). Barras = 50 µm..... 89
- Figura 20 - Fotomicrografias de raízes de clones de *E. benthamii*, evidenciando a classificação por atribuição de notas conforme a intensidade de ocorrência de compostos fenólicos. A) Reação negativa (-); B) Baixa intensidade (+); C) Média intensidade (++) e D) Alta intensidade (+++). Legenda: epiderme (Ep); endoderme (En); córtex (Co); exoderme (Ex); periciclo (P); xilema (X); floema (F) e cilindro vascular (CV) e Barras = 100 µm..... 90

- Figura 21 - Representação gráfica dos valores médios da produção de malondialdeído (MDA) em microcepas de *Eucalyptus benthamii* em função do meio de cultura. A) Meio de cultura para multiplicação; B) Meio de cultura para alongamento. (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro).....92
- Figura 22 - Representação gráfica dos valores médios do teor de nitrogênio nas microcepas de *Eucalyptus benthamii* em função do meio de cultura. A) Meio de cultura para multiplicação; B) meio de cultura para alongamento. (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro).....94
- Figura 23 - Representação esquemática das manifestações bacterianas nas microcepas de *E. benthamii*, evidenciando: A) Manifestação de colônias amarelas; B) Manifestação de colônias brancas; C) Isolamento das manifestações bacterianas pelo método de Estrias de Esgotamento em meio TSA; D) Detalhe dos três tipos de isolados obtidos: isolado amarelo claro, branco e amarelo escuro.95
- Figura 24 - Perfis de BOX-PCR dos isolados obtidos das colônias de bactérias manifestadas em meio de cultura próximas as microcepas de clones de *E. benthamii*. Os retângulos e as setas indicam quais isolados foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Correlação de Pearson (0% - 100%)97
- Figura 25 - Filogenia dos isolados das manifestações endofíticas de *E. benthamii*, baseada na sequência parcial do gene 16S DNAr, onde foram avaliadas a relação de similaridade sendo utilizado o grupo externo *Anabaena*, para o enraizamento da árvore filogenética.....98

- Figura 26 - Isolados de bactérias endofíticas em meio de cultura TSA correspondentes aos gêneros: A) *Aneurinibacillus* sp.; B) *Bacillus* sp.; C) *Bradyrhizobium* sp.; D) *Curtobacterium* sp.; E) *Delftia* sp.; F) *Novosphingobium* sp. 99
- Figura 27 - Leitura da curva padrão de AIA no espectrofotômetro com absorbância de 530 nm..... 101
- Figura 28 - Isolados de bacterianos em meio de cultura Nfb: A) Isolados Bac120A2 (*Delftia* sp.); B) Bac101A2 (*Bacillus* sp.); C) Detalhe da película de crescimento evidenciando a capacidade do isolado fixar nitrogênio (setas brancas)..... 103
- Figura 29 - Curvas de crescimento dos isolados A) *Aneurinibacillus* sp.; B) *Bacillus* sp. C) *Bradyrhizobium* sp.; D) *Curtobacterium* sp.; E) *Delftia* sp.; F) *Novosphingobium* sp. em função dos valores obtidos para densidade óptica e Unidades Formadoras de Colônias (UFC), ao longo de 48 horas de incubação a 37 °C..... 105
- Figura 30 - Curvas de crescimento dos isolados A) *Aneurinibacillus* sp.; B) *Bacillus* sp.; C) *Bradyrhizobium* sp.; D) *Curtobacterium* sp.; E) *Delftia* sp.; F) *Novosphingobium* sp. em função dos valores obtidos para densidade óptica 106
- Figura 31 - Microcepas de diferentes clones de eucaliptos sem manifestação endofítica e sem inoculação dos isolados (tratamentos testemunhas): A) Microcepas de *E. benthamii* (clone 7) e B) Microcepas de *E. cloeziana* (clone 3)..... 109
- Figura 32 - Microcepas bacterizadas *in vitro*: A-F) Microcepas de *E. benthamii*: A) Com inoculação de *Aneurinibacillus* sp.; B) Com inoculação de *Bacillus* sp.; C) Com inoculação de *Bradyrhizobium* sp.; D) Com inoculação de *Curtobacterium* sp.; E) Com inoculação de *Delftia* sp.; F) Com inoculação de *Novosphingobium* sp.; G-L) Microcepas de *E. cloeziana*: G) Com inoculação de *Aneurinibacillus* sp.; H) Com inoculação de *Bacillus* sp.; I) Com inoculação de *Bradyrhizobium* sp.; J) Com inoculação de *Curtobacterium* sp.; K) Com inoculação de *Delftia* sp.; L) Com inoculação de *Novosphingobium* sp..... 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o incremento em massa seca e número de brotações das microcepas de <i>E. benthamii</i> durante a etapa de multiplicação <i>in vitro</i>	73
Tabela 2 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o incremento em massa seca e número de brotações das microcepas de <i>E. benthamii</i> durante a etapa de alongamento <i>in vitro</i>	75
Tabela 3 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o número de brotações alongadas ($\geq 1,5$ cm) das microcepas de <i>E. benthamii</i> durante a etapa de alongamento.....	78
Tabela 4 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o percentual de enraizamento das microcepas de <i>E. benthamii</i> durante a etapa de alongamento <i>in vitro</i>	80
Tabela 5 - Média dos percentuais de enraizamento <i>in vitro</i> de microcepas de clones de <i>Eucalyptus benthamii</i> aos 30 dias de cultivo em meio para alongamento.....	80
Tabela 6 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o percentual de sobrevivência (microestacas enraizadas) de <i>E.benthamii</i> após 30 dias de aclimatização.....	82
Tabela 7 - Percentual de sobrevivência (microestacas enraizadas) de clones de <i>Eucalyptus benthamii</i> após 30 dias de aclimatização	82
Tabela 8 - Resumo da análise de variância da quantificação de malodialdeído (MDA) em microcepas de <i>Eucalyptus benthamii</i> cultivados <i>in vitro</i> em função do clone e da manifestação endofítica em 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> nas etapas de multiplicação e alongamento	91
Tabela 9 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o teor de nitrogênio em microcepas de <i>Eucalyptus benthamii</i> cultivados <i>in vitro</i> em meio para multiplicação e alongamento em função do clone e da manifestação endofítica após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	93

- Tabela 10 - Resumo da análise de variância da massa seca em microcepas do clone 7 de *Eucalyptus benthamii* e do clone 3 de *Eucalyptus cloeziana* cultivados *in vitro* em função da inoculação de bactérias endofítica em 30 dias de cultivo 108
- Tabela 11 - Incremento em massa seca em microcepas de *Eucalyptus benthamii* (clone 7) e *Eucalyptus cloeziana* (clone 3) cultivados *in vitro* em função da inoculação de bactérias endofítica em 30 dias de cultivo 109
- Tabela 12 - Incremento no número de brotações em microcepas do clone 7 de *Eucalyptus benthamii* e clone 3 de *Eucalyptus cloeziana* cultivados *in vitro* em função da bacterização endofítica em 30 dias de cultivo 111

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Composição básica do meio de cultura WPM utilizado para os experimentos de micropropagação de *E. benthamii* (LLOYD; McCOWN, 1980).....56
- Quadro 2 - Testes histoquímicos em folhas de clones de *E. benthamii* na presença e ausência de manifestações endofíticas nas diferentes etapas do cultivo *in vitro* (multiplicação e alongamento).....84
- Quadro 3 - Testes histoquímicos em raízes de clones de *E. benthamii* na presença e ausência de manifestações endofíticas nas diferentes etapas do cultivo *in vitro* (multiplicação e alongamento).....88
- Quadro 4 - Representação esquemática da identificação dos vinte e dois isolados oriundos tanto das manifestações de colônias amarelas (MCA) quanto das manifestações de colônias brancas (MCB) nos respectivos clones de *E. benthamii*96
- Quadro 5 - Representação esquemática da distribuição dos gêneros bacterianos identificados dos vinte e dois isolados de manifestações dos tipos amarelas e brancas (MCA e MCB, respectivamente) em clones de *E. benthamii*. Cores iguais caracterizam semelhança genética entre as bactérias100
- Quadro 6 - Produção do fitohormônio Ácido-Indol-Acético (AIA) por isolados bacterianos manifestados em microcepas de *E. benthamii*102

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* possui diversas espécies em destaque na silvicultura, devido à sua importância econômica, adaptabilidade a condições ambientais, diversidade de usos e rápido crescimento. Normalmente, essas espécies são propagadas via sementes, o que leva à alta variabilidade genética, causando uma série de limitações que dificultam a obtenção de mudas uniformes com padrão de qualidade elevado. Sendo assim, diversas estratégias de propagação apresentam-se como alternativa para a obtenção de indivíduos com características genéticas superiores, viabilizando a clonagem de plantas adaptadas a ambientes adversos, como é caso do *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage, apontado como excelente opção para o plantio comercial em regiões onde ocorrem severas e frequentes geadas (EMBRAPA, 1988).

A espécie *E. benthamii* destaca-se por ser promissora para o plantio na região Sul do Brasil. No entanto, assim como diversas espécies pertencente ao gênero *Eucalyptus* apresenta consideráveis dificuldades de enraizamento, seja por estaquia convencional ou por miniestaquia. De acordo com Assis e Mafia (2007), uma das prováveis causas dos baixos índices de enraizamento dessas espécies, é devido à elevada recalcitrância aos processos rizogênicos, quando comparados com espécies do mesmo gênero de clima tropical.

A técnica de micropropagação tem sido muito utilizada para o rejuvenescimento de clones por métodos convencionais (TITON; XAVIER; OTONI, 2002), chamando a atenção de empresas e pesquisadores pela alta taxa de multiplicação, a qual resulta na aceleração dos programas de propagação, possibilitando a clonagem maciça de híbridos de *Eucalyptus* de alto valor comercial e de difícil enraizamento (BRONDANI et al, 2009a). As mudas obtidas por meio desta técnica são mantidas em condições *in vitro* por questões estratégicas, no caso de genótipos de desempenho superior, constituindo assim os bancos de germoplasma, ou mesmo, para o abastecimento de mini ou microjardim clonal (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Diversas são as etapas referentes ao processo de micropropagação, as quais seguem um procedimento padrão, no qual, explantes oriundos de material vegetal coletado no campo, passam por processo de limpeza e desinfestação prévia à inoculação no meio de cultura. Após o estabelecimento *in vitro*, os explantes são

multiplicados, alongados, enraizados *in vitro* ou *ex vitro* e finalmente aclimatizados (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Uma das fases mais importante do processo de micropropagação, refere-se a etapa de multiplicação, uma vez que, nela ocorre a indução ou multiplicação de brotos (ERIG; SCHUCH, 2005). Nessa etapa os explantes são mantidos em meio de cultura com reguladores vegetais e passam por sucessivos subcultivos, visando o rejuvenescimento do material micropropagado, o que proporcionará maior potencial de enraizamento (XAVIER; COMÉRIO, 1997). De acordo com Alfenas et al. (2004) e Xavier et al. (2007), a característica de rejuvenescimento e/ou restabelecimento da competência ao enraizamento pode ser obtido, geralmente, após 10-12 subcultivos.

Por se tratar de uma técnica realizada em condições assépticas a partir de explantes sadios e assintomáticos, considera-se que as microplantas desenvolvidas sejam axênicas, ou seja, livres de microrganismos. No entanto, no decorrer dos subcultivos, observa-se frequentemente a manifestação de colônias bacterianas, em explantes estabelecidos *in vitro*, descaracterizando, as microplantas como axênicas (ABREU-TARAZI, 2010; ALMEIDA et al. 2009).

Quando as manifestações microbianas ocorrem, as microplantas são automaticamente descartadas, acarretando a perda de propágulos e tornando a técnica onerosa. Uma estratégia para manter o material *in vitro* seria controlar o desenvolvimento das colônias, porém raros são os trabalhos que demonstram como controlar eficientemente as manifestações (PANICKER et al., 2007), e até o momento não se sabe qual o fator ou fatores, que desencadeiam a manifestação em plantas sadias estabelecidas *in vitro*.

Acredita-se que os microrganismos que se manifestam *in vitro* sejam endófitos latentes, que não causam problemas às microplantas, porém, após um estresse, de qualquer natureza, esses microrganismos se manifestam, e passam a competir por nutrientes e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos propágulos, resultando em tecidos necrosados, redução da proliferação de brotações, menor taxa de enraizamento e morte da microplanta (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003).

Cabe ressaltar, que nem sempre a ocorrência de manifestações endofíticas, principalmente bacterianas, acarretam alterações na fisiologia das microplantas, conduzindo à ideia de que não necessariamente essa manifestação seja uma

ameaça ao estabelecimento e desenvolvimento do vegetal *in vitro*, sobretudo se for devidamente controlada.

Como mencionado, a manifestação endofítica está relacionada a estresses sofridos pelas plantas durante o cultivo *in vitro*, e estes, por sua vez, fisiologicamente são considerados uma condição causada por fatores que tendem a alterar o equilíbrio homeostático celular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; NILSEN; ORCUTT, 1996). Seja esse equilíbrio físico ou fisiológico, como por exemplo, no ajuste osmótico, na regulação da abertura estomática, em alterações morfológicas, bem como a alteração do metabolismo da planta (COMPANT et al., 2005). Dependendo do tipo e intensidade do estresse, bem como da espécie micropropagada, haverá uma resposta de resistência ou suscetibilidade a condição estressante, resultando na sua sobrevivência e desenvolvimento ou morte da microplanta (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

As razões pelas quais as manifestações microbianas ocorrem são muito polêmicas. Como mencionado, algumas pesquisas atribuem esse fato a estresses fisiológicos das microplantas associadas a alterações de temperatura, pH do meio, constituições químicas, intensidade luminosa, entre outros (SRINATH; BAGYARAJ; SATYANARAYANA, 2003). Dessa forma, considera-se necessário avaliar os níveis de estresses fisiológicos das microplantas sob manifestação endofítica. E uma das formas de se constatar se as microplantas realmente apresentavam-se estressadas, é através da presença de elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais por sua vez ocasionam danos à integridade das membranas celulares das microplantas (FOYER; NOCTOR, 2003). Tal processo é conhecido como peroxidação lipídica e é utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

Como pode se observar, a relação entre microrganismos endofíticos e microplantas, bem como a influência desses em seu desenvolvimento *in vitro*, pode ser melhor compreendida com um estudo interdisciplinar, que forneça informações sobre as possíveis alterações bioquímicas e anatômicas das microplantas sob manifestação endofítica durante o cultivo *in vitro*. Nesse contexto, o presente trabalho visou analisar e comparar o desenvolvimento de diferentes clones de *E. benthamii* sob manifestação endofítica e na ausência desta, a fim de se investigar as seguintes hipóteses:

- ✓ A ocorrência de estresse oxidativo em plantas micropropagadas está relacionada com a presença de manifestações bacterianas junto as microplantas;
- ✓ A microbiota bacteriana endofítica manifestada interfere no desenvolvimento *in vitro* das microplantas durante as diferentes etapas da micropropagação;
- ✓ Clones de mesma espécie de *Eucalyptus benthamii* apresentam comportamentos distintos diante da presença de manifestações de colônias endofíticas, alterando seu crescimento, alongamento e enraizamento;
- ✓ A presença de manifestação endofítica, durante o cultivo *in vitro* afeta o estabelecimento *ex vitro* das microestacas (aclimatização);
- ✓ Microplantas cultivadas na presença de colônias bacterianas endofíticas podem apresentar alteração nas características anatômicas foliares e/ou radiculares;
- ✓ A inoculação de bactérias endofíticas identificadas como produtoras de AIA e/ou fixadoras de nitrogênio potencializam o desenvolvimento *in vitro* de microplantas de diferentes espécies de eucalipto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar as possíveis influências da manifestação bacteriana endofítica no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Verificar qual o efeito da manifestação de bactérias endofíticas no desenvolvimento *in vitro* de diferentes clones micropropagados de *E. benthamii* por meio da análise do incremento em massa seca, número de brotações, brotações alongadas e enraizamento *in vitro* dos respectivos clones;

2.2.2 Verificar se há similaridade entre a microbiota bacteriana manifestada nos clones de *E. benthamii* e se essa conduz à alterações nos padrões morfogênicos e/ou desenvolvimento *in vitro* das microcepas;

2.2.3 Comparar por meio de análises morfológicas e histoquímicas, folhas e raízes de diferentes clones na presença e ausência manifestação bacteriana, para verificar possíveis alterações anatômicas durante o processo de micropropagação;

2.2.4 Determinar os teores de nitrogênio das microcepas, visando constatar a absorção desse elemento pelas microcepas e a possível influência da microbiota manifestada nesse processo;

2.2.5 Por meio da análise da peroxidação lipídica verificar se existe relação entre a ocorrência de estresse oxidativo nas microcepas dos respectivos clones, com a ocorrência de manifestações bacterianas, bem como verificar a relação entre o estresse oxidativo com o potencial de desenvolvimento *in vitro* dos diferentes clones estudados;

2.2.6 Identificar molecularmente a microbiota bacteriana manifestada *in vitro* nos respectivos clones;

2.2.7 Verificar se os isolados bacterianos são produtores de AIA e/ou fixadores de nitrogênio;

2.2.8 Bacterizar *in vitro* clones de diferentes espécies de eucalipto (*E. benthamii* e *E. cloeziana*) sem manifestações, visando avaliar o efeito individual de cada um dos isolados sobre o desenvolvimento de plantas micropropagadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage

Eucalipto é a denominação popular de várias espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus*, família Myrtaceae, na qual atualmente são conhecidas mais de 700 espécies. Originários da Austrália, Nova Guiné, Indonésia e Timor, os representantes deste gênero apresentam árvores de grande interesse econômico devido suas características inerentes ao crescimento rápido, corte entre 5 e 7 anos após o plantio, baixa exigência nutricional, baixo nível de competição entre as plantas, baixa incidência de pragas e doenças, ótimo formato do tronco, alta densidade básica da madeira, alta capacidade de rebrota e facilidade de produção de mudas (MOURA; GUIMARÃES, 2003). É uma essência florestal altamente integrada aos processos produtivos industriais e não industriais do Brasil, notadamente nas regiões Sul e Sudeste que constituem o maior polo consumidor e exportador de madeira oriunda de plantios florestais (ABRAF, 2011).

O gênero *Eucalyptus* é riquíssimo em espécies e variedades e por essa razão faz-se necessária uma escolha criteriosa das espécies para cada região, especialmente no caso do Brasil, onde existem diferenças climáticas consideráveis de um Estado para outro. Assim, a seleção de espécies mais adequadas para o cultivo para cada região, pode determinar o êxito ou fracasso do cultivo desta cultura (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Condições climáticas de baixa temperatura, por exemplo, representam uma limitação para plantas que crescem em clima tropical, como é o caso de espécies de eucaliptos cultivadas na Região Sul do Brasil. Desta forma, a espécies como *E.cloezina* e *E. benthamii* são indicados para o plantio nessas regiões (Lorenzi et al., 2003).

A espécie *E. benthamii* introduzida no Brasil pela Embrapa Florestas, mostrou-se como ótima alternativa para plantios florestais nessas regiões, em razão de suportar bem as baixas temperaturas e geadas frequentes, apresentando bom crescimento e tolerância nestas condições (HIGA; PEREIRA, 2003; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Higa e Pereira (2003) apontam o uso potencial da espécie como lenha, carvão e celulose, porém o uso da madeira de *E. benthamii* para serraria não é aconselhável, uma vez que apresentam rachaduras e empenamentos durante a secagem. Futuros programas de melhoramento genético podem resolver em parte esses fatores restritivos. Contudo, por se tratar de uma espécie considerada em extinção no seu centro de origem, a aquisição de material genético suficiente para o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético é dificultada Higa e Pereira (2003).

A ocorrência natural do *E. benthamii* é no litoral oriental de New South Wales, Austrália, sendo limitada a algumas áreas restritas ao oeste da cidade de Sydney em planícies ao longo do rio Nepean (BENSON, 1985; BENSON; McDOUGALL, 1998). A espécie originariamente ocorre em solos férteis das partes planas onde há a deposição de rios, em área de 100 km de comprimento por 40 km de largura, a latitude é de aproximadamente 34°S e altitudes inferiores a 100 m, sendo a temperatura média com máximas de 26°C e mínimas de 4°C, com ocorrência de geadas leves, e precipitação anual de 1100 mm no verão e outono (HIGA; PEREIRA, 2003).

De acordo com Higa e Pereira (2003) a maior parte da população original foi cortada para a formação de pastagens ou foi inundada com a construção da represa de Warragamba e, em razão a sua preferência por solos férteis, tornou-se vulnerável a expansão da fronteira agrícola sendo considerada em extinção (PRYOR, 1981), sem contar que a população natural de *E. benthamii* foi afetada por sérios incêndios o que potencializaram nesse processo de extinção.

Escassos são os resultados de plantios com *E. benthamii*, provavelmente pela área de ocorrência natural restrita, além da ocorrência de incêndios que limitaram a produção e coleta de sementes da espécie (HIGA; PEREIRA, 2003), fato esse que ocasiona o aumento nos preços destas, quando encontradas. Por este motivo, a propagação clonal apresenta-se como alternativa para a multiplicação da espécie.

3.2 Propagação clonal de *Eucalyptus*

A propagação clonal consiste basicamente na obtenção de novos indivíduos a partir de uma única planta doadora, e para tanto são utilizadas partes desta planta, sejam ramos, gemas, estacas, folhas, células ou raízes (HARTMANN et al., 2011).

Dessa forma cada planta obtida é, em princípio, geneticamente idêntica à planta-mãe, por essa razão tal técnica é usualmente utilizada em programas de produção de mudas em empresas florestais (PAIVA et al., 1996), uma vez que por meio da clonagem é possível fixar genótipos superiores (HARTMANN et al., 2011), obter maior uniformidade e produtividade nos plantios florestais (ASSIS, 1996), obtenção de clones mais adaptados e específicos à determinados locais (XAVIER; COMÉRIO, 1996).

Diversas são as técnicas de propagação, mas entre as mais utilizadas destaca-se a miniestaquia, a qual consiste na quebra da dominância apical da planta por meio de podas na macroestaca enraizada, que por sua vez emite novas brotações, denominadas estacas, as quais são enraizadas e constituem as mudas (WENDLING, 1999).

A técnica de estaquia foi a primeira testada para a espécie *E. benthamii* por Graça et al. (1999), mas atualmente a mais utilizada na maioria das empresas que trabalham com clonagem de diversos genótipos de *Eucalyptus*, é a miniestaquia, a qual pode ser considerada uma variação da estaquia convencional (macroestaquia). Consiste basicamente na utilização de brotações de plantas propagadas pelo processo de macroestaquia, ou por mudas produzidas a partir de sementes (ALFENAS et al., 2004; SCHWAMBACH et al., 2008; WENDLING et al., 2010).

Em relação a técnica de estaquia convencional em *Eucalyptus*, a miniestaquia apresenta grandes vantagens, como: maior facilidade nos tratamentos culturais; eliminação de jardins clonais em campo; maior produtividade; menores dosagens na aplicação de reguladores de crescimento vegetal; uniformidade; redução do tempo de formação da muda em viveiro (MAFIA et al., 2005; WENDLING et al., 2010).

Muitos são os trabalhos que descrevem a técnica de miniestaquia como viável ao enraizamento de *E. benthamii*. (BRONDANI et al., 2008; BRONDANI; GONÇALVES; ALMEIDA, 2010; BRONDANI et al., 2010a,b; CUNHA; WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2005; WIT ONDAS et al. 2009). No entanto, a aplicação da técnica tanto para plantios comerciais, como para programas de melhoramento genético

mostra-se um pouco limitada, devido à dificuldade ainda encontrada no enraizamento dessa espécie.

O surgimento da miniestaquia advém de limitações referentes aos aspectos técnicos, estruturais, operacionais e principalmente ao de custo no estabelecimento da microestaquia, ou seja, de plantas rejuvenescidas em laboratórios de micropropagação (WENDLING; XAVIER, 2005). A técnica de cultivo *in vitro* apresenta-se como uma importante ferramenta para a multiplicação em grande escala de materiais de difícil enraizamento, sendo realizados atualmente estudos que visam a micropropagação tanto de híbridos de *E. benthamii* (BRONDANI et al., 2009a), como da própria espécie (BRONDANI et al., 2009b, BRONDANI et al., 2012).

3.3 Cultivo *in vitro*

Potencialmente, segundo Hartmann et al. (2011), todas as plantas de todas as espécies podem ser multiplicadas por meio do cultivo *in vitro*, desde que as exigências nutricionais, hormonais e climáticas sejam satisfatórias. Entre os princípios nos quais se baseia a cultura de tecidos, os dois mais importantes segundo Kerbauy (1999), são a totipotencialidade celular e o balanço hormonal.

Pelo princípio da totipotencialidade, qualquer célula vegetal viva possui informações genéticas suficientes para produzir uma planta normal. A cultura de tecidos, dessa forma, pode propiciar a regeneração de uma planta inteira a partir de fragmentos de planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A expressão da totipotência, por sua vez é dependente do tipo de explante utilizado, que pode ser um fragmento de folha, raiz, caule ou de qualquer tecido vegetal. Na maioria dos trabalhos realizados *in vitro* com *Eucalyptus* são utilizados materiais juvenis como fonte de explantes, tais como hipocótilos (TIBOK et al., 1995), cotilédones (AZMI et al., 1997), caule e folhas de material proveniente de sementes (MULLINS et al., 1997) e embriões zigóticos (SERRANO et al., 1996).

Os explantes são constituídos de um conjunto de células em variados estádios fisiológicos, bioquímicos e de desenvolvimento. Nesse sentido a exposição desses explantes ao ambiente *in vitro* pode estimular reações diversificadas nos diferentes tipos celulares, permitindo que somente algumas das células dos

explantes respondam ao cultivo *in vitro*, resultando na regeneração de um novo indivíduo (TORRES et al., 2000).

Além da fonte de explante (folha, caule, raiz, meristema, dentre outros), que posteriormente darão origem às denominadas microcepas, existem outros dois fatores que podem afetar a regeneração *in vitro*: o genótipo (espécie, cultivar ou variedade que está sendo utilizada) e a condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura, recipiente de cultivo, reguladores de crescimento). Desta forma, tanto o sucesso do início do cultivo quanto da regeneração *in vitro* dependem do correto alinhamento no estabelecimento de todos esses fatores (TORRES et al., 2000).

Diversos são os tipos de explantes utilizados e as subsequentes manipulações das microcepas, as quais determinam as linhas gerais da etapa referente a multiplicação *in vitro* do material vegetal. A multiplicação pode se dar pela indução de gemas adventícias por organogênese, embriogênese somática ou mesmo por meio da proliferação de gemas axilares (TORRES et al. 2000).

Atualmente a proliferação de gemas axilares é mais utilizada para a micropropagação de *Eucalyptus*, apresentando resultados satisfatórios. A técnica envolve o isolamento *in vitro* de órgãos meristemáticos pré-formados, como gemas axilares ou meristemas apicais, os quais são estimulados a crescer em meio de cultura, dando origem a novas partes aéreas que, por sua vez, reiniciam o processo (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). Avaliações realizadas em campo com plantas micropropagadas de *Eucalyptus*, por meio de proliferação de gemas axilares, apresentam altas taxas de crescimento e uniformidade, comparáveis ou superiores às aquelas obtidas de sementes ou produzidas pela estaquia (WATT et al., 2003).

A micropropagação oferece a possibilidade de propagação de árvores selecionadas (BUNN et al., 2005; THORPE, 2007; WATT et al., 2003), a conservação de germoplasma *in vitro*, a obtenção de sementes sintéticas e a limpeza clonal (XAVIER et al., 2007), bem como apresenta elevada taxa de multiplicação, acelerando os programas de propagação clonal, possibilitando dessa forma a propagação de híbridos de *Eucalyptus* de alto valor comercial e de difícil enraizamento pelos métodos convencionais (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; JOSHI et al., 2003).

Adicionalmente, por meio de sucessivos subcultivos também é possível reverter a juvenilidade do tecido vegetal (XAVIER; COMÉRIO, 1996) melhorando de maneira expressiva o percentual de enraizamento (DUTRA; WENDLING;

BRONDANI, 2009), bem como reduzindo, a heterogeneidade entre os indivíduos em plantios comerciais de um mesmo clone, conhecida como efeito “C” (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000).

Embora o número de subcultivos seja indefinido, segundo Xavier et al.(2007) são necessários no mínimo de 10 a 12 subcultivos para o restabelecimento da capacidade de enraizamento e rejuvenescimento, sendo o intervalo ideal entre os subcultivos de 20 a 30 dias (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

O processo de micropropagação pode ser dividido em etapas, que seguem um procedimento padrão, onde inicialmente os explantes são selecionados e desinfestados para posterior introdução em meio de cultura e, após estabelecimento *in vitro*, as plantas então chamadas microcepas (tufos de brotações) são multiplicadas e alongadas, sendo assim denominadas brotações alongadas. Tais brotações quando extraídas das microcepas, são por sua vez, chamadas de microestacas, as quais podem ser enraizadas *in vitro* e/ou *ex vitro*. Por fim as microestacas são aclimatizadas em ambiente *ex vitro*. Cada etapa de desenvolvimento *in vitro* exige de adequado balanço hormonal (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

O desejável é que a multiplicação e o alongamento das brotações ocorram ao mesmo tempo. No entanto, segundo Dutra, Wendling e Brondani (2009) algumas espécies apresentam dificuldades de propagação *in vitro*, necessitando de uma fase de alongamento em meio de cultura próprio, constituído de diversas combinações entre BAP, ANA, AIB e GA₃. Em alguns casos, para se estimular o alongamento das brotações, reduz-se a concentração hormonal, principalmente de citocininas (BRONDANI, 2012), outras espécies, por sua vez não requerem a adição de citocininas (ASSIS; TEIXEIRA, 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A sequência e o número de fases do processo de micropropagação podem sofrer alterações em função do objetivo da pesquisa, da produção, ou mesmo da espécie trabalhada. Xavier e Comércio (1997), por exemplo, consideram o enraizamento *in vitro* dispensável, podendo esse processo ser realizado *ex vitro* com as brotações alongadas.

Os processos morfogênicos *in vitro* apresentam uma relação direta entre o genótipo da planta (diferentes espécies, híbridos ou clones) com as condições de cultivo a que são submetidos, sendo esses processos controlados por uma

variedade de sinais internos e/ou ambientais, os quais podem modificar o crescimento e o desenvolvimento das plantas (FORD et al., 2002).

3.4 Morfogênese x Fitorreguladores

Decorrente da integração dos processos de divisão e diferenciação celular, a morfogênese, pode conduzir a uma estrutura organizada e característica dos vegetais. Embora cada planta apresente um genótipo e um padrão de desenvolvimento bem estabelecido, os fatores externos podem influenciar na expressão genética, proporcionando às plantas expressiva plasticidade às diferentes condições (BENKOVÁ et al., 2003).

De acordo com Pasqual et al. (1997), os tecidos cultivados *in vitro*, mais comumente os padrões que ocorrem são a formação de novas raízes e gemas caulinares, vegetativas ou florais, através da organogênese, que por sua vez, pode ser direta, ou indireta (a partir de calos).

Dentre os fatores que atuam na morfogênese de espécies cultivadas *in vitro*, os reguladores de crescimento, também chamados de fitorreguladores, estão intimamente relacionados com a indução morfogênica (AIRES et al., 2008). Durante o cultivo *in vitro*, os níveis endógenos hormonais podem ser fortemente alterados pela aplicação exógena de fitorreguladores e exercer efeitos significativos nas respostas morfogênicas (MONCALEÁN et al., 2005).

Os fitorreguladores vegetais mais utilizados em meios de cultura são os pertencentes ao grupo das citocininas e das auxinas, os quais controlam a morfogênese *in vitro*, moduladas pelos demais hormônios como a giberelina, o etileno e o ácido abscísico (CHRISTOU et al., 1989). Dentre os representantes das citocininas e auxinas, os mais utilizados na micropropagação de espécies de *Eucalyptus* para a obtenção de brotações, são o BAP (benziladenina) e o ANA (ácido naftaleno acético) (BRONDANI et al., 2009a; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Geralmente as citocininas são utilizadas em culturas de tecidos em associação com as auxinas. O intuito dessa combinação é estimular a divisão celular e controlar a morfogênese, por meio da quebra na dominância apical e desenvolvimento de brotações laterais (ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES,

2006), bem como modular a formação de raiz e parte aérea (SKOOG; MILLER, 1957).

Cada etapa do processo de micropropagação requer uma determinada concentração ou proporção de fitorreguladores, onde, por exemplo, na fase referente à multiplicação dos explantes *in vitro*, a citocinina, apresenta um efeito inibitório no alongamento das brotações (SKOOG; MILLER, 1957). A auxina, por sua vez, é responsável pela divisão e a expansão celular (TAIZ; ZEIGER, 2004), controlando assim o crescimento e o alongamento celular nos vegetais, bem como o enraizamento. A adição de auxinas ao meio de cultura durante a fase de alongamento é usual, entretanto, algumas espécies como *Coleus forskohlii* (BERTOLUCCI et al., 2000), *Pothomorphe umbelata* (PEREIRA et al., 2000), *Phyllanthus caroliniensis* (REDDY et al., 2001), *Lippia alba* (GUPTA et al., 2001), *Artocarpus atilis* (CATAPAN et al., 2000), não necessitam desse regular de crescimento no meio de cultura para enraizarem.

A sensibilidade das plantas às auxinas pode explicar, ao menos parcialmente, o potencial dos explantes utilizados no processo de micropropagação (DUDITS et al., 1995), uma vez que, certos tipos de explantes no cultivo *in vitro* dependem da aplicação exógena do fitohormônio, enquanto outros são autônomos a síntese de fitorreguladores, ou mesmo, apresentarem elevados níveis endógenos de fitohormônios (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PINTO; LAMEIRA, 2001, REZENDE et al., 2011). Adicionalmente, de acordo com Hu e Ferreira (1998), os meios de culturas não obrigatoriamente necessitam da adição de reguladores de crescimento, exceto quando o objetivo do trabalho é a multiplicação rápida.

Na literatura, as concentrações de citocininas para a etapa de multiplicação de *Eucalyptus* variam entre 0,1 e 5,0 mg L⁻¹, e as concentrações de auxinas, por sua vez, são geralmente mais baixas, devido a manutenção do balanço auxina/citocinina ser menor que 1 (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entretanto, devido ao comportamento diferenciado das espécies, essas concentrações de reguladores de crescimento podem ser muito variáveis.

É desejável durante o cultivo *in vitro*, que tanto a multiplicação, quanto o alongamento das brotações ocorram ao mesmo tempo. No entanto, devido o genótipo das plantas, faz-se necessária uma etapa de alongamento das brotações, em meio de cultura próprio, com diversas combinações de auxinas e citocininas,

sendo, segundo Brondani et al., 2009a, uma opção simples, a redução na concentração de citocininas utilizadas na fase de multiplicação.

Os reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultura influenciam diretamente na morfogênese *in vitro*, no entanto, o genótipo da planta, é também de grande importância, pois como mencionado, algumas espécies apresentam uma alta produção hormonal endógena. Não obstante, alguns autores acreditam que a produção desses fitohormônios teria a participação de microrganismos endofíticos associados às plantas e não necessariamente seriam produzidos pelas próprias plantas hospedeiras (BOTTINI et al. 2004; PATTEN; GLICK, 2002).

3.5 Interação endófito x plantas

O termo endófito é de origem Grega, onde "*endon*" significa "*de dentro*" e "*phyt*" significa "*planta*" (CARROLL, 1998). Dessa forma, os microrganismos endofíticos podem ser definidos como microrganismos que colonizam os tecidos internos da planta, sem causar danos aparentes ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis podendo ser isolados de tecidos de plantas que tiveram sua superfície desinfestada (QIN et al., 2011). Segundo Azevedo et al. (2000) os microrganismos considerados endofíticos diferem dos epifíticos, por habitarem o interior das plantas, e para SOUZA et al. (2004) eles diferem dos fitopatogênicos por não causarem doenças. Vale ressaltar que essa distinção entre microrganismos endofíticos e patogênicos é meramente didática, pois um endófito pode tornar-se um patógeno dependendo das variações nas condições do ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos e, da mesma forma, um microrganismo epifítico pode penetrar na planta e permanecer por determinado período, tornando-se assim endofítico (AZEVEDO et al., 1998).

Existem cerca de 300.000 espécies vegetais na terra, e acredita-se que cada planta individualmente é hospedeira de um ou mais endófito. Muitos são os relatos destes microrganismos, os quais vivem em parte ou em todo o seu ciclo de vida no interior da planta, sem, entretanto, causar danos ao hospedeiro e sem desenvolver estruturas externas (ARAÚJO et al., 2002; ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; AZEVEDO et al., 2002; SANTOS et al., 2003; GOND et al., 2007; GUO et al., 2008; LONDE et al., 2007; PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003; SCHMILDT et al., 2005).

Os microrganismos endofíticos podem ser classificados em obrigatórios ou facultativos. Sendo os obrigatórios estritamente dependentes da planta hospedeira para seu crescimento e sobrevivência, e os facultativos, que apresentam uma fase de seu ciclo dentro da planta hospedeira e outra fora delas (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008).

Como se observa, a associação entre as plantas e os microrganismos endofíticos é complexa e variada, podendo em muitos casos ser considerada neutra ou mutualística (SOUZA et al., 2004). Considera-se que o mutualismo em condições *in vivo*, pode ser caracterizado pela troca de nutrientes e proteção por parte da planta hospedeira que por sua vez, é beneficiada com o favorecimento de seu crescimento e desenvolvimento pelo endófito (GUO et al., 2008).

A promoção de crescimento da planta em si é um evento altamente dependente da interação entre a bactéria promotora de crescimento, a comunidade microbiana associada ao hospedeiro e o genótipo da planta, podendo esse crescimento ser de forma direta ou indireta. A produção de fitorreguladores (PEDRAZA et al., 2004), a fixação de nitrogênio (COCKING, 2003) e a solubilização de fosfato inorgânico (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; TAURIAN et al., 2010), são exemplos da promoção de crescimento da planta de forma direta pelos microrganismos endofíticos.

De forma indireta, tais organismos podem promover o crescimento das plantas devido à síntese de antibióticos (ARDANOV et al., 2011, PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; VICENTE, 2011) ou sideróforos (ZHENG et al., 2011), composto esse capaz de diminuir e ou prevenir os efeitos danosos de microrganismos patogênicos, atuando dessa forma na defesa contra patógenos, seja por antibiose direta, ou pela indução de resistência sistêmica vegetal (ESPOSITO-POLESI, 2011), aumentando a tolerância a seca (SILVA et al., 2009) e até à restrição nutricional (DAVITT et al., 2011), podendo no cultivo *in vitro*, favorecer o ajuste osmótico, a produção de fitohormônios e absorção de nutrientes (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2009). Adicionalmente, Sharma e Nowark (1998) sugerem que a promoção do crescimento é um evento que precede a indução de resistência e pode ser dependente da colonização e posterior sensibilização do hospedeiro.

Atualmente, após diversas pesquisas visando elucidar a interação entre plantas e microrganismos é possível inferir que todas as plantas apresentam relações simbióticas com microrganismos. Bactérias promotoras de crescimento, por

exemplo, têm sido mencionadas em diferentes espécies de interesse comercial como arroz (HUREK et al., 1994), cana-de-açúcar (MAGNANI et al., 2010), tomate (ARDANOV et al., 2011), abacaxi (ABREU-TARAZI, 2010), pupunha (ALMEIDA et al. 2009), *Citrus* (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; ANDREOTE et al., 2004), mamão (THOMAS; KUMARI, 2010), banana (THOMAS; SOLY, 2009) e eucaliptos (ANDREOTE et al., 2008; FERREIRA et al., 2008; PROCÓPIO et al., 2009).

Em razão do potencial dessa relação simbiótica é crescente o interesse em entender quais os fatores que influenciam a persistência dessa simbiose (DAVITT et al., 2011). Andreote et al. (2010), ressaltam que a composição da comunidade associada às plantas esta diretamente relacionada a espécie, cultivar, ou mesmo as espécies transgênicas e suas respectivas progenitoras.

Considerando o gênero *Eucalyptus*, Procópio et al. (2009) avaliando a variabilidade genética dos endófitos mais frequentes de algumas espécies desse gênero, constataram que a comunidade bacteriana difere entre as espécies de eucaliptos, sugerindo que ocorre variação genética entre as espécies as quais podem favorecer ou dificultar a colonização da planta hospedeira pelas bactérias endofíticas, uma vez que, por exemplo, em *E. grandis* e *E. pellita* foi observada uma frequência de isolamento de bactérias endofíticas significativamente maiores quando comparada com *E. citriodora*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis* e *E. torelliana*. Neste trabalho, por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, o autor identificou diferentes bactérias endofíticas, as quais pertencem aos gêneros: *Erwinia/Pantoea*, *Agrobacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, e *Lactococcus lactis*.

Diferenças também foram observadas quando comparados materiais vegetais coletados em diferentes locais, sugerindo a ocorrência de variação genética dos microrganismos encontrados entre as espécies de *Eucalyptus*, que podem favorecer ou dificultar a colonização da planta hospedeira pelas bactérias endofíticas (PROCÓPIO et al., 2009; ABREU-TARAZI et al., 2010).

Trabalhos visando avaliar a diversidade bacteriana endofítica em eucaliptos mencionam a ocorrência dos gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Paenibacillus* e *Methylobacterium* para diversas espécies como o *E. grandis* (W. Hill.), *E. dunnii* (Maiden), *E. robusta* (Sm.), *E. camaldulensis* (Dehnh.), *E. citriodora* (Hook.), *E. urophylla* (S.T. Blake), *E. brassiana* (S.T. Blake), *E. saligna* (Sm.) e *E. grandis* x *E.*

globulus (Labill.) e *E. robusta* x *E. grandis* (FERREIRA et al., 2008), assim como o estudo de Paz (2009), o qual mostrou a presença das bactérias endofíticas *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Bacillus* sp., *B. licheniformis* e *Pseudomonas* sp. em *Eucalyptus* “*urograndis*”.

3.6 Inoculação artificial de bactérias endofíticas (Bacterização)

Tendo em vista a diversidade de bactérias endofíticas isoladas de diferentes espécies de eucaliptos, bem como de outras espécies de plantas, destaca-se a produção microbiana de AIA (ácido indol-3-acético) como um dos principais promotores de crescimento vegetal. Como mencionado anteriormente, acredita-se haver uma interação mutualística entre a planta e o endófito, uma vez que o fornecimento de auxinas promove o crescimento de plantas e, que por sua vez, produz mais exudatos e mais nutrientes favorecendo as bactérias (SOLANO et al., 2008).

Muitos são os microrganismos associados às plantas que apresentam a característica de produção de auxinas, destacando-se as bactérias endofíticas e epifíticas dos gêneros *Gluconacetobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Actinomyces* spp., *Agrobacterium* spp., *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Curtobacterium* spp., *Herbaspirillum* spp., *Pantoea* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. e *Xanthomonas* spp., que segundo Patten e Glick (1996) e Tsavkelova et al. (2006ab), apresentam a capacidade de promover o crescimento vegetal.

Por essa razão atualmente estudos vem sendo conduzidos a fim de verificar os benefícios da inoculação artificial dessas bactérias ou “biotização”. Tal técnica já é utilizada há algum tempo para a produção vegetal (GALDIANO JÚNIOR, 2009), e diversas são as respostas das plantas a esse procedimento, como o aumento de biomassa (GOVINDARAJAN et al., 2006), o acúmulo de massa seca (CANUTO et al., 2003), bem como o controle biológico e promoção de crescimento em eucaliptos propagados por estadia (PROCÓPIO, 2004).

A interação desses microrganismos no desenvolvimento das plantas tem sido adaptada ao cultivo *in vitro* para diversas espécies (GALDIANO JÚNIOR, 2009). De acordo com o autor, a bacterização *ex vitro* de plantas provenientes de cultivo *in vitro*, mostra-se altamente favorável à sobrevivência das microplantas em casa de

vegetação durante o processo de aclimatização. Adicionalmente, tais endófitos podem propiciar as plantas durante o cultivo *in vitro* o incremento em biomassa, maior aquisição de macronutrientes, biocontrole de fitopatógenos e resistência a estresses ambientais, com consequente redução da fase de aclimatização (GRAVEL et al., 2007; THOMAS, 2004; WEBER et al., 2003).

Efeitos positivos da inoculação de bactérias promotoras de crescimento também são verificados quando essas são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (LI et al., 2008; WEBER et al., 2003). Neste contexto, o processo denominado biofertilização é responsável por cerca de 65% do nitrogênio utilizado por plantas cultivadas no mundo, sendo os microrganismos mais eficientes na fixação de Nitrogênio, as bactérias diazotróficas simbióticas pertencentes ao gênero *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (MARIANO et al., 2004).

As rizobactérias diazotróficas, tais como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* e *Acetobacter*, que geralmente são encontradas endofiticamente em raízes, caules e folhas, apresentam também a característica de fixar o nitrogênio atmosférico, porém, sua interação com a planta é menos específica, quando comparada aos rizóbios (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001).

De acordo com Mariano et al. (2004) dentre as bactérias promotoras de crescimento, a utilização do subgrupo das endofíticas constitui uma alternativa ecologicamente correta aos fertilizantes químicos e pesticidas. Embora exista um grande número de trabalhos que confirmem a capacidade de algumas espécies bacterianas endofíticas, na promoção de crescimento das plantas, escassos são os trabalhos sobre seu uso como inoculantes, ou mesmo, na formulação de biofertilizantes.

Mariano et al. (2004), ressalta ainda que, a expansão do mercado de bioinoculantes, pode levar futuramente, à comercialização de bactérias endofíticas seja isoladamente ou em misturas, para promoção de crescimento de várias espécies de plantas, micropropagadas ou não, herbáceas ou arbóreas. Visando assim a obtenção de suprimento adicional de nitrogênio pelas endofíticas diazotróficas e ainda para indução de resistência sistêmica contra múltiplos patógenos de tecidos radiculares e foliares.

Para espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus*, Procópio et al. (2009) investigando a relação entre bactérias endofíticas isoladas de diversas espécies de eucalipto com a promoção do crescimento vegetal, bem como na inibição de fungos

endofíticos, descobriram o efeito direto de metabólitos segregados por bactérias endofíticas isoladas pertencentes ao gênero *Erwinia/Pantoea* na inibição de alguns fungos endófitos, sugerindo assim que tais metabólitos desempenham um papel em interações bacteriana-fúngicas no interior da planta hospedeira.

Diante do exposto, muitas são as perspectivas não só com relação aos isolados endofíticos selvagens, como àqueles que poderão ser otimizados pela identificação de genes envolvidos na habilidade de penetração no hospedeiro, promoção do crescimento e controle de patógenos (MARIANO et al., 2004), bem como na produção de novos metabólitos e enzimas (PROCÓPIO et al., 2009).

3.7 Micropropagação x Endófitos

Dentre as diversas técnicas de cultivo *in vitro*, destaca-se a micropropagação, a qual é muito utilizada no cultivo de plantas com limitações de multiplicação por métodos tradicionais de propagação (ESPOSITO-POLESI, 2010).

De acordo com Lima e Moraes (2006), muitos são os cuidados que devem ser tomados durante o estabelecimento das plantas *in vitro* uma vez que numerosos são os fatores que influenciam no desenvolvimento, tais como: taxa de multiplicação, altura, alongamento (estiolamento), enraizamento, formação de calos, ocorrência de contaminação, oxidação e o próprio processo de aclimatização, que estão diretamente relacionados com o genótipo, bem como pela condição ambiental *in vitro* a que essa está submetida.

A contaminação microbiana, dentre todos os fatores descritos é mencionada como uma séria ameaça ao sucesso da micropropagação, sendo considerada prejudicial e inibitória ao crescimento da cultura *in vitro* (THOMAS, 2004). Estudos relatam que as culturas aparentemente axênicas, ou seja, ausentes de microrganismos sob o pressuposto de assepsia, são assim consideradas devido à ausência de manifestação por microrganismos no meio de cultura e por essa razão passam por despercebidas quando não realizados testes específicos para detectá-las (LEIFERT; WOODWARD, 1998).

Pesquisas, entretanto, relatam que mesmo sem manifestação aparente existem comunidades endofíticas colonizando os tecidos de plantas consideradas axênicas (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; ALMEIDA et al., 2009; DIAS et al., 2009; ESPOSITO-POLESI, 2010; ESPOSITO-

POLESI, 2011; MARINO; ALTAN; BIAVATI, 1996; MARINO et al., 2009; PIRTILÄ et al., 2008; THOMAS, 2004; THOMAS et al., 2007a; THOMAS et al., 2008a), sendo a estrutura de comunidades endofíticas alteradas de acordo com seus nichos de colonização e períodos de cultivo da planta hospedeira (ABREU-TARAZI, 2010).

Até o momento não se sabe qual o fator ou fatores que desencadeiam a manifestação bacteriana no meio de cultura, levanta-se apenas a hipótese, que esses endófitos permanecem latentes *in vitro*, sem causar sintomas nas microplantas e posteriormente passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento das plantas. Dessa forma, a presença desses microrganismos com comportamento endossimbionte, denominados bacteriossomos (ALMEIDA et al., 2009), levantam a questão sobre como estes foram adquiridos no processo de evolução e como podem interferir, seja de forma benéfica ou prejudicial, o processo de micropropagação de plantas (TOLEDO, 2011).

Adicionalmente, Toledo (2011) sugere que tais questões são baseadas no fato de que a manutenção destas bactérias durante esse processo indica que esses microrganismos são estáveis e possivelmente importantes para o desenvolvimento das plantas. Dessa forma, deve-se considerar a hipótese de que a manifestação bacteriana pode não ser prejudicial ao desenvolvimento *in vitro*, podendo inclusive estar associada à respostas morfogênicas das microplantas.

Acredita-se que a relação entre o microrganismo endofítico com seu hospedeiro envolve um processo de co-evolução, estando diretamente relacionado com o genótipo, estágio de crescimento, condição fisiológica e tipo de tecido da planta colonizado pelo endófito. Segundo Thomas (2004), a sobrevivência da microbiota bacteriana endofítica e o reaparecimento destas manifestações nos ciclos subsequentes mesmo após o tratamento com desinfestantes, indicam que a esterilização não é meramente superficial, podendo assim tal manifestação ser contornada temporariamente com o uso de antibióticos.

Raros, entretanto, são os trabalhos que demonstram como controlar a manifestação endofítica (PANICKER et al., 2007) e, quando realizada a desinfestação, utiliza-se compostos que podem ocasionar a redução da capacidade de resposta morfogênica dos explantes exigindo, dessa forma, a utilização de biorreguladores mais fortes para alcançar o objetivo de propagação, o que por fim

acarreta sérios efeitos colaterais, como a variação somaclonal (ESPOSITO-POLESI, 2011).

Em decorrência da escassez de informações sobre as manifestações de bactérias endofíticas em plantas micropropagadas consideradas estabelecidas *in vitro*, elevado é o percentual de material vegetal considerado “contaminado” que é descartado por biofábricas ou mesmo em pesquisas realizadas com micropropagação que visam a obtenção de plantas axênicas (DONATO et al., 2005). Entretanto, um estudo recente realizado por Esposito-Polesi (2010), com diferentes espécies de plantas e em diferentes laboratórios, comprovou a existência de comunidades endofíticas independente da espécie, dos métodos e condições de cultivo, excluindo dessa forma a possibilidade de contaminação e contradizendo assim, a suposição de que as plantas micropropagadas são axênicas.

Pesquisas têm mostrado que ao contrário do que se pensava, nem toda manifestação microbiana *in vitro* pode ser considerada danosa (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; ALMEIDA et al., 2009; ABREU-TARAZI et al., 2010; THOMAS et al., 2008a). Almeida, Yara e Almeida (2005), mencionavam que a interação dos microrganismos endofíticos com plantas micropropagadas poderia estar relacionada com o potencial morfogenético das microplantas, conduzindo desta forma à melhor compreensão das respostas de diferentes genótipos e sua interação com os endófitos. Adicionalmente, os autores ressaltam que essa compreensão pode auxiliar na otimização e na viabilidade do processo de micropropagação, bem como na posterior aclimatização das microplantas, reduzindo as perdas e tornando este processo mais eficiente.

Cabe lembrar, que dependendo da condição ambiental em que as plantas se encontram, o endófito pode ser considerado um patógeno latente, onde dependendo do tipo e/ou intensidade de estresses *in vitro* que a planta seja submetida, o endófito pode se manifestar de forma prejudicial desencadeando sintomas de doenças (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; TOLEDO, 2011).

Um desses fatores estressantes refere-se ao próprio processo de micropropagação e/ou aclimatização das microplantas. Por exemplo, devido à mudanças bruscas de ambiente, esses endófitos latentes podem tornar-se patogênicos (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005). Dessa forma, torna-se necessário o estudo dessa relação em diferentes estágios do processo de micropropagação, uma vez que, o nicho ecológico ocupado por bactérias endofíticas é muito dinâmico,

no qual muitos fatores podem afetar a estrutura e a diversidade da população bacteriana que coloniza a planta (PROCÓPIO, 2004).

Dessa forma, o conhecimento da estrutura populacional das bactérias endofíticas torna-se fundamental para o entendimento da interação planta-endófito, e como essa interação pode ser influenciada pelo ambiente, levantando a hipótese que a manifestação bacteriana não necessariamente prejudica o desenvolvimento das plantas *in vitro*, podendo estar associada a respostas quando submetidas a estresses, seja ele biótico ou abiótico (LICHTENTHALER et al., 2009).

As plantas micropropagadas, assim como todas as plantas, sofrem diversos estresses durante seu ciclo de vida (GASPAR et al., 2002). De acordo com Kozai et al. (1997), a ocorrência de estresse *in vitro* pode ser decorrente das condições de cultivo que envolvem aspectos do ambiente físico, químico e gasoso dos recipientes. Adicionalmente, Srinath; Bagyaraj; Satyanarayana (2003), atribuem a própria presença de endófitos aos estresses fisiológicos das microplantas, que por sua vez estão associadas a alterações de temperatura, pH do meio, constituições químicas, intensidade luminosa, entre outros aspectos do cultivo *in vitro*.

3.8 Estresse oxidativo

O conceito de estresse está intimamente associado com as condições externas às plantas que afetam negativamente seu crescimento, desenvolvimento ou produtividade (LUTTS; KINET, 1998). Em se tratando do cultivo *in vitro*, Bray, Bailey-Serres e Weretilnik (2000) mencionam em seus trabalhos que a falha em compensar um estresse severo pode resultar na perda total da totipotência organogênica e, finalmente, morte da planta ou da célula.

Outros autores, entretanto, definem o estresse como alterações na fisiologia das plantas que ocorrem quando essas são expostas a condições desfavoráveis. Porém, tais condições não precisam representar uma ameaça à vida do vegetal, podendo inclusive, induzir uma resposta de alarme (LARCHER, 1980). Adicionalmente, pode-se dizer que as respostas de sinalização podem auxiliar na defesa ou representarem respostas adaptativas a um estímulo (GASPAR et al., 2002).

Durante condições normais de desenvolvimento e crescimento, as plantas inevitavelmente são expostas a diversas formas de estresse, sendo as espécies

reativas de oxigênio (EROs) comumente geradas sob estas condições (RAO; PALIYATH; ORMROD, 1996).

Tais formas de oxigênio ativo, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o superóxido (O_2^-), os radicais hidroxila ($OH^\cdot$) e o oxigênio “singleto” (1O_2) podem causar danos a integridade da célula (FOYER; DESCOURVIERES; KUNERT, 1994) devido à reação das EROs com os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares, o qual inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica, que por sua vez pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a peroxidação de lipídeos é a quantificação de malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. A sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos, que podem ser determinados por espectrofotometria (LIMA; ABDALLA, 2001), sendo um dos principais indicadores da ocorrência do processo de estresse oxidativo (DEWIR et al., 2006)

Segundo Bray, Bailey-Serres e Weretilnik (2000), dependendo do tipo de estresse e da espécie vegetal, haverá uma resposta de resistência ou suscetibilidade a ele, resultando na sua sobrevivência e crescimento ou na morte da planta. O cultivo *in vitro*, nesse contexto, pode ser uma forma de investigar por meio de eventos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, as respostas não somente de diferentes espécies, como também de clones de uma mesma espécie, cultivados no mesmo ambiente, e que, no entanto, apresentam respostas diferentes quando micropropagados.

Uma série de respostas nas plantas pode ser desencadeada pelo estresse, desde a expressão gênica e metabolismo celular alterados, até as mudanças nas taxas de crescimento (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). Sob condições de estresse, uma das estratégias adotadas pelas plantas é reduzir a taxa de crescimento, conservando assim, energia para defesa, limitando o risco de danos e facilitando o reparo de sistemas danificados (POTTERS et al., 2007).

Segundo Polesskaya, Kashirina e Alekhina (2004), a resistência das plantas aos efeitos estressantes possivelmente é determinada pelo nível de atividades das enzimas antioxidantes e a capacidade de aumentar rapidamente essas atividades. Tais enzimas estão envolvidas na defesa das células contra os danos ocasionados

pelas EROs, limitando a formação destas e/ou instituindo sua remoção (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). O estresse oxidativo ocorre quando há um sério desbalanço em qualquer compartimento celular entre a produção de EROs e a defesa antioxidante.

Em estudos sobre o metabolismo antioxidante durante a organogênese de *Ananas comossus* Semprebom (2008) sugere que o estresse oxidativo causado pelo cultivo *in vitro* pode gerar uma sinalização para que a organogênese se inicie. Estudos com precursores de sinalização reconsideram que o acúmulo de EROs, pode ser benéfico ao crescimento de plântulas através do controle do crescimento e do estado redox celular (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). Neste sentido, faz-se necessário trabalhos que visam correlacionar as diferenças metabólicas nos tecidos e os processos de morfogênese *in vitro*, uma vez que a identificação visual do processo morfogênico é subjetiva e somente comprovada depois de prolongados períodos de cultivo.

Como pode se observar o conhecimento dos fatores que interferem na diferenciação durante o processo de micropropagação, da multiplicação ao alongamento, é de suma importância, principalmente quando se relaciona tais processos com a interação planta e microbiota endofítica, uma vez que o enfoque mais estudado dessa interação é o crescimento do vegetal pela produção de fitohormônios como as auxinas (TSAVKELOVA et al., 2006a). Por sua vez, estes estão diretamente relacionados com os processos morfogênicos característicos não somente de cada espécie, como também entre clones da mesma espécie podendo a microbiota endofítica modificar fisiologicamente e bioquimicamente as células da plantas micropropagadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Infraestrutura

O trabalho foi conduzido em laboratórios pertencentes à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

Primeiramente as microplantas foram mantidas *in vitro* em sala de crescimento, no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas do Departamento de Ciências Biológicas. Sendo também realizadas no referido laboratório as análises histológicas das microplantas.

Na etapa referente à aclimatização, as microestacas foram transferidas para estufas pertencentes ao Laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais, com a colaboração Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves.

A análise da produção de malondialdeído (MDA) foi realizada no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética, com a colaboração do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo.

A análise para determinação dos teores de nitrogênio na matéria seca de microcepas de *E. benthamii*, foram realizadas no Laboratório de Análise Química do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ, conforme metodologia preconizada por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

A etapa referente ao isolamento e identificação molecular da microbiota manifestada, bem como as análises fisiológicas de produção de AIA e fixação de N dos isolados, foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Molecular e Ecologia Microbiana do Departamento de Ciência do Solo, com a colaboração do Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

4.2 Material vegetal

Foram utilizadas microcepas provenientes de minicepas de clones de *E. benthamii* doravante identificados como BP101, BP115, BP118 e BP120 (Figura 1), estabelecidas por Brondani (2012). Para inoculação (bacterização) dos isolados selecionados foram utilizados dois clones pertencentes ao gênero *Eucalyptus*, o clone (3) de *E. cloeziana* (Trabalho de doutorado de Leandro Silva de Oliveira, dados ainda não publicados) e o clone (7) de *E. benthamii* estabelecidos por

Baccarin (2012), ambos mantidos *in vitro* por doze meses. Todos os clones analisados foram inicialmente mantidos por meio de estaquia convencional e conduzidos em minijardim clonal no viveiro pertencente ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, Piracicaba-SP, para posteriormente serem introduzidos *in vitro*.

Figura 1 - Detalhe do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii*

4.3 Micropropagação

4.3.1 Fonte de explantes

As minicepas provenientes do minijardim clonal (Figura 2A) foram pulverizadas com fungicida Kumulus DF® a 2 g L⁻¹ (p/v) sete dias antes da coleta.

Foram utilizados como explantes, segmentos nodais da porção mediana da brotação (Figura 2B), contendo um par de gemas axilares, com as folhas removidas de tamanho médio de 1,5 cm.

Figura 2 – Minicepas de *E. benthamii* mantidas em: **A)** Jardim clonal, **B)** Segmentos nodais utilizados como explantes e introduzidos em meio de cultura MS, **C)** Brotações provenientes do desenvolvimento das gemas axilares, onde os segmentos nodais foram subcultivados; **D)** Subcultivos das microcepas

4.3.2 Desinfestação dos explantes

Os explantes (segmentos nodais) foram imersos em solução alcoólica 70% (v/v) por 15 segundos, enxaguados com água autoclavada e submetidos a desinfestação em solução de hipoclorito de sódio comercial 2,0% de cloro ativo (NaOCl) acrescida com 2 gotas do agente surfactante Tween 20 (0,05% v/v) durante 10 minutos.

Ao final do processo, os explantes foram enxaguados por três vezes com água destilada e autoclavada e introduzidos *in vitro*.

4.3.3 Introdução *in vitro*

Após a desinfestação dos explantes, estes foram introduzidos em tubos de ensaio (2 x 15 cm), contendo 10 mL de meio de cultura WPM “*Woody plant medium*” (LLOYD; McCOWN, 1980) (Quadro 1), sem adição de fitorreguladores (Figura 2B).

4.3.4 Subcultivos

As gemas laterais desenvolvidas durante a fase de estabelecimento, contendo 1 cm² com diversas gemas (Figura 2C), foram inoculadas em frascos de 7 cm x 6 cm, com 30 mL do meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,05 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), conforme protocolo estabelecido por Brondani (2012), sendo este meio referido no presente trabalho como *meio para multiplicação*.

A cada 30 dias foram realizados subcultivos das microcepas para renovação do meio de cultura, mantendo as mesmas concentrações de reguladores e nutrientes (Figura 2D).

COMPONENTE	PESO MOLECULAR	WPM
Macronutrientes	(g)	(mg L⁻¹)
NH ₄ NO ₃	80,04	400
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	96
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,15	556
KH ₂ PO ₄	136,09	170
K ₂ SO ₄	174,26	990
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	370
Micronutrientes	(g)	(mg L⁻¹)
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	372,24	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	278,02	27,8
MnSO ₄ .H ₂ O	169,01	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,54	8,6
H ₃ BO ₃	61,83	6,2
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	0,25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95	0,25
Vitaminas	(g)	(mg L⁻¹)
Tiamina-HCl	337,3	1
Piridoxina-HCl	205,6	1
Ácido nicotínico	123,11	1
Pantotenato Ca ²⁺	476,54	1
Biotina	244,3	0,01
Aminoácidos	(g)	(mg L⁻¹)
Glicina	75,07	1
Fonte de carbono	(g)	(mg L⁻¹)
Mio-inositol	180,16	100
Sacarose	342,3	30.000,00

Quadro 1 - Composição básica do meio de cultura WPM utilizado para os experimentos de micropropagação de *E. benthamii* (LLOYD; McCOWN, 1980)

4.3.5 Tratamentos

No décimo segundo subcultivo em meio para multiplicação (doze meses), quatro diferentes clones de *E. benthamii* (BP101, BP115, BP118, BP120), foram escolhidos por apresentarem visualmente tipos similares de manifestações endofíticas, onde as microcepas pudessem ser comparadas com aquelas que cresceram na ausência destas manifestações (Figura 3). Assim, foram definidos os seguintes grupos para este estudo:

- Microcepas de clones Sem Manifestação (SM) de colônias bacterianas;
- Microcepas de clones com Manifestação de Colônias Amarelas (MCA) e;
- Microcepas de clones com Manifestação de Colônias Brancas (MCB).

As microcepas foram subcultivadas no meio *padrão para multiplicação* (4.3.4), por mais cinco vezes, totalizando dezessete subcultivos e, ao final dos subcultivos o total de microcepas obtidas com e sem manifestação bacteriana foram divididas, onde parte continuou sendo cultivada no meio de cultura padrão para multiplicação, ou seja, WPM acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,05 mg.L⁻¹ de ANA, e parte das microcepas foram transferidas para meio WPM isento de reguladores de crescimento, caracterizando o *meio para alongamento*, de modo a garantir que as manifestações sejam as mesmas em ambas as etapas de multiplicação e alongamento.

As microcepas foram mantidas por 30 dias nos respectivos meios de cultura e posteriormente repicadas com aproximadamente 2,25 cm², contendo em média sete brotações, as quais foram introduzidas nos mesmos meios de cultura (Figura 3) e mantidas por mais 30 dias. Decorrido esse período, foram realizadas análises do desenvolvimento dos clones (item 4.4.1), análises anatômicas (item 4.4.2) e análises bioquímicas (item 4.4.3), nas microplantas tanto na fase de multiplicação quanto na fase de alongamento.

Todo o cultivo *in vitro* foi realizado em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C; irradiância de 42 µmol.m⁻².s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e fotoperíodo de 16 horas.

4.3.6 Aclimatização

As microestacas obtidas *in vitro*, dos clones de *E. benthamii* (BP101, BP115, BP118, BP120), pelo alongamento das brotações (microestacas que apresentam comprimento entre 1,50 e 2,50 cm), foram transferidas diretamente para bandejas de células (Figura 3), contendo substrato composto por vermiculita e Basaplant Florestal® (2:1, v/v).

As bandejas de células foram envolvidas com polietileno para manter a umidade relativa do ar elevada, constituindo assim um miniestufim (BRONDANI, 2012). Essa condição foi mantida por 30 dias, sendo após esse período, analisados os percentuais de enraizamento e sobrevivência das mudas dos respectivos clones, que apresentaram ou não, durante o cultivo *in vitro*, manifestações bacterianas endofíticas.

4.4 Análises realizadas nas microcepas de *E. benthamii*

A Figura 3 representa um esquema com um resumo de todo o procedimento metodológico utilizado no presente trabalho.

Figura 3 - Representação esquemática da sequência metodológica adotada para análise das microplantas *Eucalyptus benthamii*

4.4.1 Avaliações do desenvolvimento dos clones

Os dados referentes ao incremento no número de brotações e massa seca das microcepas foram determinados no início das etapas de multiplicação e alongamento, bem como após 30 dias de inoculação nos respectivos tratamentos na presença e ausência de manifestações endofíticas, estimando-se assim o incremento dos respectivos parâmetros. Foram aferidos também aos 30 dias, o número de brotações alongadas por microcepa (brotações com altura $\geq 1,5$ cm), bem como o possível enraizamento das microcepas *in vitro*. Após 30 dias que as microestacas foram transferidas para o ambiente *ex vitro*, foram analisados o percentual de sobrevivência e de enraizamento das mesmas. O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial 4x3 (4 clones x 3 tipos de manifestações bacterianas) para cada etapa da micropropagação (multiplicação e alongamento) com 10 repetições por tratamento.

4.4.2 Avaliações anatômicas dos clones

Foram fixados em solução Karnovsky (1965), segmentos de folhas e raízes de microcepas nas etapas de multiplicação e alongamento na presença e ausência de manifestações endofíticas. Posteriormente, os segmentos foram desidratados em série etílica e inclusos em resina de hidroxietilmetacrilato (LEICA-HISTORESIN[®]) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos com as amostras foram cortados em secções transversais em micrótomato rotativo com aproximadamente 5 μ m de espessura.

Os cortes histológicos foram submetidos a dupla coloração com ácido periódico de Shiff (PAS) (MAIA, 1979) e naftol blue-black (ALMEIDA et al., 2012), resultando em uma coloração roxa para polissacarídeos na parede celular e amido no citoplasma, laranja para compostos fenólicos e azul para proteínas. As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2) sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG (SDC-313). O delineamento experimental utilizado em esquema fatorial 4x3 (4 clones x 3 tipos de manifestações bacterianas) tanto para a etapa da multiplicação quanto de alongamento das microcepas, com 3 repetições por tratamento.

4.4.3 Avaliações bioquímicas nas microcepas

4.4.3.1 Análise da produção de malondialdeído (MDA)

A determinação da peroxidação lipídica das microcepas de *E. benthamii*, foi realizada a partir da produção de malonaldeído (MDA), metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), técnica adaptada de Heath e Packer (1968). Para tanto, as microcepas cultivadas nas etapas de multiplicação e alongamento na presença e ausência de manifestações endofíticas foram maceradas em TCA (ácido tricloroacético) 0,1% na proporção de 0,2 g.mL⁻¹, juntamente com 20% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona).

Após completa homogeneização, 1 mL de cada amostra foi transferida para tubos eppendorf e centrifugados a 12.000 rpm por 10 min. Do sobrenadante, foi retirado 0,25 mL e transferido para outro eppendorf juntamente com 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 min. a 95°C, e na sequência, resfriada em gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 10.000 rpm, e em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro à 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em mmol/mg de tecido fresco.

O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial 4x3 (4 clones x 3 tipos de manifestações bacterianas), tanto para a etapa de multiplicação quanto de alongamento das microcepas, com 3 repetições por tratamento obtidas a partir da média de 3 triplicatas de cada repetição.

4.4.3.2 Determinação do teor de nitrogênio das microcepas

Foram analisadas microcepas cultivadas na ausência e na presença de manifestação de colônias bacterianas, tanto no meio de cultura referente à etapa de multiplicação quanto de alongamento. Dessa forma, o delineamento experimental foi em esquema fatorial 4x3 (4 clones x 3 tipos de manifestações bacterianas), nos respectivos meios de cultura, com 3 repetições por tratamento.

4.5 Análises das colônias bacterianas manifestadas

A Figura 4 representa um esquema resumido do procedimento metodológico utilizado no presente trabalho.

Figura 4 - Representação esquemática da sequência metodológica utilizada para as análises das microcepas, das colônias bacterianas isoladas e da bacterização *in vitro*

4.5.1 Cultivo e isolamento das colônias bacterianas manifestadas

As colônias bacterianas, tanto amarelas quanto brancas (MCA e MCB, respectivamente), manifestadas no meio de cultura das microplantas de *E. benthamii*, foram coletadas com auxílio de uma alça de platina previamente flambada e plaqueadas em meio de cultura TSA (*Tryptic Soy Agar*) geleificado com ágar (6 g.L^{-1}) e incubadas em estufas bacteriológicas a temperatura de 28°C .

As colônias desenvolvidas foram subcultivadas em placas de Petri, contendo 20 mL de meio TSA, sendo assim purificadas por meio de Estrias de Esgotamento, e após a obtenção das colônias isoladas, o processo foi repetido por mais seis vezes.

Foram realizadas cinco repetições, totalizando 40 unidades experimentais [tipos de colônias manifestadas (2) x clones (4) x repetições (5)]. Após a obtenção das colônias isoladas, essas foram mantidas sob agitação em meio de cultura TSB (*Tryptic Soy Broth*) líquido e armazenadas em solução de glicerol 50% em freezer à -20°C .

4.5.2 Identificação Molecular dos isolados por Box-PCR

As bactérias isoladas advindas das manifestação de colônias amarelas (MCA) e manifestação de colônias brancas (MCB), foram agrupadas por meio de reações de PCR utilizando o primer BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). As reações mix de PCR foram realizadas a partir de células contidas em 2 mL da cultura de cada bactéria isolada, onde o DNA foi extraído de acordo com metodologia de *bead beating* previamente descrita (ANDREOTE, 2007).

Para tanto, as células foram suspensas em 500 μL de tampão TE e a lise promovida pela adição de 0,1 g de pérolas de vidro (0,1 mm) e 5 μL de SDS 10%, sendo a mistura posteriormente agitada por 30s.

Após a lise, a purificação do DNA foi realizada por lavagens em fenol e clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com isopropanol, seco e ressuspenso em água deionizada. Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v), seguida de coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta.

As imagens com os perfis de BOX-PCR das bactérias purificadas foram analisadas no programa Bionumerics (Applied Maths, Bélgica), onde foram

normalizados e comparados por correlação de Pearson (0% - 100%), levando em consideração os gradientes das curvas de coloração de cada amostra aplicada no gel.

4.5.3 Sequenciamento

As bactérias isoladas, pertencentes a cada perfil de BOX-PCR foram submetidos à identificação filogenética, feita por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. O produto de PCR gerado pela amplificação com os primers P027 e R1387 foram analisados em gel de agarose 1,0 % a 3 V.cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado em luz ultravioleta.

As sequências obtidas foram utilizadas para identificação filogenética dos isolados. Este tipo de identificação foi feita por meio de comparação das sequências obtidas com as contidas nos bancos de dados do Ribosomal Data Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e por meio da análise de BLASTn no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1990), posteriormente alocadas em árvores filogenéticas contendo as espécies mais similares, sendo utilizado o grupo externo *Anabaena*, para o enraizamento da árvore filogenética.

Os alinhamentos e a filogenia foram realizados no programa MEGA versão 4.1 (TAMURA et al., 2007).

4.5.4 Análises bioquímicas dos isolados bacterianos

4.5.4.1 Produção de Ácido-Indol Acético (AIA) dos isolados

Para a quantificação de produção de AIA foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por Bric et al. (1991). Com base no pré-conhecimento do tempo necessário para o crescimento de cada isolado bacteriano, utilizou-se 200 µL do inóculo (4.5.5.1) em fase *log* terminal de crescimento, em 20 mL de meio composto de TSB 10% (*Tryptic Soy Broth*) e L-triptofano (5 mM). Esse volume de inóculo corresponde à aproximadamente 12×10^2 Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Os tubos de ensaio contendo os inóculos foram mantidos no escuro a 28°C por 72 horas, sob constante agitação. Após o período de incubação sob agitação, 1,50 mL de cada cultura homogeneizada foi transferido para tubos *ependorf* e centrifugado a 12.000 rpm por cinco minutos.

Retirou-se 600 µL do sobrenadante os quais foram transferidos para cubetas e adicionados 400µL do reagente de Salkowski, o qual por sua vez é constituído por: 1 mL de Cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M (1,35 g/10 mL) adicionado a 49 mL de Ácido perclórico 35% (HClO_4) (GORDON; WEBER, 1951).

Decorridos trinta minutos da adição do reagente foram realizadas leituras no Espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm. A concentração dos compostos indólicos foi estimada com uma curva-padrão previamente preparada com quantidades conhecidas de ácido-indol-acético comercial (0; 1; 5; 10; 20; 40; 50; 80 e 100 µg/mL de AIA puro em água destilada), sendo a coloração rosa indicativo de produção do hormônio vegetal (Figura 5). Como controle positivo para a produção de AIA utilizou-se a bactéria *E. coli* linhagens DH5A. As análises foram realizadas com 3 repetições por isolados, sendo cada repetição constituída por 3 triplicadas.

Figura 5 - Concentrações de Ácido-Indol Acético ($\mu\text{g/mL}$ de AIA puro em água destilada) para leitura da curva padrão no espectrofotômetro com absorvância de 530 nm

4.5.4.2 Fixação biológica de nitrogênio dos isolados

Para a detecção de fixação de nitrogênio pelas bactérias manifestadas durante o cultivo *in vitro* de clones de *E. benthamii*, realizou-se a metodologia descrita por Araújo et al. (2010), mantendo as bactérias incubadas a 28°C por 72 horas em tubos de ensaio (20 x 70 mm), com 10 mL de meio de Nfb semi-sólido, isento de nitrogênio (BODDEY et al., 1995). Foram realizadas 3 repetições por isolado, onde a formação de uma película de crescimento no meio de cultura indicou a capacidade de fixar nitrogênio.

4.5.5 Estabelecimento da curva de crescimento bacteriano e determinação das Unidades Formadoras de Colônias

A Figura 6 representa um esquema resumido do procedimento metodológico utilizado para estabelecimento da curva de crescimento e determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Figura 6 - Representação esquemática da sequência metodológica utilizada para o estabelecimento da curva de crescimento e determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)
Fonte: Adaptado de Assis (2007)

4.5.5.1 Preparação do pré-inóculo e inóculo

Para obtenção do pré-inóculo, uma colônia isolada de cada isolado bacteriano foi semeada, separadamente, em 10 mL de meio cultura TSB (*Tryptic Soy Broth*) líquido e mantida em temperatura ambiente 37°C por 24 horas. Em seguida, preparou-se o inóculo com 500 µL de cada cultura, separadamente, os quais foram semeados novamente em 50 mL de meio de cultura TSB e mantidos a 37°C, para obtenção da cultura bacteriana fisiologicamente ativada (Figura 6).

4.5.5.2 Curva de crescimento e determinação das Unidades Formadora de colônias (UFC) dos isolados bacterianos

Para determinação da curva de crescimento dos isolados, a quantificação das Unidades Formadoras de Colônias foi estimada por meio da avaliação da densidade óptica, com comprimento de onda de 600 nm, e posterior contagem em placas, conhecida como *pour plate* (TORTORA, 2005).

Duas horas após a semeadura no meio correspondente ao inóculo (4.5.5.1), foi retirado 1 mL de cada bactéria isolada para aferir a massa celular em espectrofotômetro. Esta etapa foi repetida sucessivamente, em intervalos de duas horas, ao longo das 48 horas de incubação, a 37 °C. Um frasco contendo meio TSA estéril foi utilizado durante o experimento para zerar o espectrofotômetro nos momentos de avaliação da densidade óptica (absorbância).

Para obtenção da curva do número de células viáveis por mL de meio de cultura foram retirados 100 µL de inóculo de cada isolado (4.5.5.1), e realizadas diluições seriadas em solução salina a 0,9% (10^{-1} a 10^{-6}), sendo posteriormente as diluições quantificadas, aplicadas sobre a superfície de uma placa de petri contendo meio TSA, e, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, essas foram disseminadas no meio. Esta etapa foi repetida sucessivamente, a cada quatro horas, ao longo das 48 horas de incubação em meio TSA, a 37 °C.

As colônias bacterianas quantificadas foram expressas em UFC.mL⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata e o limite de detecção do método de contagem foi de 30 a 300 UFC.mL⁻¹.

4.6 Bacterização *in vitro* dos isolados em diferentes espécies de eucaliptos

Os isolados que apresentaram melhores resultados em relação à produção de AIA e fixação de nitrogênio (item 4.5.4.1 e 4.5.4.2) foram inoculados em microcepas de *E. cloeziana* (clone 3), bem como em microcepas de outro clone de *E. benthamii* (doravante denominado clone 7), ambos mantidos *in vitro* por doze meses, sendo assim considerados estabelecidos e sem a presença de manifestação bacteriana.

Com o conhecimento prévio do tempo de crescimento, bem como, da UFC de cada isolado bacteriano (4.5.5.2), utilizou-se 100 $\mu\text{L} \cdot \text{microcepa}^{-1}$ do inóculo (4.5.5.1), padronizando-se assim a utilização de aproximadamente $6 \times 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{microcepa}^{-1}$, de diferentes espécies de bactérias endofíticas previamente isoladas e caracterizadas dos clones de *E. benthamii* (4.5.3).

4.7 Análises estatísticas

Os dados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Bartlett ($P < 0,05$) para verificar a homogeneidade de variâncias e ao teste de Shapiro-Wilks ($P < 0,05$) para verificar a normalidade dos resíduos. Foi realizada análise de variância (ANOVA, $P < 0,05$ e $P < 0,01$) e as médias foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para as características em que houve a necessidade de transformação dos dados, esta foi feita usando a função *box-cox* do pacote MASS no software R. Os dados de massa seca, número de brotações, número de brotações alongadas e teor de nitrogênio em microcepas no meio para multiplicação e alongamento foram transformados com $n^{0,5}$, $(n+1)^{0,22}$, $(n+1)^1$ e $n^{0,5}$, respectivamente, onde n representa cada observação. Para as demais características não foi necessário fazer a transformação dos dados. A determinação das curvas de regressão de crescimento das bactérias medidas pela Densidade Ótica (DO) e curvas de regressão das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), foram obtidas pelos melhores ajustes indicados pelo Critério de Informação de Akaike (AIC), a partir do qual as fórmulas foram obtidas. Usando o software *Maxima*, ambas as equações foram integradas, para estimar a relação entre DO e UFC de cada bactéria. Todas as análises foram feitas no R software, versão 2.15.1.

5 RESULTADOS

Tendo como foco a avaliação da interação entre as microcepas de *E. benthamii* e a microbiota bacteriana manifestada em meio de cultivo, são descritos abaixo os resultados obtidos a partir de uma série de experimentos sequenciais, visando compreender o impacto da presença desses microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas.

5.1 Análises das microcepas de *E. benthamii*

5.1.1 Desenvolvimento dos clones na presença e ausência de manifestações endofíticas nas diferentes etapas da micropropagação

As microcepas de quatro clones de *Eucalyptus benthamii* (BP101, BP115, BP118, BP120) foram inicialmente caracterizadas quanto à ausência (SM) e presença de manifestações endofíticas, sendo que, uma vez observada a ocorrência das colônias, estas foram classificadas morfológicamente usando a coloração para sua identificação inicial. Assim, visualmente dois tipos foram considerados, aos quais foram atribuídos os nomes de manifestação de colônias amarelas (MCA) e manifestação de colônias brancas (MCB). O aspecto geral das microcepas de *E. benthamii*, sob a presença ou ausência de manifestações microbianas é apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Microcepas de *E. benthamii* em diferentes condições *in vitro*: **A)** Sem Manifestação bacteriana endofítica (SM); **B)** Sob Manifestação de Colônias Amarelas (MCA); **C)** Sob Manifestação de Colônias Brancas (MCB)

5.1.1.1 Etapa de multiplicação das microcepas

Após 30 dias de cultivo em meio para multiplicação, todas as microcepas de *E. benthamii* apresentaram-se sadias e sem oxidação (Figura 8). Assim, a partir destes experimentos, foram coletados os dados relativos ao desenvolvimento das microcepas, para realização das análises que seguem na sequência.

Figura 8 - Clones de *E. benthamii* em meio para multiplicação na presença e ausência de manifestação endofítica. **A-C)** Clone BP 101: sem manifestação (**A**), manifestação de colônias brancas (**B**) e manifestação de colônias amarelas (**C**). **D-F)** Clone BP 115: sem manifestação (**D**), manifestação de colônias brancas (**E**) e manifestação de colônias amarelas (**F**). **G-I)** Clone BP118: sem manifestação (**G**), manifestação de colônias brancas (**H**) e manifestação de colônias amarelas (**I**). **J-L)** Clone BP120: sem manifestação (**J**), manifestação de colônias brancas (**K**) e manifestação de colônias amarelas (**L**)

Inicialmente, foi avaliada a taxa de crescimento das microcepas por meio do incremento em massa seca e do número de brotações dos diferentes clones de *E. benthamii* (Tabela 1). Por meio da Análise de Variância (ANOVA), foi possível observar que os próprios clones apresentam um potencial de desenvolvimento diferenciado em ambos os parâmetros analisados. De forma complementar, também constatou-se que houve efeitos significativos na massa seca e número de brotações dos clones, na presença de manifestações endofíticas. Além disso, foi detectada a interação significativa entre os tipos de manifestação e clones, para ambas as características, de modo que cada clone responde de forma diferente a cada tipo de manifestação (Tabela 1).

Nessa etapa da micropropagação não se observou o alongamento das brotações, e somente em um número reduzido de microcepas, observou-se a presença de uma a duas raízes de pequeno tamanho, tanto na presença quanto na ausência de manifestações.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o incremento em massa seca e número de brotações das microcepas de *E. benthamii* durante a etapa de multiplicação *in vitro*

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios de Incremento	
		Massa seca/microcepas (mg.microcepa ⁻¹)	Número de Brotações (brotações.microcepas ⁻¹)
Clones	3	1295,62 **	85,35**
Manifestações	2	2534,71**	572,02**
Clones*Manifestações	6	367,62**	144,27**
Resíduo	36	14,62	3,53
CV(%)	-	6,57	7,66

* e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente

Uma vez verificadas as diferenças significativas para os parâmetros analisados, realizou-se a comparação entre as médias, considerando a análise de ambos os fatores estudados. Na Figura 9A, é possível notar as diferenças no potencial de crescimento entre os quatro clones, sendo que cada um deles apresentou uma taxa de crescimento diferente dos demais, na ausência de manifestações endofíticas (SM). Contudo, houve um padrão aproximado de resposta a estas manifestações, pois foi constatada a tendência no aumento da massa seca das microcepas na presença de manifestação de colônias amarelas (MCA) e manifestação de colônias brancas (MCB) (Figura 9A).

Resultados semelhantes foram observados no número de brotações entre os clones e sob a presença de MCA e MCB (Figura 9B). Novamente, os próprios clones apresentaram diferenças significativas no número de brotações, na ausência de manifestações microbianas. Por outro lado, nas microcepas dos clones BP115 e BP120, o número de brotações aumentou significativamente na presença de MCB, cujo valor quase dobrou. Em relação aos outros dois clones em ambos os tipos de manifestação, o impacto no número de brotações aparentemente não houve diferença significativa.

Com base nos resultados observados no acúmulo de massa seca e número de brotações nos tratamentos combinando diferentes clones e tipos de manifestação endofítica, foi possível notar que, de forma geral, a presença destes microrganismos não chegou a prejudicar o desenvolvimento das microcepas.

Figura 9 - Representação gráfica dos valores médios do incremento em: **A)** Massa seca e **B)** Número de brotações por microcepas de clones de *Eucalyptus benthamii* aos 30 dias de cultivo na etapa de multiplicação. (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro)

5.1.1.2 Etapa de alongamento das microcepas

Durante a etapa de alongamento, as microcepas de *E. benthamii*, assim como na etapa de multiplicação, apresentaram desenvolvimento satisfatório e vigor, evidenciando também diferenças quanto ao comportamento de cada clone no que se refere ao incremento em massa seca, em número de brotações, bem como no número de brotações alongadas e enraizamento das microcepas (Figura 10).

De forma similar ao que foi observado na etapa de multiplicação, constatou-se que existem diferenças entre os próprios clones e também diferenças entre a presença das diferentes manifestações microbianas, no que se refere ao incremento em massa seca e número de brotações. Além disso, o efeito da interação entre estes fatores (clones e manifestações) também foi significativo, mostrando que cada clone responde de forma diferente a cada tipo de manifestação em ambas às características estudadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o incremento em massa seca e número de brotações das microcepas de *E. benthamii* durante a etapa de alongamento *in vitro*

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios de Incremento	
		Massa seca/microcepas (mg.microcepa ⁻¹)	Número de Brotações (brotações.microcepas ⁻¹)
Clones	3	234,34**	16,68**
Manifestações	2	906,15**	70,40**
Clones*Manifestações	6	279,64**	23,88**
Resíduo	36	10,90	2,38
CV(%)	-	12,28	27,10

* e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente

Figura 10 - Clones de *E. benthamii* meio para alongamento na presença e ausência de manifestação endofítica. **A-C)** Clone BP 101: sem manifestação (**A**), manifestação de colônias brancas (**B**) e manifestação de colônias amarelas (**C**). **D-F)** Clone BP 115: sem manifestação (**D**), manifestação de colônias brancas (**E**) e manifestação de colônias amarelas (**F**). **G-I)** Clone BP 118: sem manifestação (**G**), manifestação de colônias brancas (**H**) e manifestação de colônias amarelas (**I**). **J-L)** Clone BP 120: sem manifestação (**J**), manifestação de colônias brancas (**K**) e manifestação de colônias amarelas (**L**). Setas em vermelho indicando as brotações alongadas

Constatadas as diferenças significativas para os fatores estudados, realizou-se a comparação entre as médias destes, considerando a análise fatorial. De forma geral, foi possível observar um efeito positivo ou neutro da MCB e da MCA sobre o incremento na massa seca dos clones estudados (Figura 11A), não havendo uma resposta padrão dos clones em relação à presença das manifestações, o que foi constatada pela interação significativa obtida na ANOVA (Tabela 3). Novamente, convém salientar que os clones apresentam diferenças nas taxas de crescimento, sendo o efeito de cada tipo de manifestação específico da interação com cada clone.

Figura 11 - Representação gráfica dos valores médios do incremento em: **A)** Massa seca e **B)** Número de brotações por microcepa de clones de *Eucalyptus benthamii* aos 30 dias de cultivo na etapa de alongamento. (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro)

No que diz respeito ao incremento no número de brotações durante o processo de alongamento, os clones BP118 e BP120 foram os que apresentaram diferenças mais expressivas na presença da MCB em relação aos demais tratamentos (Figura 11B). Além disso, um pequeno aumento no número de brotações foi observado na presença da MCB no clone BP101 e uma redução significativa das brotações no clone BP120, sob MCA, havendo assim, especificidade na resposta de cada clone com cada manifestação.

No meio de cultura isento de fitorreguladores foi constatado, além do alongamento das brotações, um alto índice de enraizamento das microcepas, eventos que ocorreram independentemente da presença ou ausência de manifestações endofíticas (Figura 12).

Figura 12 - Microcepa de *E. benthamii* cultivada em meio para alongamento evidenciando o desenvolvimento de brotação alongada e raízes

Por meio da ANOVA foram constadas diferenças relativas ao tipo de manifestação e em relação aos clones no alongamento das brotações, bem como na interação entre estes fatores, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o número de brotações alongadas ($\geq 1,5$ cm) das microcepas de *E. benthamii* durante a etapa de alongamento

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios de Incremento	
		Número de brotações alongadas.microcepa ⁻¹	
Clones	3	1,52**	
Manifestações	2	1,29**	
Clones*Manifestações	6	0,17**	
Resíduo	24	0,01	
CV(%)	-	7,87	

* e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente

Em sequência à ANOVA, procedeu-se o teste de comparação de médias, onde novamente ficam evidentes as diferenças entre os próprios clones, em relação ao número de brotações alongadas. Por outro lado, observa-se que para esta característica a manifestação de colônias brancas (MCB) apresentou melhores resultados quando comparadas a manifestação de colônias amarelas (MCA), a qual chegou a gerar um impacto negativo no clone BP101, interagindo de forma neutra nos clones BP118 e BP120 (Figura 13).

Figura 13 - Representação gráfica dos valores médios no número de brotações alongadas (brotações $\geq 1,5$ cm) de clones de *Eucalyptus benthamii* aos 30 dias de cultivo, na etapa de alongamento *in vitro*. (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro)

Quanto ao percentual de enraizamento *in vitro* das microcepas, também foram identificadas diferenças entre os clones e entre os tipos de manifestação endofítica, bem como na interação entre ambos os fatores (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o percentual de enraizamento das microcepas de *E. benthamii* durante a etapa de alongamento *in vitro*

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios
		Percentual de Enraizamento (%)
Clones	3	826,68**
Manifestações	2	1874,97**
Clones*Manifestações	6	654,99**
Resíduo	24	7,91
CV (%)	-	9,78

* e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente

O teste de comparação de médias mostrou que os percentuais de enraizamento foram diferentes entre clones combinados com os respectivos tipos de manifestação endofítica. Para o clone BP118 o maior percentual de enraizamento foi obtido na ausência de manifestação microbiana (SM), enquanto que, para os clones BP101, BP115 e BP120, a manifestação de colônias brancas (MCB) foi a mais favorável. De forma geral, os clones sob manifestação de colônias amarelas (MCA) apresentaram resultados inferiores em relação às taxas de enraizamento quando comparados a ausência e MCB. Embora cada clone tenha respondido diferentemente a cada tipo de manifestação, nota-se que há uma tendência de maiores taxas de enraizamento dos clones sob a MCB (Tabela 5).

Tabela 5 - Média dos percentuais de enraizamento *in vitro* de microcepas de clones de *Eucalyptus benthamii* aos 30 dias de cultivo em meio para alongamento

Clones	Médias dos percentuais de enraizamento <i>in vitro</i>		
	SM	MCB	MCA
BP101	15,87 Bb	59,05 Aa	11,27 Cb
BP115	6,83 Cb	34,12 Ca	9,05 Cb
BP118	50,00 Aa	31,74 Cc	38,57 Ab
BP120	15,87 Bc	47,78 Ba	24,92 Bb

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que as médias dos tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que as médias dos tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

5.1.1.3 Etapa de aclimatização das microestacas

Após o alongamento *in vitro* das brotações, as microestacas de *E. benthamii* (Figura 14A), foram retiradas do meio de cultivo e transferidas para ambiente *ex vitro*, onde foram colocadas em substrato comercial próprio para produção de mudas (Figura 14B-C). É importante ressaltar que nesta etapa, as brotações alongadas *in vitro*, com aproximadamente 1,5 cm, receberam a denominação de microestacas, como forma de padronização da nomenclatura no presente trabalho.

Figura 14 - Clones de *E. benthamii* durante o processo de alongamento e aclimatização: **A)** Microcepa cultivada em meio para alongamento evidenciando brotações alongadas (setas vermelhas) e raiz (seta azul); **B)** Detalhe microestaca coletada *in vitro*; **C)** Microestacas no início do processo de aclimatização; **D-F)** Detalhe microestacas após 30 dias de aclimatização, evidenciando desenvolvimento adequado da parte aérea e radicular

Após trinta dias, correspondentes ao período de aclimatização, verificou-se que as microestacas apresentaram desenvolvimento adequado, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular, apresentando raízes adventícias vigorosas e formação de raízes secundárias (Figura 13D-F) em todos os tratamentos, tanto na presença quanto na ausência de manifestação endofítica.

A análise do percentual de sobrevivência das microestacas durante a etapa de aclimatização evidenciou diferenças entre os clones e entre os tipos de manifestação endofítica, bem como na interação entre ambos os fatores (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o percentual de sobrevivência (microestacas enraizadas) de *E.benthamii* após 30 dias de aclimatização

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios
		Percentual de Sobrevivência (%)
Clones	3	1075,43**
Manifestações	2	80,42*
Clones*Manifestações	6	391,23**
Resíduo	24	19,83
CV(%)	-	5,04

* e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente

As microestacas dos respectivos clones apresentaram certa particularidade em seu estabelecimento no ambiente *ex vitro*, assim como verificado durante o cultivo *in vitro*. O clone BP118, apresentou um acréscimo no percentual de sobrevivência das microestacas *ex vitro* quando cultivado *in vitro* na presença da MCA. De forma contrastante, as microestacas do clone BP115 provenientes de plantas que cresceram sob a MCA *in vitro*, apresentaram menor índice de sobrevivência quando cultivados *ex vitro* (Tabela 7). Foi também observado que no caso do clone BP120, houve 100% de sobrevivência das microestacas, independente da ocorrência ou não de manifestações endofíticas.

O percentual de enraizamento das microestacas também foi avaliado, contudo, todas as plantas que sobreviveram apresentaram enraizamento, não havendo diferenças entre clones e tipos de manifestações para essa característica.

Tabela 7 - Percentual de sobrevivência (microestacas enraizadas) de clones de *Eucalyptus benthamii* após 30 dias de aclimatização

Clones	Percentual de sobrevivência (%)		
	SM	MCB	MCA
BP 101	69,84 Cb	80,16 Ba	80,16 Ba
BP 115	100,00 Aa	100,00 Aa	84,92 Bb
BP 118	80,16 Bb	65,08 Cc	100,00 Aa
BP 120	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que as médias dos tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que as médias dos tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

5.1.2 Anatomia dos clones na presença e ausência de manifestações endofíticas

Por meio da utilização da técnica de microscopia de luz, foi possível observar que estruturalmente as folhas de *E. benthamii* tanto na presença quanto na ausência de manifestação de colônias bacterianas, apresentaram anatomicamente as mesmas características, com epiderme uniestratificada em ambas as faces (abaxial e adaxial) e fina camada de cutícula (Figura 15A).

O mesofilo dorsiventral, constituído de um ou dois estratos celulares de parênquima clorofiliano paliçádico e de três a cinco estratos celulares de parênquima clorofiliano lacunoso. Todas as folhas analisadas apresentam feixes vasculares colaterais de médio e de pequeno porte entre os parênquimas paliçádico e lacunoso, bem como também foram observadas glândulas secretoras situadas mais próximas à face abaxial do limbo foliar (Figura 15B).

Figura 15 - Fotomicrografia do limbo foliar de microplantas de *E. benthamii* evidenciando; **A)** Mesofilo dorsiventral e glândula secretora; **B)** Detalhe da nervura central. Legenda: Epiderme adaxial (Ep. ad.), epiderme abaxial (Ep. ab.), estômato (Es), parênquima paliçádico (PP), parênquima lacunoso (PL), glândula secretora (GS), feixes vascular (FV). Barras = 100 µm

Testes histoquímicos evidenciaram reação negativa tanto para amidos, quanto para proteínas nas folhas dos clones analisados, em todos os tipos de manifestações e em ambas as etapas, multiplicação e alongamento (Quadro 2), apresentando reação positiva somente para compostos fenólicos, os quais foram observados em maior quantidade nas glândulas secretoras (Figura 15).

Clones	Etapas da micropropagação	Manifestações endofíticas	Amido	Proteína	Compostos fenólicos
BP101	Multiplicação	SM	-	-	-
		MCB	-	-	+
		MCA	-	-	+
	Alongamento	SM	-	-	+
		MCB	-	-	+
		MCA	-	-	+
BP115	Multiplicação	SM	-	-	-
		MCB	-	-	++
		MCA	-	-	++
	Alongamento	SM	-	-	+
		MCB	-	-	+
		MCA	-	-	++
BP118	Multiplicação	SM	-	-	-
		MCB	-	-	+
		MCA	-	-	++
	Alongamento	SM	-	-	+
		MCB	-	-	++
		MCA	-	-	+
BP120	Multiplicação	SM	-	-	-
		MCB	-	-	++
		MCA	-	-	+++
	Alongamento	SM	-	-	++
		MCB	-	-	+++
		MCA	-	-	++

Quadro 2 - Testes histoquímicos em folhas de clones de *E. benthamii* na presença e ausência de manifestações endofíticas nas diferentes etapas do cultivo *in vitro* (multiplicação e alongamento). Nota: As abreviaturas significam: SM (sem manifestação endofítica); MCB (manifestação de colônias brancas); MCA (manifestação de colônias amarelas) e, os sinais (+) ou (-) representam respectivamente, reação positiva ou negativa ao reagente e, quantitativamente as substâncias foram classificadas em pouco (+), moderadamente (++) ou intensamente presente (+++), de acordo com a intensidade das respostas aos testes aplicados

Conforme observado no Quadro 2, os clones apresentaram respostas à presença de compostos fenólicos inerentes a cada etapa da micropropagação, bem como aos tipos de manifestações. Na etapa da micropropagação referente à multiplicação, somente as folhas das microcepas mantidas sob ambas as manifestações endofíticas apresentaram resultados positivos ao reagente, indicando a presença de compostos fenólicos (Figura 16A-B), enquanto que nas microcepas dos clones sem manifestação endofítica, não se constatou a ocorrência desse composto (Figura 16C-D).

Figura 16 - Fotomicrografia de folhas de clones de *E. benthamii* na presença e ausência de manifestações endofíticas durante a etapa de multiplicação. **A-B)** Clones sob manifestação de colônias amarelas e brancas (MCA e MCB, respectivamente), apresentando compostos fenólicos (setas vermelhas), principalmente nas glândulas secretoras; **C-D)** Clones cultivados sem manifestações endofíticas, não evidenciando reação positiva a compostos fenólicos. Legenda: epiderme adaxial (Ep. ad.); epiderme abaxial (Ep. ab.); estômato (Es); parênquima paliádico (PP); parênquima lacunoso (PL); glândula secretora (GS); feixes vascular. Barras = 50 µm

De forma similar, obteve-se reação positiva a compostos fenólicos na etapa referente ao alongamento. No entanto, todas as microplantas evidenciaram conteúdo fenólico nas folhas independentemente da presença ou não de manifestação endofítica, e assim como na etapa de multiplicação, aparentemente com diferentes intensidades (Quadro 2 e Figura 17).

Figura 17 - Fotomicrografias de folhas de clones de *E. benthamii*, evidenciando a classificação por atribuição de notas conforme a intensidade de ocorrência de compostos fenólicos. **A)** Reação negativa (-); **B)** Baixa intensidade (+); **C)** Média intensidade (++) e **D)** Alta intensidade (+++). Legenda: Epiderme adaxial (Ep. ad.); epiderme abaxial (Ep. ab.); estômato (Es); parênquima paliádico (PP); parênquima lacunoso (PL); glândula secretora (GS); feixes vascular (FV). Barras = 50 µm

Também utilizando-se da técnica de microscopia de luz, observou-se que a anatomia radicular dos clones de *E. benthamii* não apresentou diferenças estruturais, nas diferentes etapas de micropropagação, na presença e/ou na ausência de manifestações endofíticas, evidenciando assim, em corte transversal, epidermes com paredes finas e uniestratificadas; exoderme também uniestratificada; córtex constituído de parênquima, com células isodiamétricas arranjadas com amplos espaços intercelulares e endoderme uniestratificada (Figura 18A).

Em todos os tratamentos o cilindro vascular apresentou-se constituído de periciclo com duas canadas de células, protoxilema pentarco onde polos de protoxilema, em geral apresentaram-se acompanhados por fibras, alternados com cordões de floema (Figura 18B).

Figura 18 - Fotomicrografia de raízes de microplantas de *E. benthamii*: **A)** Corte transversal radicular evidenciando epiderme uniestratificada (Ep), endoderme (En), córtex (Cox), exoderme (Ex), periciclo (P) e cilindro vascular (CV); **B)** Detalhe do cilindro vascular tetraarco evidenciando o xilema (X) e floema (F) alternos, endoderme (En) e periciclo (P). Barras = 100 µm

Resultados similares aos dos limbos foliares foram constatados, nas raízes dos clones de *E. benthamii*, onde, independentemente da etapa da micropropagação, as raízes de todos os clones, cultivados tanto na presença quanto ausência de manifestações endofíticas, apresentaram resultados negativos em relação a presença de amido e proteínas (Quadro 3).

Clones	Etapas da micropropagação	Manifestações endofíticas	Amido	Proteína	Compostos fenólicos
BP101	Multiplicação	SM	-	-	-
		MCB	-	-	+++
		MCA	-	-	++
	Alongamento	SM	-	-	+
		MCB	-	-	++
		MCA	-	-	+++
BP115	Multiplicação	SM	-	-	-
		MCB	-	-	+++
		MCA	-	-	++
	Alongamento	SM	-	-	+
		MCB	-	-	+
		MCA	-	-	++
BP118	Multiplicação	SM	-	-	-
		MCB	-	-	+++
		MCA	-	-	++
	Alongamento	SM	-	-	+
		MCB	-	-	++
		MCA	-	-	++
BP120	Multiplicação	SM	-	-	-
		MCB	-	-	+++
		MCA	-	-	++
	Alongamento	SM	-	-	++
		MCB	-	-	+++
		MCA	-	-	++

Quadro 3 - Testes histoquímicos em raízes de clones de *E. benthamii* na presença e ausência de manifestações endofíticas nas diferentes etapas do cultivo *in vitro* (multiplicação e alongamento). Nota: As abreviaturas significam: SM (sem manifestação endofítica); MCB (manifestação de colônias brancas); MCA (manifestação de colônias amarelas) e, os sinais (+) ou (-) representam respectivamente, reação positiva ou negativa ao reagente e, quantitativamente as substâncias foram classificadas em pouco (+), moderadamente (++) ou intensamente presente (+++), de acordo com a intensidade das respostas aos testes aplicados

Em relação aos compostos fenólicos, o mesmo padrão de resposta das folhas foi observado nas raízes, onde na etapa de multiplicação, somente as raízes das microcepas sob manifestação de bactérias endofíticas apresentaram compostos fenólicos, principalmente no cilindro vascular (Figura 19).

Figura 19 - Fotomicrografia de raízes de clones de *E. benthamii* na presença e ausência de manifestações endofíticas, durante a etapa de multiplicação. **A-B)** Clones sob manifestação de colônias amarelas e brancas (MCA e MCB, respectivamente), apresentando compostos fenólicos (setas vermelhas), principalmente no cilindro vascular; **C-D)** Clones cultivados sem manifestações endofíticas, não evidenciando reação positiva a compostos fenólicos. Legenda: epiderme (Ep); endoderme (En); córtex (Co); exoderme (Ex); periciclo (P); xilema (X); floema (F) e cilindro vascular (CV). Barras = 50 µm

Na etapa correspondente ao alongamento, nas raízes independentemente da presença de manifestação de colônias bacterianas constatou-se compostos fenólicos principalmente no cilindro vascular, em menor ou maior concentração, conforme pode se observar no Quadro 3 e na Figura 20.

Figura 20 - Fotomicrografias de raízes de clones de *E. benthamii*, evidenciando a classificação por atribuição de notas conforme a intensidade de ocorrência de compostos fenólicos. **A)** Reação negativa (-); **B)** Baixa intensidade (+); **C)** Média intensidade (++) e **D)** Alta intensidade (+++). Legenda: epiderme (Ep); endoderme (En); córtex (Co); exoderme (Ex); periciclo (P); xilema (X); floema (F) e cilindro vascular (CV). Barras = 100 µm

5.1.3 Produção de malondialdeído (MDA) pelos clones de *E. benthamii* na presença e ausência de manifestação endofítica

Por meio da ANOVA foi possível observar que somente houve efeito significativo nas concentrações de MDA em virtude das manifestações endofíticas, tanto da microcepas que estavam no meio para multiplicação quanto das mantidas em meio para alongamento (Tabela 8). Em nenhum dos dois casos constatou-se efeito de interação entre clones e tipos de manifestação, havendo assim uma resposta padrão dos clones em relação aos tipos de manifestação.

Tabela 8 - Resumo da análise de variância da quantificação de malondialdeído (MDA) em microcepas de *Eucalyptus benthamii* cultivados *in vitro* em função do clone e da manifestação endofítica em 30 dias de cultivo *in vitro* nas etapas de multiplicação e alongamento

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios	
		MDA (Meio para multiplicação) (nM de MDA/g matéria fresca)	MDA (Meio para alongamento) (nM de MDA/g matéria fresca)
Clones	3	0,001904 ^{ns}	0,005193 ^{ns}
Manifestações	2	0,057032**	0,064221**
Clones*Manifestações	6	0,010143 ^{ns}	0,002105 ^{ns}
Resíduo	24	0,004445	0,001730
CV (%)	-	16,89	5,61

^{ns} não significativo; * e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente

A concentração de MDA foi um pouco menor nas plantas em todos os clones que cresceram sob a MCB e MCA, durante a multiplicação (Figura 21A). Na etapa de alongamento, resultados contrastantes foram observados, uma vez que, as microcepas que mostraram maior produção de MDA foram àquelas mantidas sob a MCB e MCA (Figura 21B). A principal diferença no acúmulo de MDA ocorreu em relação à MCB, a qual proporcionou leve redução no nível de estresse oxidativo dos clones na etapa de multiplicação, levando a um pequeno aumento nos níveis de estresse oxidativo na etapa de alongamento (Figura 21).

Figura 21 - Representação gráfica dos valores médios da produção de malondialdeído (MDA) em microcepas de *Eucalyptus benthamii* em função do meio de cultura. **A)** Meio de cultura para multiplicação; **B)** Meio de cultura para alongamento. (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro)

5.1.4 Teor de nitrogênio nas microcepas na presença e ausência de manifestação endofítica

A análise do teor de nitrogênio nas microcepas revelou algumas diferenças significativas entre clones e também entre os tipos de manifestação na etapa de multiplicação. Contudo, não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos dois fatores estudados na etapa de alongamento. Tanto na multiplicação quanto no alongamento, não foi detectada interação entre os fatores (Tabela 9).

Tabela 9 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para o teor de nitrogênio em microcepas de *Eucalyptus benthamii* cultivados *in vitro* em meio para multiplicação e alongamento em função do clone e da manifestação endofítica após 30 dias de cultivo *in vitro*

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios	
		Nitrogênio Orgânico (g kg ⁻¹) (Meio para multiplicação)	Nitrogênio Orgânico (g kg ⁻¹) (Meio para alongamento)
Clones	3	71,04 **	38,93 ^{ns}
Manifestações	2	36,25 *	23,55 ^{ns}
Clones*Manifestações	6	3,86 ^{ns}	30,72 ^{ns}
Resíduo	22	9,79	30,72 ^{ns}
CV(%)		9,31	12,62

^{ns} não significativo; * e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente

Na etapa referente a multiplicação *in vitro*, somente os clones BP115 e BP118 apresentaram teores de nitrogênio levemente maior que o clone BP120. O clone BP101 acabou apresentando diferenças não significativas entre os demais para essa característica. Em relação aos tipos de manifestação, observou-se que a presença de MCB proporcionou uma pequena redução nos teores de nitrogênio em comparação às microplantas onde não houve manifestação de microrganismos (SM). A MCA não apresentou diferenças significativas quando comparadas com SM e MCB (Figura 22A).

Na etapa de alongamento, não houve diferenças significativas quanto ao teor de nitrogênio das microcepas de todos os clones independentemente da presença ou não de manifestação de colônias bacterianas (Figura 22B).

Figura 22 - Representação gráfica dos valores médios do teor de nitrogênio nas microcepas de *Eucalyptus benthamii* em função do meio de cultura. **A)** Meio de cultura para multiplicação; **B)** Meio de cultura para alongamento (Letras maiúsculas diferentes entre os clones indicam médias diferentes entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes dentro de um mesmo clone indicam médias diferentes entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro)

5.2 Avaliações das colônias bacterianas manifestadas

5.2.1 Isolamento e cultivo da microbiota manifestada

Como mencionado às colônias bacterianas manifestadas próximas às microcepas de *E. benthamii* foram classificadas, *a priori*, de maneira visual, recebendo os nomes de manifestação de colônias amarelas (MCA) e manifestação de colônias brancas (MCB) (Figuras 23A e 23B).

Após cinco dias de cultivo em meio TSA, correspondente a primeira etapa do isolamento das colônias, observou-se que tanto as placas oriundas da MCA, quanto às placas correspondentes à MCB, apresentaram de duas a três colônias bacterianas, distintas morfologicamente pela coloração em: amarelo claro, branco e amarelo escuro (Figura 23C-D).

Figura 23 - Representação esquemática das manifestações bacterianas nas microcepas de *E. benthamii*, evidenciando: **A)** Manifestação de colônias amarelas; **B)** Manifestação de colônias brancas; **C)** Isolamento das manifestações bacterianas pelo método de Estrias de Esgotamento em meio TSA; **D)** Detalhe dos três tipos de isolados obtidos: isolado amarelo claro, branco e amarelo escuro

Para melhor compreensão foi estabelecida a nomenclatura descrita no Quadro 4 para identificação dos isolados.

Clone BP101			Clone BP115		
Tipo de colônias manifestadas	Tipo de isolados	Identificação	Tipo de colônias manifestadas	Tipo de isolados	Identificação
MCA	amarelo claro	Bac101A1	MCA	amarelo claro	Bac115A1
	branco	Bac101A2		branco	Bac115A2
	amarelo escuro	Bac101A3		amarelo escuro	Bac115A3
MCB	amarelo claro	Bac101B1	MCB	amarelo claro	Bac115B1
	branco	Bac101B2		branco	Bac115B2
	amarelo escuro	Bac101B3		amarelo escuro	Bac115B3

Clone BP118			Clone BP120		
Tipo de colônias manifestadas	Tipo de isolados	Identificação	Tipo de colônias manifestadas	Tipo de isolados	Identificação
MCA	amarelo claro	Bac118A1	MCA	amarelo claro	Bac120A1
	branco	Bac118A2		branco	Bac120A2
	amarelo escuro	----		amarelo escuro	----
MCB	amarelo claro	Bac118B1	MCB	amarelo claro	Bac120B1
	branco	Bac118B2		branco	Bac120B2
	amarelo escuro	Bac118B3		amarelo escuro	Bac120B3

Quadro 4 - Representação esquemática da identificação dos vinte e dois isolados oriundos tanto das manifestações de colônias amarelas (MCA) quanto das manifestações de colônias brancas (MCB) nos respectivos clones de *E. benthamii*

5.2.2 Identificação dos isolados bacterianos por BOX-PCR

Utilizando a técnica de BOX-PCR, foi possível observar a divergência de perfis de bandas obtidos a partir da extração do DNA dos isolados provenientes dos dois tipos de colônias (MCA e MCB).

Por não apresentar fragmentos de amplificação, os isolados Bac101A2, Bac118B2, Bac115A2, Bac101B1, Bac115A3 e Bac120B2 foram apresentados em gel separado (Figura 24).

Por meio da identificação genotípica por BOX-PCR foi possível agrupar os perfis de bandas considerando-se a similaridade de 84% entre os perfis referentes aos isolados Bac115A1 e Bac115B1, e os isolados Bac120A2 e Bac118A1; com similaridade de 94% entre os isolados Bac101B3 e Bac120B, bem como entre os isolados Bac101A2 e Bac118B2; e com similaridade de 92% entre os isolados Bac101B1 e Bac115A. Dezesesseis dos isolados pertencentes a cada perfil de BOX-

PCR, indicados na Figura 24 pelas setas, foram submetidos à identificação filogenética, feita por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Figura 24 - Perfis de BOX-PCR dos isolados obtidos das colônias de bactérias manifestadas em meio de cultura próximas as microcepas de clones de *E. benthamii*. Os retângulos indicam quais isolados foram agrupados e as setas indicam quais isolados foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Correlação de Pearson (0% - 100%)

5.2.3 Identificação dos isolados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

A identificação dos dezesseis isolados obtidos resultou na determinação dos principais grupos filogenéticos presentes nas manifestações advindas dos respectivos clones estudados. O agrupamento de tais sequências com as pertencentes ao banco de dados GenBank revelou a afiliação principal dos isolados aos filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria, sendo dentro deste último, representadas as classes Betaproteobacteria e Alphaproteobacteria (Figura 25).

Figura 25 - Filogenia dos isolados das manifestações endofíticas de *E. benthamii*, baseada na sequência parcial do gene 16S DNAr, onde foram avaliadas a relação de similaridade sendo utilizado o grupo externo *Anabaena*, para o enraizamento da árvore filogenética

De maneira mais detalhada, aproximadamente seis gêneros bacterianos foram representados: *Curtobacterium* (Actinobacteria), *Bacillus* e *Aneurinibacillus* (Firmicutes), *Delftia* (Betaproteobacteria), *Bradyrhizobium*, e *Novosphingobium* (Alphaproteobacteria) (Figura 26).

Figura 26 - Isolados de bactérias endofíticas em meio de cultura TSA correspondentes aos gêneros: **A)** *Aneurinibacillus* sp.; **B)** *Bacillus* sp.; **C)** *Bradyrhizobium* sp.; **D)** *Curtobacterium* sp.; **E)** *Delftia* sp.; **F)** *Novosphingobium* sp.

No esquema representado no Quadro 5, onde cada cor refere-se a um determinado gênero de bactéria endofítica isolado dos respectivos clones, pode-se observar que dentre os isolados, o que mais se destacou foi o gênero *Curtobacterium*, sendo constatada sua presença em todos os clones analisados.

Clone BP101			Clone BP115		
Tipo de colônias manifestadas	Tipo de estirpes bacterianas	Identificação	Tipo de colônias manifestadas	Tipo de estirpes bacterianas	Identificação
MCA	amarelo claro	Bac101A1	MCA	amarelo claro	Bac115A1
	branco	Bac101A2		branco	Bac115A2
	amarelo escuro	Bac101A3		amarelo escuro	Bac115A3
MCB	amarelo claro	Bac101B1	MCB	amarelo claro	Bac115B1
	branco	Bac101B2		branco	Bac115B2
	amarelo escuro	Bac101B3		amarelo escuro	Bac115B3

Clone BP118			Clone BP120		
Tipo de colônias manifestadas	Tipo de estirpes bacterianas	Identificação	Tipo de colônias manifestadas	Tipo de estirpes bacterianas	Identificação
MCA	amarelo claro	Bac118A1	MCA	amarelo claro	Bac120A1
	branco	Bac118A2		branco	Bac120A2
	amarelo escuro	----		amarelo escuro	----
MCB	amarelo claro	Bac118B1	MCB	amarelo claro	Bac120B1
	branco	Bac118B2		branco	Bac120B2
	amarelo escuro	Bac118B3		amarelo escuro	Bac120B3

Aneurimibacillus
Bacillus
Bradyrhizobium
Curtobacterium
Delftia
Novosphingobium

Quadro 5 - Representação esquemática da distribuição dos gêneros bacterianos identificados dos vinte e dois isolados de manifestações dos tipos amarelos e brancos (MCA e MCB, respectivamente) em clones de *E. benthamii*. Cores iguais caracterizam semelhança genética entre as bactérias

5.2.4 Análises bioquímicas realizadas nos isolados bacterianos manifestados em microcepas de *E. benthamii*

5.2.4.1 Capacidade de produção de AIA

Após definição dos gêneros dos isolados manifestados nos respectivos clones, verificou-se a possível produção do hormônio vegetal Ácido-Indol-Acético (AIA) pelos referentes isolados. Para tanto, foi estabelecida uma curva padrão de AIA (Figura 27), utilizada para estimar a produção deste fitohormônio pelos dezesseis isolados indicados por setas na Figura 24, os quais foram previamente agrupados por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, utilizando-se o BOX-PCR (item 5.2.2).

Figura 27 - Leitura da curva padrão de AIA no espectrofotômetro com absorbância de 530 nm

A metodologia colorimétrica para identificação e quantificação da produção de AIA revelou que doze, dos dezesseis isolados bacterianos analisados, apresentaram a capacidade de produzir o hormônio vegetal Ácido-Indol-Acético (AIA), porém em diferentes proporções, conforme pode-se observar no Quadro 6.

As maiores concentrações de AIA foram produzidas pelos isolados Bac118B3 e Bac115B3 (*Novosphingobium* spp.); Bac101B1 e Bac101B3 (*Curtobacterium* spp.), e em menor proporção nos isolados Bac115A2 (*Aneurinibacillus* sp.) e Bac120A2 (*Delftia* sp.). Apenas quatro dos isolados não apresentaram a capacidade de

produzir o fitohormônio vegetal, sendo esses, o isolado Bac120B2 (*Aneurinibacillus* sp.), Bac101A2 (*Bacillus* sp.), Bac101B2 (*Curtobacterium* sp.) e Bac115B2 (*Bradyrhizobium* sp.).

Gêneros	Isolados	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Bac118B3	35,112 a
Bac115B3	19,252 ab
Bac101B1	8,772 abc
Bac101B3	7,472 bcd
Bac115A2	4,972 bcd
Bac101A3	4,792 bcd
Bac120B1	4,505 bcd
Bac118A1	3,852 bcd
Bac101A1	3,625 cd
Bac120A1	2,772 cd
Bac120A2	1,692 cd
Bac115A1	1,232 d
Bac120B2	0 e
Bac101A2	0 e
Bac101B2	0 e
Bac115B2	0 e

Aneurinibacillus *Bacillus* *Bradyrhizobium* *Curtobacterium* *Delftia* *Novosphingobium*

Quadro 6 - Produção do fitohormônio Ácido-Indol-Acético (AIA) por isolados bacterianos manifestados em microcepas de *E. benthamii*

Dessa forma, analisando o Quadro 5, o qual apresenta de forma esquemática a distribuição dos gêneros bacterianos isolados e identificados dos respectivos clones, verifica-se que dezesseis, dos vinte e dois isolados apresentaram a característica de produzir AIA.

5.2.4.2 Capacidade de fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos

Os resultados obtidos na análise para verificar a possível capacidade de fixação de nitrogênio dos dezesseis isolados bacterianos indicados pelas setas na Figura 24 (item 5.2.2), permite inferir que somente os isolados Bac101A2 (*Bacillus* sp.) e Bac120A2 (*Delftia* sp.) apresentaram a formação de uma película de crescimento no meio Nfb semi-sólido (Figura 28), a qual caracteriza a capacidade dos isolados de fixar biologicamente o nitrogênio.

Dessa forma, com base no agrupamento do BOX-PCR, verifica-se no Quadro 5 que apenas quatro dos vinte e dois gêneros bacterianos isolados e identificados dos respectivos clones, são fixadores de nitrogênio sendo esses os isolados Bac101A2 e Bac118B2 (*Bacillus* spp.), bem como os isolados Bac118A2 e Bac120A2 (*Delftia* spp.).

Figura 28 - Isolados de bacterianos em meio de cultura Nfb: **A)** Isolados Bac120A2 (*Delftia* sp.); **B)** Bac101A2 (*Bacillus* sp.); **C)** Detalhe da película de crescimento evidenciando a capacidade do isolado fixar nitrogênio (setas brancas)

5.2.5 Curva de crescimento e determinação das Unidades Formadoras de colônias (UFC) dos isolados bacterianos

Com base nos resultados obtidos nas análises de produção de AIA e fixação de nitrogênio, seis dos dezesseis isolados indicados por setas na Figura 24, foram submetidos a análises de crescimento para posteriormente serem inoculados nas microcepas de *E. benthamii* e *E. cloeziana* (Item 5.3).

Desta forma, analisou-se a cinética de crescimento dos isolados *Aneurinibacillus* sp. (Bac115A2), *Bacillus* sp. (Bac101A2), *Bradyrhizobium* sp. (Bac115B2), *Curtobacterium* sp. (Bac101B1), *Delftia* sp. (Bac120A2), *Novosphingobium* sp. (Bac118B3), os quais apresentaram melhores resultados nos testes anteriores (itens 5.2.4.1 e 5.2.4.2), cada um representando um gênero de bactéria isolada das manifestações endofíticas em microcepas de clones de *E. benthamii*.

Por meio dos valores de densidade óptica (DO) e do logaritmo na base 10 do número de células viáveis.mL⁻¹ correspondentes às unidades formadoras de colônias (UFC), estabeleceu-se as estimativas das curvas de DO e UFC em função do tempo (horas), as quais apresentaram correlação em todos os isolados analisados, podendo assim associar os valores de DO com o número de células bacterianas viáveis (Figura 29).

Figura 29 - Curvas de crescimento dos isolados **A)** *Aneurinibacillus* sp.; **B)** *Bacillus* sp.; **C)** *Bradyrhizobium* sp.; **D)** *Curtobacterium* sp.; **E)** *Delftia* sp.; **F)** *Novosphingobium* sp. em função dos valores obtidos para densidade óptica e Unidades Formadoras de Colônias (UFC), ao longo de 48 horas de incubação a 37 °C

Embora o crescimento das bactérias isoladas tenham se mostrado satisfatórios ao final de 48 horas, observou-se diferenças quanto à cinética de crescimento dessas, conforme pode-se observar na Figura 30.

Figura 30 - Curvas de crescimento dos isolados **A)** *Aneurinibacillus* sp.; **B)** *Bacillus* sp.; **C)** *Bradyrhizobium* sp.; **D)** *Curtobacterium* sp.; **E)** *Delftia* sp.; **F)** *Novosphingobium* sp. em função dos valores obtidos para Densidade Óptica

A cinética de crescimento foi semelhante para os isolados pertencentes aos gêneros *Curtobacterium*, *Delftia* e *Novosphingobium*, onde os isolados permaneceram aproximadamente oito horas em fase *lag* e a partir desse período, atingiram a fase exponencial de crescimento, a qual durou aproximadamente 10 horas para os isolados *Curtobacterium*, *Delftia*, demonstrando tempo médio de geração e velocidade específica de crescimento semelhantes (Figura 30D-E), enquanto o isolado de *Novosphingobium*, apresentou aproximadamente 20 horas de fase exponencial de crescimento (Figura 30F).

O isolado pertencente ao gênero *Bacillus* iniciou seu crescimento exponencial aproximadamente 16 horas após a inoculação, apresentando uma fase *log* de 20 horas, enquanto os isolados pertencentes ao gênero *Aneurinibacillus* e *Bradyrhizobium*, apresentaram crescimento relativamente lento, em comparação aos demais, uma vez que em ambos a fase de equilíbrio foi observada somente após 28 horas da inoculação (Figura 30A-B).

5.3 Bacterização em microcepas de *E. benthamii* e *E. cloeziana*

A partir da identificação dos isolados Bac115A2 (*Aneurinibacillus* sp.), Bac101A2 (*Bacillus* sp.), Bac115B2 (*Bradyrhizobium* sp.), Bac101B1 (*Curtobacterium* sp.), Bac120A2 (*Delftia* sp.) e Bac118B3 (*Novosphingobium* sp.), provenientes de manifestações endofíticas em clones de *E. benthamii* (MCA e MCB), os quais apresentaram os melhores resultados em relação a produção de AIA e fixação de nitrogênio, procedeu-se a inoculação destes isolados em microcepas de duas diferentes espécies de eucaliptos, um clone de *E. benthamii*, doravante denominado clone 7 (diferente dos clones utilizados na etapa inicial deste trabalho) e em um clone de *E. cloeziana* denominado clone 3.

Com o conhecimento prévio do tempo de crescimento, bem como, da UFC de cada isolado bacteriano (item 5.2.5), padronizou-se a utilização de aproximadamente 6×10^2 UFC.microcepa⁻¹ nas duas espécies de eucaliptos durante a etapa de multiplicação.

Pela ANOVA verificou-se diferenças significativas no acúmulo de massa seca, tanto entre os clones quanto entre os isolados, além de ser constatada a interação entre estes fatores. Resultados similares foram obtidos quanto ao número de brotações com exceção da média geral para os clones (Tabela 10).

Tabela 10 - Resumo da análise de variância da massa seca em microcepas do clone 7 de *Eucalyptus benthamii* e do clone 3 de *Eucalyptus cloeziana* cultivados *in vitro* em função da inoculação de bactérias endofítica em 30 dias de cultivo

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios	
		Massa seca (mg. cepa ⁻¹)	Número de brotações (brotações. cepa ⁻¹)
Clones	1	1597,36 *	3,223 ^{ns}
Isolados	6	1140,57 **	253,390 **
Clones*Isolados	6	985,93 *	164,473 **
Resíduo	88	368,74	24,478
CV(%)	-	31,62	16,73

^{ns} não significativo; * e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente

Na Tabela 11, é possível observar que ocorreram diferenças significativas entre clones, sendo as diferenças mais relevantes verificadas nas microcepas inoculadas.

Tabela 11 - Incremento em massa seca em microcepas de *Eucalyptus benthamii* (clone 7) e *Eucalyptus cloeziana* (clone 3) cultivados *in vitro* em função da inoculação de bactérias endofítica em 30 dias de cultivo

Isolados	Massa Seca (mg.microcepa ⁻¹)	
	<i>E. benthamii</i>	<i>E. cloeziana</i>
Sem inóculo	90,43 Aa	58,62 Ab
<i>Aneurinibacillus</i>	43,08 Ba	56,34 Aa
<i>Bacillus</i>	67,69 ABa	58,34 Aa
<i>Bradyrhizobium</i>	90,33 Aa	57,41 Ab
<i>Curtobacterium</i>	55,72 Ba	55,73 Aa
<i>Delftia</i>	55,74 Ba	48,77 Aa
<i>Novosphingobium</i>	63,38 ABa	63,60 Aa

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que as médias dos tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que as médias dos tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

No clone 7 de *E. benthamii* todas as microcepas apresentaram-se sadias ao final de trinta dias após a bacterização (Figura 31A e 32A-F).

Figura 31 - Microcepas de diferentes clones de eucaliptos sem manifestação endofítica e sem inoculação dos isolados (tratamentos testemunhas): **A)** Microcepas de *E. benthamii* (clone 7) e **B)** Microcepas de *E. cloeziana* (clone 3) em 30 dias de cultivo

Para o clone 7 de *E. benthamii*, os isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Bradyrhizobium* e *Novosphingobium*, não afetaram o crescimento das microcepas, ao passo que os isolados *Aneurinibacillus*, *Delftia* e *Curtobacterium* acarretaram pequena redução na taxa de crescimento destas (Figura 32A-F). Já, no clone de *E. cloeziana*, o efeito da inoculação das bactérias foi nulo, ou seja, não houve aumento nem redução no acúmulo de massa seca das microcepas desta espécie e todas as microcepas apresentaram-se sadias e sem aparente oxidação (Figura 31B e 32G-L).

Figura 32 – Microcepas bacterizadas *in vitro*: **A-F)** Microcepas de *E. benthamii*: **A)** Com inoculação de *Aneurinibacillus* sp.; **B)** Com inoculação de *Bacillus* sp.; **C)** Com inoculação de *Bradyrhizobium* sp.; **D)** Com inoculação de *Curtobacterium* sp.; **E)** Com inoculação de *Delftia* sp.; **F)** Com inoculação de *Novosphingobium* sp.; **G-L)** Microcepas de *E. cloeziana*; **G)** Com inoculação de *Aneurinibacillus*; **H)** Com inoculação de *Bacillus* sp.; **I)** Com inoculação de *Bradyrhizobium* sp.; **J)** Com inoculação de *Curtobacterium* sp.; **K)** Com inoculação de *Delftia* sp.; **L)** Com inoculação de *Novosphingobium* sp.

Assim como para a massa seca, houve diferenças em relação ao número de brotações entre os clones. Para o clone 3 de *E. cloeziana*, o efeito da inoculação das bactérias foi nulo, ou seja, não houve aumento nem redução no acúmulo de massa seca das microcepas da referida espécie (Tabela 12). No entanto, para o clone 7 de *E. benthamii* foram constatadas diferenças significativas no número de brotações devido a presença dos isolados, sendo que dos seis isolados bacterianos inoculados, três deles (*Bacillus* sp., *Bradyrhizobium* sp. e *Curtobacterium* sp.) promoveram um incremento em número de brotações nas microcepas não houve diferença significativa ao tratamento sem inoculação (Tabela 12). Por outro lado os demais isolados (*Aneurinibacillus* sp., *Delftia* sp. e *Novosphingobium* sp.) apresentaram redução na emissão de novas brotações, de forma que há um grau de correlação ($r = 0,92$) entre a taxa de crescimento (expressa em massa seca) e número de brotações.

Tabela 12 - Incremento no número de brotações em microcepas do clone 7 de *Eucalyptus benthamii* e clone 3 de *Eucalyptus cloeziana* cultivados *in vitro* em função da bacterização endofítica em 30 dias de cultivo

Isolados	Número de brotações . microcepa ⁻¹	
	<i>E. benthamii</i>	<i>E. cloeziana</i>
Sem inóculo	35,75 ABa	30,88 Aa
<i>Aneurinibacillus</i>	20,38 Eb	28,00 Aa
<i>Bacillus</i>	33,38 ABCa	30,12 Aa
<i>Bradyrhizobium</i>	40,12 Aa	30,12 Ab
<i>Curtobacterium</i>	29,25 BCDA	28,38 Aa
<i>Delftia</i>	22,38 DEB	29,50 Aa
<i>Novosphingobium</i>	27,00 CDEa	28,88 Aa

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que as médias dos tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que as médias dos tratamentos diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

6 DISCUSSÃO

A micropropagação de plantas implica no cultivo de células, tecidos ou órgãos (explantes) em meios de cultura apropriados e livres de contaminantes, uma vez que, a presença de microrganismos nas condições *in vitro* caracteriza desinfestação mal conduzida, inferindo que a remoção da microbiota epifítica dos explantes introduzidos *in vitro*, não foi adequadamente executada.

Uma vez ajustada a desinfestação presume-se que as microplantas desenvolvidas sejam axênicas, livres de microrganismos. Dessa forma, a presença de bactérias ou fungos após o estabelecimento do cultivo *in vitro* é, via de regra, atribuída à falhas na manipulação, acarretando a perda de propágulos. Entretanto, se observa na base das microplantas, em qualquer etapa de cultivo (multiplicação, alongamento e/ou enraizamento) colônias bacterianas, que aparentemente não alteram o desenvolvimento dos propágulos, considerando-se que as microplantas apresentam-se assintomáticas e sem alterações fenotípicas. Dessa maneira, diz-se que houve manifestação de microrganismos endofíticos latentes, e não, contaminação, como afirmam os autores: Leifert; Cassells (2001); Marino; Altan; Biavati (1996); Marino et al. (2009); Thomas (2004); Thomas et al. (2007a).

A visão acerca da caracterização dos microrganismos como “contaminantes” vem sendo alterada nos últimos anos, e um aumento no número de trabalhos tem atribuído à presença dos microrganismos, como exsudados de endófitos, que podem beneficiar ou simplesmente, não interferir no crescimento e desenvolvimento das microplantas *in vitro* (ARDANOV et al., 2011; PROCÓPIO, 2004; RAMOS et al., 2011; THOMAS et al., 2009). Para Thomas et al. (2008b) e Esposito-Polesi (2010) e Esposito-Polesi (2011), os endófitos não são eliminados pelos métodos usuais de limpeza dos explantes, advertindo que a desinfestação severa pode acarretar prejuízos no desenvolvimento das microplantas. De acordo com Schulz e Boyle (2005); Souza et al. (2004); Ryan et al. (2008) a relação planta/endófito é complexa e variada, podendo ser neutra ou mutualística, interagindo no metabolismo e fisiologia do vegetal de maneira a favorecer o desenvolvimento da planta hospedeira. Essa associação em condições *in vivo*, é caracterizada pela troca de nutrientes e proteção, por parte da planta hospedeira que por sua vez, é beneficiada com o favorecimento de seu crescimento e desenvolvimento pelo endófito (GUO et al., 2008).

Este trabalho estudou as colônias bacterianas amarelas e brancas (MCA e MCB, respectivamente) que se manifestaram durante o cultivo *in vitro* de quatro clones de *E. benthamii*. A atuação desses microrganismos sobre as microcepas foi avaliada por meio de análises do incremento em massa seca, número de brotações, emissão de raízes e alongamento das brotações, com base nos trabalhos desenvolvidos por Asmar et al. (2011); Asmar et al. (2012); Basso et al. (2003); Erig e Schuch (2005); Lima et al. (2007); Moraes et al. (2010).

As análises foram feitas em duas etapas cruciais do processo de micropropagação de plantas, a multiplicação e o alongamento uma vez que, na etapa de multiplicação é que ocorre a indução ou multiplicação de brotos, sendo essa etapa caracterizada por diversos subcultivos, que visam à restauração das características juvenis do material micropropagado. Nesta etapa, apesar das microcepas serem caracterizadas axênicas, é muito comum a manifestação bacteriana, que se estende à fase seguinte de desenvolvimento *in vitro*, o alongamento, o qual por sua vez, visa o crescimento em altura das brotações das microcepas que serão posteriormente aclimatizadas. Deste modo e devido a padronização no momento dos subcultivos, considerou-se que as manifestações bacterianas nas microcepas eram as mesmas em ambas as etapas.

Os resultados obtidos inferem que a partir das diferenças de massa seca e número de brotações, tanto na etapa de multiplicação (Figura 9) como no alongamento das microcepas (Figura 11), as manifestações endofíticas não prejudicaram o desenvolvimento das plantas *in vitro*, evidenciando que o descarte de material micropropagado não necessariamente, deve ser executado se as microcepas mantiverem o mesmo padrão fenotípico das não manifestadas.

A promoção do crescimento e desenvolvimento da planta em si é um evento altamente dependente da interação entre a bactéria, a comunidade microbiana associada ao hospedeiro e o genótipo da planta, podendo esse crescimento ser produzido de forma direta ou indireta. Neste contexto, os resultados mostraram que houve diferença no comportamento dos clones, sendo que em BP101, BP115 e BP120, durante a etapa de multiplicação, averiguou-se aumento no incremento de massa seca tanto na presença de MCB quanto na presença de MCA, em relação às microcepas sem manifestação (Figura 9A). Já, no clone BP118 não foram evidenciadas diferenças significativas no desenvolvimento das microcepas na ausência e na presença de manifestações (MCA e MCB).

Além disso, as análises do desenvolvimento das microcepas reforçaram ainda mais a ideia que as bactérias endofíticas não necessariamente prejudicam ao desenvolvimento *in vitro*, e embora em muitos casos a MCA não tenha mostrado efeitos tão positivos quando comparada a MCB, essa não ocasionou o decréscimo no desenvolvimento das plantas, com exceção do número de brotações do clone BP101 na etapa de multiplicação (Tabela 9B) e número de brotações do clone BP120 na etapa de alongamento (Tabela 11B), ambos sob a MCA, comparadas às microcepas dos mesmos clones que cresceram sem manifestações (SM).

De acordo com Andreote et al. (2010), a composição da comunidade associada às plantas está diretamente relacionada a espécie, cultivar, ou mesmo as espécies transgênicas e suas respectivas progenitoras. Essas evidências são reforçadas por Pamphile e Azevedo (2002) que afirmam a existência de uma forte especificidade entre os microrganismos e a planta hospedeira. Os autores salientam ainda que, 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 endófito.

Em se tratando de cultivo *in vitro*, os aspectos ambientais são mais controlados, porém não devem ser descartados, uma vez que qualquer alteração na intensidade luminosa, ou pH, constituição, nutricional, temperatura ou ainda, fotoperíodo, podem resultar alterações homeostáticas influenciando 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., 2009; IZUMI et al., 2008; PAMPHILE; AZEVEDO, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; STURZ; NOWAK, 2000), efeito evidenciado neste trabalho pela diversidade de bactérias manifestadas *in vitro* (Figura 25), com relação ao comportamento dos quatro clones avaliados.

As respostas observadas durante o cultivo *in vitro* também foram constatadas no estabelecimento inicial das microestacas no ambiente *ex vitro*, evidenciando novamente a especificidade dos clones com sua microbiota endofítica e como a interação entre eles influenciou no crescimento e desenvolvimento dos clones micropropagados.

A etapa de aclimatização, caracterizada pela transferência das microestacas para o ambiente *ex vitro*, é considerada um dos grandes gargalos no processo de

micropropagação, uma vez que o material micropropagado passa de uma condição heterotrófica para autotrófica (BANDEIRA et al., 2007). Embora o intuito deste trabalho fosse verificar a influência da microbiota bacteriana endofítica no desenvolvimento das microcepas de clones de *E. benthamii* durante o cultivo *in vitro*, considerou-se importante verificar o desenvolvimento inicial no ambiente *ex vitro*, das brotações alongadas (microestacas), obtidas durante a etapa de alongamento (Figura 14A e B).

Quando analisados os índices de sobrevivência e enraizamento das microplantas com e sem manifestação endofítica, observou-se que independentemente da procedência *in vitro*, consideráveis foram os percentuais de enraizamento dos diferentes clones (Tabela 7), uma vez que a espécie *E. benthamii* apresenta dificuldades de enraizamento, mesmo por estaquia convencional ou miniestquia. A presença de manifestação de colônias bacterianas durante o cultivo *in vitro* aparentemente não influenciou os percentuais de enraizamento e consequentemente a sobrevivência das microestacas *ex vitro*, quando comparadas as microestacas que não apresentaram manifestação *in vitro*, exceto dos clones BP115 e BP118 que apresentaram uma redução nesse percentual sob MCB e MCA, respectivamente.

Análises das microcepas, ainda no ambiente *in vitro* evidenciaram que, independente do tipo de manifestação estas apresentaram-se morfológicamente estáveis, com folhas e raízes saudáveis e sem oxidação (Figuras 8, 10 e 12).

Resultados semelhantes à morfologia foram observados quanto à anatomia desses órgãos nos respectivos clones, onde tanto as raízes quanto as folhas *in vitro*, não apresentaram diferenças significativas na presença ou ausência de manifestação endofítica, bem como entre os diferentes tipos de manifestações. De acordo com Morretes e Ferri (1959), os estudos referentes à anatomia, bem como a composição histoquímica dos respectivos órgãos, são de grande importância, quanto se almeja correlacionar as estratégias de adaptação das plantas a um determinado ambiente ou condição. Poucos, entretanto são os trabalhos como de Abreu-Tarazi (2010) e Esposito-Polesi (2010), que utilizaram esses recursos na interação de plantas com endófitos.

Como mencionado, as raízes e folhas não apresentaram diferenças significativas nas diferentes condições de cultivo, sendo a anatomia radicular similar às demais espécies de eucalipto (CALDERÓN BALTIERRA; MONTENEGRO; DE

GARCÍA, 2004). Já, com relação às folhas, essas distinguiram de outras espécies de eucaliptos bem como de descrições prévias da própria espécie, por apresentarem epidermes com uma fina camada de cutícula e mesofilo dorsiventral. O pouco desenvolvimento da cutícula, provavelmente se deve a condição de cultivo *in vitro*, uma vez que tanto a umidade, luminosidade quanto a temperatura são controladas, sendo a umidade no interior dos frascos muito elevada, não necessitando assim do espessamento cuticular como estratégia adaptativa das plantas (CALVETE et al., 2002; PREECE; SUTTER, 1991).

Todas as folhas analisadas apresentaram mesofilo dorsiventral, tanto na presença quanto ausência de manifestação endofítica. Boscardin (2009), entretanto, descreve a organização anatômica do mesofilo de folhas adultas de *E. benthamii*, como heterogêneo simétrico, do tipo isobilateral, diferentemente do encontrado neste estudo e em alguns estudos com a família Myrtaceae (ALVAREZ et al., 2012; MEDEIROS, 2000; PALHARES, 2003; SANTOS et al., 2008). Cabe ressaltar que, o material analisado por Boscardin (2009) é oriundo de plantas do campo, enquanto que as analisadas no presente trabalho são derivadas de plantas micropropagadas, as quais foram mantidas em ambiente controlado. De acordo com Apóstolo et al. (2005), órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciados quando comparados com plantas cultivadas em ambiente externo.

Outra característica constatada em todas as folhas analisadas foi a presença de glândulas secretoras, estrutura estas comuns a muitas espécies pertencentes à família Myrtaceae e ao gênero *Eucalyptus* (ALVAREZ et al., 2012; CASTRO; MACHADO, 2003; MEDEIROS, 2000; PALHARES, 2003; SANTOS et al., 2008), e que no presente trabalho, por meio de testes histoquímicos, revelou nos clones sob manifestação bacteriana na etapa de multiplicação e em todos os clones na etapa de alongamento, a presença de compostos fenólicos.

Tanto as folhas quanto as raízes de *E. benthamii*, apresentaram compostos fenólicos, sendo essas respostas inerentes a cada etapa do processo de micropropagação, bem como a presença ou ausência de manifestação endofítica, sendo observado um padrão de resposta em ambos os órgãos analisados. Na etapa de multiplicação, somente as folhas e raízes de microplantas sob manifestação de bactérias apresentaram esses compostos, sendo na raiz encontrados principalmente no cilindro vascular e nas folhas, conforme mencionado, principalmente nas

glândulas secretoras. Já, na etapa de alongamento, independentemente do clone e da presença ou não de endófitos, constatou-se a presença desses compostos em ambos os órgãos nas respectivas estruturas.

Segundo Castro e Machado (2003) os fenóis formam uma classe de compostos do metabolismo secundário, que em plantas constituem um grupo quimicamente heterogêneo, sendo esses secretados por idioblastos e células epiteliais que delimitam glândulas e ductos secretores, tal como os observados nas folhas no presente trabalho. Santos et al. (2008), em estudo sobre as estruturas secretoras e a natureza química dos compostos secretados de sete espécies de eucaliptos, constataram a presença de compostos fenólicos em todas as espécies analisadas.

Del Río et al. (2006), mencionam que alguns dos compostos fenólicos encontrados nas plantas, podem atuar como moléculas sinalizadoras em processos de crescimento e desenvolvimento celular. Essa afirmação condiz com os resultados aqui observados, uma vez que, os maiores valores obtidos no incremento em massa seca e número de brotações durante a etapa de multiplicação estão associados à presença de compostos fenólicos nas microcepas e essas por sua vez apresentam manifestações endofíticas.

Diferentemente da etapa anterior, no alongamento, as microcepas sem manifestações (SM) também apresentaram compostos fenólicos tanto nas folhas quanto nas raízes, porém em menor intensidade quando comparados com as microcepas sob manifestação endofítica. Cabe ressaltar que as microcepas SM, assim como as microcepas sob MCA e MCB, nessa etapa da micropropagação, além do alongamento das brotações, apresentaram elevada emissão de raízes, caracterizando assim a intensa atividade metabólica dos clones. Dessa forma, acredita-se que a presença de compostos fenólicos nos respectivos órgãos, pode estar associada a maior atividade do metabolismo das microcepas de *E. benthamii*.

Não obstante, Keeling e Bohlmann (2006), ressaltam que os metabólitos secundários, como os fenóis, incluem compostos produzidos em resposta a um determinado estresse e adicionalmente, Posmyk, Kontek e Janas (2008) atribuem a síntese destes compostos como uma estratégia eficaz contra espécies reativas de oxigênio (EROs).

De acordo com a literatura o estresse em plantas pode ser entendido como um conjunto de respostas metabólicas que ocorrem em nível celular, causando alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas nos indivíduos. Em nível celular,

o estresse, seja biótico ou abiótico, pode ser em decorrência do aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais por sua vez existem em equilíbrio nas células, sendo sua produção resultado do próprio metabolismo da planta (FOYER; DESCOURVIERES; KUNERT, 1994), havendo diversas enzimas que atuam na manutenção da homeostase celular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). De forma indireta, parte deste estresse pode ser mensurado pela quantificação de Malondialdeído (MDA), produto formado a partir da reação do peróxido de hidrogênio com lipídios de membrana (DEWIR et al., 2006). Assim, teoricamente quanto maior a produção de MDA, maior seria o nível de estresse nos tecidos.

Nesse contexto, muitos são os trabalhos de biotecnologia, que relacionam a manifestação endofítica a um determinado estresse que a planta foi submetida durante o cultivo *in vitro* (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; THOMAS; PRAKASH, 2004; THOMAS; PRABHAKARA; PITCHAIMUTHU, 2006; THOMAS et al., 2008b). Por essa razão, o presente trabalho, analisou se as microcepas apresentaram alterações no nível de estresse, por meio de um indicador bioquímico.

Segundo Lutts e Kinet (1998), conceitualmente o estresse está diretamente relacionado às condições que as plantas são submetidas, as quais afetam negativamente seu crescimento e desenvolvimento. Embora na etapa de alongamento *in vitro*, as microcepas de *E. benthamii* tenham apresentado maior produção de MDA em comparação às mantidas em meio padrão de multiplicação (Figura 21), não foi constatada a redução de crescimento e desenvolvimento típica de plantas sob estresse (LUTTS; KINET, 1998; PIOTTO, 2012). Assim, o aumento na concentração de MDA pode ser decorrente de diferenças no metabolismo das microplantas nas diferentes condições de cultivo.

Nesse contexto, além das variações observadas na produção de MDA pelas microcepas nas etapas da micropropagação, verificou-se um padrão de resposta inerente a cada etapa. Na multiplicação, por exemplo, a maioria dos clones apresentaram menor produção de MDA nas microcepas sob manifestação endofítica quando comparadas às sem manifestações, sendo esses resultados mais pronunciados nas microcepas sob MCB (Figura 21A). Por outro lado, na etapa de alongamento, em todos os clones analisados e independentemente do tipo de manifestação, observou-se maior concentração de MDA quando comparadas com às microcepas sem manifestação (Figura 21B).

Acredita-se que a baixa produção de MDA pelas microcepas mantidas no meio padrão para multiplicação, pode ser devida à habituação dessas ao meio de cultivo, uma vez que esses se encontravam por prolongados períodos de subcultivos *in vitro* (AKIN-IDOWU et al., 2009). Essa suposição foi reforçada quando analisadas as microcepas na etapa de alongamento, onde além do desenvolvimento de brotações pré-formadas e enraizamento, essas continuaram emitindo novas brotações e consequentemente aumentaram a massa seca, mesmo quando cultivadas em meio de cultura isento de reguladores de crescimento (Figuras 11 e 13), associando novamente as respostas à habituação das microcepas aos reguladores utilizados (ALMEIDA et al., 2012; GENEVE et al., 2007; MEINS, 1989; MEINS; SELDRAN, 1994), ou mesmo pelo efeito residual da etapa anterior (multiplicação), o qual pode ter proporcionado condições adequadas para esses eventos ocorrerem (SOARES et al., 2011).

Trabalhos clássicos como de Meins (1989) já relatavam evidências que o processo de habituação resultasse do acúmulo de hormônios pelas células, em razão ao meio que são cultivadas. De acordo com o autor, a habituação celular para diferentes teores de auxinas e citocininas são resultantes de modificações reversíveis na hereditariedade celular conhecida como mudanças epigenéticas, que ao contrário das mutações, são reversíveis em resposta a um indutor específico (MEINS; SELDRAN, 1994).

Poucos são os trabalhos como os de Thomas et al. (2007a) e Thomas et al. (2008a), que fazem referência a interação da microbiota endofítica na habituação das plantas micropropagadas. De acordo com Thomas et al. (2007a) o possível papel dos endófitos na cultura de tecidos está relacionado não somente à fenômenos como a habituação, como também a variação somaclonal. O autor ainda faz menção da interação que inúmeros grupos de bactérias apresentam com a planta hospedeira, principalmente na produção de metabólitos, que podem contribuir para o crescimento e vigor das plantas. Dessa forma, o reconhecimento dos filos bacterianos das colônias manifestadas foi de extrema importância para a compreensão dos resultados obtidos, uma vez que as manifestações, inicialmente classificadas pela coloração, na verdade era composta por mais de uma linhagem.

Por meio da identificação filogenética obtida por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA constatou-se a afiliação principal dos isolados aos filos bacterianos, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria. De acordo com Rosenblueth e Martínez-

Romero (2006), esses grupos são os mais comumente encontrados em plantas como endófitos.

Bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Aneurinibacillus*, isoladas de colônias manifestadas de microcepas de *E. benthamii* foram relatados na literatura como endófitos benéficos em diversos vegetais, sendo ambos os gêneros pertencentes ao filo Firmicutes. São bactérias Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, com potencial para promoção de crescimento (SOUZA, 2011; XIE; CAI; STERINBERGR, 2003). Nas plantas a promoção de crescimento pelos microrganismos endofíticos pode ser obtida de forma direta ou indireta, pela produção de fitorreguladores (PEDRAZA et al., 2004), fixação de nitrogênio (COCKING, 2003) e solubilização de fosfato inorgânico (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; TAURIAN et al., 2010). Enquanto que de forma indireta, os microrganismos podem promover o crescimento das plantas devido à síntese de antibióticos (ARDANOV et al., 2011, PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; VICENTE, 2011) ou sideróforos (ZHENG et al., 2011).

Comumente relatadas como endófitos de diversas espécies de eucaliptos (FERREIRA, 2008; FERREIRA et al., 2008; MAFIA et al., 2005; PAZ, 2009; PAZ et al., 2012, PROCÓPIO et al., 2009), as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são consideradas promotoras de crescimento, devido principalmente a sua característica de produção de fitohormônios, bem como fixadoras de nitrogênio (ASLANTAFL et al., 2007; BENEDUZI et al., 2008; BENT et al., 2002; ÇAKMAKÇI et al., 1999; ÇAKMAKÇI et al., 2001; ÇAKMAKÇI et al., 2007; CANBOLAT et al., 2006; FREITAS, 2000; HALLMANN et al., 1997; KLOEPPER et al., 2004; PATTEN; GLICK, 1996; SUNDARA et al., 2002; ZINNIEL et al., 2002). Embora os isolados manifestados neste trabalho, pertencentes ao gênero *Bacillus*, não apresentem a característica de produzir AIA, esses mostraram-se capazes de fixar nitrogênio (Figura 28B). De acordo Balachandar et al. (2006), as bactérias endofíticas por sofrerem menor competição quando comparadas às bactérias epifíticas, possivelmente excretam parte do nitrogênio por elas fixado, diretamente na planta promovendo o desenvolvimento do vegetal.

Em se tratando especificamente da atuação do nitrogênio no crescimento das culturas *in vitro*, Russowski (2001) ressalta que, esse nutriente influencia diretamente o metabolismo químico, na formação e produção de metabólitos das

plantas, uma vez que constitui aminoácidos, proteínas, nucleotídeos e ácidos nucléicos, atuando na divisão e alongamento celular.

De forma similar ao que foi observado por Mafia et al. (2005), onde foi constatada a promoção de crescimento e melhoria na qualidade de clones de eucaliptos na presença de linhagens endofíticas de *Bacillus*, neste trabalho com *E. benthamii*, também observou-se aumento de biomassa em relação as microcepas sem manifestação, nas microcepas dos clones BP101 (sob MCA) e BP118 (sob MCB), as quais possuíam na microbiota manifestada, os isolados Bac101A2 e Bac118B2, respectivamente, pertencentes ao gênero *Bacillus*, tanto na etapa de multiplicação quanto de alongamento (Figuras 9A e 11A).

Outro gênero pertencente ao filo Firmicutes, também observado neste estudo, foi o *Aneurinibacillus*, o qual se destaca na literatura, principalmente como endófito produtor de antibióticos (REVA; SOROKULOVA; SMIRNOV, 2001), sendo a principal espécie a *Aneurinibacillus migulanus*, também conhecido por *Bacillus brevis* (BERDITSCH et al., 2007). O isolado Bac115A2, pertencente a esse gênero revelou a capacidade de produzir auxinas, embora em menor quantidade quando comparado a outros isolados analisados (Quadro 6). A produção de auxinas destaca-se dentre os fitohormônios produzidos tanto pelas plantas quanto por microrganismos, uma vez que este fitohormônio influencia diretamente no alongamento das brotações, podendo atuar na dominância apical, por inibir o crescimento das gemas axilares, em decorrência do crescimento da gema apical. A auxina pode também atuar no enraizamento das microcepas, pela iniciação dos primórdios radiculares (HARTMANN et al., 2011).

As microcepas do clone BP115, sob MCA, que possuíam o isolado Bac115A2 na manifestação, apresentaram diferenças nos parâmetros analisados nas etapas de micropropagação, em comparação às microcepas SM. Já, as microcepas do clone BP120 sob manifestação de colônias brancas (MCB), as quais apresentavam o isolado Bac120B2, também pertencente ao gênero *Aneurinibacillus*, embora não tenham evidenciado a capacidade de produzir AIA apresentaram resultados significativos quando comparados aos demais tratamentos dentro do mesmo clone, com incremento na massa seca, número de brotações em ambas as etapas, bem como maior percentual de enraizamento e alongamento *in vitro*.

As manifestações das microcepas do clone BP120 apresentaram outros isolados com capacidade de produzir AIA, pertencentes ao gênero *Curtobacterium*

(Bac120B1 e Bac120B3). De acordo com Kuss et al. (2007) essa capacidade de sintetizar fitohormônios é uma característica amplamente distribuída entre bactérias associadas com plantas. Adicionalmente, Pedraza et al. (2004) associam essa característica às bactérias endofíticas.

O gênero *Curtobacterium*, pertencente ao grupo taxonômico Actinobacteria, é representado por bactérias Gram-positivas e apesar de alguns de seus representantes serem considerados fitopatogênicos (BELMONTE, 2011; COLLINS; JONES, 1983), como é o caso da bactéria *C. flaccumfaciens*, conhecida como agente causadora da murcha e necrose em algumas hortaliças e plantas ornamentais (VIDAVER, 1982), esse gênero também engloba bactérias endofíticas, descritas em diversas culturas, como as de arroz (ELBELTAGY et al., 2000; MANO; MORISAKI, 2008), citros (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002), plantas de pradarias (ZINNIEL et al., 2002), cana-de-açúcar (MAGNANI et al., 2010), café (VEGA et al., 2005), álamo (ULRICH; ULRICH; EWALD, 2008), sendo associadas a promoção de crescimento de plântulas como em *Trifolium* sp. trevo (STURZ et al., 1997), ou mesmo interagindo com outras bactérias promotoras de crescimento (BENT; CHANWAY, 1998). Trabalhos de Andreote (2007), Ferreira (2008) e Procópio et al. (2009) relataram a ocorrência do gênero *Curtobacterium* como endófitos em espécies de eucaliptos e, como observado no Quadro 5, esse gênero foi o que mais se destacou dentre todos os isolados das manifestações em *E. benthamii*, ocorrendo em todos os clones analisados.

Dois dos isolados do clone BP101 sob manifestação de colônias brancas (Bac101B1 e Bac101B3) pertencentes ao gênero *Curtobacterium* se destacaram nas análises como os maiores produtores de AIA quando comparados aos demais isolados do mesmo gênero, o que pode justificar o aumento significativo no incremento em massa seca, enraizamento e alongamento das microcepas, quando comparadas às sem manifestação (SM). Esses resultados corroboram Patten e Glick (1996) e Tsavkelova et al. (2006a,b), os quais destacam a característica do gênero como promotora de crescimento vegetal.

Além dos filos Firmicutes e Actinobacteria, como já mencionado, foram identificados representantes do filo Proteobacteria nos diferentes clones de *E. benthamii* (Figura 25). De acordo com a literatura as proteobactérias pertencem a um grupo predominantemente de endófitos, e muitas das bactérias pertencentes a esse grupo são consideradas benéficas às plantas hospedeiras, promovendo a

indução de resistência sistêmica, antibióticos, bem como a promoção do crescimento (ARAÚJO et al., 2001; ANDREOTE et al., 2006 e 2008; COMPANT et al., 2005; DIAS et al., 2009; KNIEF et al., 2008; SY et al., 2001). Dentro do filo Proteobacteria observou-se duas classes de bactérias, Betaproteobacterias e Alphaproteobacterias, que segundo Rosenblueth e Martínez-Romero (2006) são frequentemente encontradas em plantas como endófitos, juntamente com a classe *Gammaproteobacteria*.

A classe Betaproteobacteria, neste trabalho é representada pelo gênero *Delftia*, que constitui um grupo de bactérias Gram-positivas, comumente isoladas da rizosfera ou de colônias associadas a plantas utilizadas em sistemas agroflorestais (COSTA, 2010). Segundo o autor esse gênero refere-se a espécies produtoras de sideróforos, pectinases e proteases. Adicionalmente Han et al. (2004) descreveram a espécie *Delftia tsuruhatensis* como agente no biocontrole de diversos patógenos de plantas, ressaltando ainda, a capacidade do referido isolado em fixar nitrogênio, característica essa também observada neste trabalho (Figura 28A). Entretanto, diferentemente do observado nas microcepas cujas manifestações apresentavam *Bacillus* fixadores de nitrogênio, nas microcepas dos clones BP118 e BP120, ambos sob MCA, que continham os isolados Bac118A2 e Bac120A2, respectivamente, pertencentes ao gênero *Delftia*, não foram evidenciadas diferenças relevantes quanto aos parâmetros analisados em ambas as etapas.

Representantes da classe Alphaproteobacteria diferentemente dos demais grupos bacterianos isolados das manifestações de *E. benthamii*, compreendem um grupo de bactérias Gram-negativas, as quais segundo Studhomes et al. (2004) abrange uma grande diversidade de estilo de vida, ecologia e metabolismo. Os isolados, no presente trabalho, pertencentes a essa classe, correspondem ao gênero *Bradyrhizobium* e *Novosphingobium*, já caracterizados endófitos de plantas (LEMOS et al., 2009).

Espécies do gênero *Bradyrhizobium* são frequentemente citadas na literatura como fixadoras de nitrogênio (DE TOLEDO et al., 2009; GONZALEZ, 2008; MENNA et al., 2006), bem como produtoras de AIA (VEGA-HERNÁNDEZ, 2002; VESSEY, 2003). No entanto, os resultados não indicaram nenhuma destas características no isolado Bac115B2, correspondente ao gênero. O efeito benéfico de *Bradyrhizobium* em leguminosas em termos de fixação biológica de nitrogênio é bem conhecido (ANTOUN et al., 1998). No entanto, de acordo com Pereira et al. (2008), a influência

que estas bactérias podem ter no desenvolvimento de eucaliptos é questionável. Os autores, após estudo da microbiota presente na rizosfera de espécies de eucaliptos, atribuiu a elevada concentração de *Bradyrhizobium* sp. na rizosfera à presença de leguminosas florestais na mata, as quais se localizavam relativamente próximas às árvores analisadas. Neste contexto, vale lembrar que somente o clone BP115 dos quatro clones analisados apresentou esse isolado, podendo a presença deste estar associada ao local onde a matriz se encontrava antes de ceder o explante que foi cultivado *in vitro*.

Por fim, constatou-se nas manifestações isoladas de *E. benthamii*, a presença de representantes do gênero *Novosphingobium* (isolados Bac118B3 e Bac115B3), os quais apresentaram os melhores resultados quanto a biossíntese de AIA. Há relatos de representantes do gênero *Novosphingobium* como endófitos de plantas (ABREU-TARAZI, 2010; MANO; MORISAKI, 2008), e mesmo em espécies de eucaliptos (ANDREOTE, 2007). No entanto, poucos são os trabalhos como de Castro (2011) e o presente estudo com *E. benthamii*, que mencionam a capacidade de produção de AIA, por espécies deste gênero.

Muitas das espécies bacterianas isoladas em *E. benthamii*, não se mostraram capazes de fixar nitrogênio e/ou produzir AIA, apesar de na literatura inúmeros trabalhos evidenciaram essas funções, o que leva a crer que essa perda seja decorrente da dissociação bacteriana (BERDITSCH, 2007). Segundo o mesmo autor, o fenômeno da dissociação bacteriana, pode muitas vezes ocasionar a perda da capacidade de uma determinada bactéria em produzir certo composto, devido o ambiente que se encontra. Neste sentido poderíamos considerar desde o ambiente externo (meio de cultura, microclima dentro do frasco), bem como o próprio interior da planta hospedeira. Fato esse que justificaria algumas das divergências descritas anteriormente com o encontrado na literatura.

Outro fator a ser considerado é que, por exemplo, embora os Bac101A2 e Bac120A2, pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Delftia*, respectivamente, sendo esses isolados capazes de fixar nitrogênio pelos testes realizados. Entretanto, não se constatou diferenças significativas quanto os teores desse nutriente, em ambas as etapas da micropropagação nas microplantas dos clones BP101 (MCA) e BP118 (MCB), as quais apresentavam isolados do gênero *Bacillus* em sua manifestação, bem como os clones BP118 (MCA) e BP120 (MCA), que apresentaram isolados pertencentes ao gênero *Delftia* (Figura 22). Segundo Maldaner et al. (2006) existem

diferentes exigências nutricionais nos tecidos da plantas em condições *in vitro*, havendo uma grande variação de acordo com o genótipo da planta. Por essa razão, acredita-se que nas condições *in vitro* em que os clones se desenvolveram não houve a necessidade de fixação de nitrogênio pelos respectivos endófitos, uma vez que o meio de cultura apresentava em sua composição fontes desse nutriente (Quadro 1).

Por meio das análises realizadas nas microcepas, observou-se que a característica de fixação nitrogênio dos isolados manifestados não apresentaram relação direta com o incremento dos parâmetros analisados, embora tenha sido notada uma certa correlação destes com os isolados produtores de AIA. Bashan e Holguin (1997), entretanto, ressaltam que somente uma dessas características não explicaria os incrementos no crescimento da planta hospedeira, sendo esse o resultado da atuação concomitante de múltiplos mecanismos, como a fixação biológica de N₂ e a biossíntese de fitohormônios.

Essa atuação concomitante foi observada no clone BP118 sob manifestação de colônias brancas (MCB), que apresentou maior incremento em número de brotações em relação às microcepas sem manifestação, sendo essas manifestações constituídas por isolados fixadores de nitrogênio (*Bacillus* sp.) e de produtoras de AIA (*Curtobacterium* sp. e *Novosphingobium* sp.). No entanto, deve-se considerar que os melhores resultados obtidos foram nas microcepas do clone BP120 sob MCB, cujos isolados foram identificados como *Curtobacterium* sp. e *Aneurinibacillus* sp., ambos produtores de AIA.

Por meio da análise dos dados coletados durante as diferentes etapas da micropropagação, observou-se que a presença da manifestação de microrganismos endofíticos, embora não tenha afetado negativamente o desenvolvimento das microcepas *in vitro*, apresentou um elevado grau de especificidade entre os clones e sua microbiota, os quais foram constatados por meio dos parâmetros de massa seca e do número de brotações (Figuras 9 e 11, respectivamente), bem como pela formação de microestacas (brotações alongadas) (Figura 13), podendo assim relacionar à essa microbiota as alterações morfogênicas. Almeida, Yara e Almeida (2005), em seus trabalhos mencionaram que a interação estabelecida entre a planta micropropagada e os microrganismos endofíticos poderiam estar relacionadas diretamente ao potencial morfogênico das microplantas.

Neste contexto, não somente deve-se considerar a especificidade da microbiota manifestada com seu hospedeiro, mas também a associação ou mesmo interação dessas com a microbiota que permaneceu endofítica na planta, e até mesmo com as bactérias tidas como não cultiváveis (ABREU-TARAZI, 2010; ANDREOTE, 2007; THOMAS et al., 2007a). Na realidade, segundo Muyzer e Smalla (1998), as condições ambientais em que essas bactérias não-cultiváveis crescem é que são desconhecidas.

Outro fator importante a ser observado, é que apesar de cada clone responder de forma distinta na presença da manifestação bacteriana, alguns clones se destacaram dos demais, como o clone BP115, que independentemente do tipo de manifestação (MCA ou MCB), ou mesmo da ausência desta, apresentou expressivo número de brotações alongadas, quando comparado aos demais clones nas mesmas condições (Figura 13), inferindo que além da linhagem bacteriana manifestada, da composição e/ou associação da microbiota endofítica, o genótipo da planta é de grande relevância no estudo da interação planta/endófito (PIRTTILÄ et al., 2008).

Conforme demonstrado no Item 5.2, cada tipo de manifestação que inicialmente foi classificada pela coloração, na verdade era composta por uma associação de bactérias (Figura 23), de modo que não foi possível avaliar o efeito individual de cada um dos isolados sobre o desenvolvimento das plantas. Assim, a partir das seis linhagens isoladas de manifestações endofíticas de *E. benthamii*, as quais apresentaram melhores resultados nos testes realizados (Item 5.3), coube verificar o impacto de cada uma delas no crescimento de microcepas de eucalipto. Para tanto, outro clone de *E. benthamii* (Clone 3) diferente daqueles usados na etapa inicial deste trabalho e um clone de *E. cloeziana* (Clone 7), foram bacterizados *in vitro* na etapa de multiplicação, por ser essa a etapa mais prolongada do cultivo e a fase de maior ocorrência de manifestações bacterianas. A escolha do clone da mesma espécie e de uma espécie diferente visou avaliar o grau de especificidade de interação destes microrganismos com a espécie a partir da qual eles foram isolados.

Tendo em vista toda a diversidade de bactérias endofíticas isoladas de microplantas ou plantas do ambiente *ex vitro*, vários estudos já propuseram investigar os benefícios da inoculação artificial dessas bactérias ou “biotização” acreditando no potencial de indução de alterações no metabolismo e

desenvolvimento vegetal. As principais respostas desses estudos foram a promoção de crescimento *in vitro* e a indução de resistência às microplantas (NOWAK, 1998).

Neste sentido, diante da inoculação artificial de bactérias endofíticas em microplantas de cana-de-açúcar, Canuto et al. (2003) verificaram que bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Burkholderia* promoveram maior acúmulo de massa seca total das plantas, e Govindarajan et al. (2006) com inoculação de *Burkholderia vietnamiensis* também verificaram aumento de biomassa quando as microplantas foram levadas ao campo.

Todavia, analisando os resultados obtidos, verificou-se que o efeito individual das bactérias não apresentou resultados positivos nos clones de *E. benthamii*, sendo que das seis bactérias testadas, quatro delas mostraram efeito neutro (*Bacillus* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Curtobacterium* sp. e *Novosphingobium* sp.) e as demais (*Aneurinibacillus* sp. e *Delftia* sp.) reduziram o crescimento das cepas.

Dentre as espécies que apresentaram efeito neutro nas microcepas de *E. benthamii* destacam-se as *Curtobacterium* sp. (Bac118B3) e *Novosphingobium* sp. (Bac101B1) as quais por meio das análises realizadas nos isolados, se destacaram como as melhores produtoras de AIA (Quadro 6). Durante a etapa de multiplicação, pode-se verificar que embora essa característica não se mostre de grande relevância, uma vez que o meio de cultura já possuía auxina em sua composição, essa característica pode ser benéfica no posterior enraizamento e aclimatização das microestacas. De acordo com Mello (2001), bactérias promotoras de crescimento de plantas podem agir tanto no cultivo *in vitro* quanto na fase de aclimatização proporcionando maior vigor e adaptação das mudas após o transplante. Já, para o clone de *E. cloeziana*, a bacterização não apresentou resultado, sendo assim caracterizada como neutra, onde a taxa de crescimento das microcepas bacterizadas foi estatisticamente igual ao da microcepa sem bacterização (testemunha).

Conforme foi demonstrado, só foram observadas diferenças significativas na bacterização em *E. benthamii*. Provavelmente, isso aconteceu porque, as bactérias foram específicas para *E. benthamii*, uma vez estas foram isoladas de clones da espécie, determinando maiores possibilidades de colonização e interação das microplantas com esses microrganismos (SUMNER, 1990). Por outro lado, não foram reproduzidos os mesmos resultados com o aumento da massa seca e do número de brotações, obtidos nas microplantas da mesma espécie sob MCA e MCB.

Provavelmente essa alteração, quando comparada com a inoculação individual dos isolados obtidos de colônias manifestadas, foi devido à especificidade entre os microrganismos aos respectivos clones e não da espécie como se acreditava. Assim, essas bactérias não teriam uma interação positiva com outro clone, mesmo sendo da mesma espécie, caracterizando dessa forma, uma interação genótipo dependente. Trabalhos de Andreote et al. (2009), Izumi et al. (2008) e Pamphile e Azevedo (2002) relataram a especificidade da associação entre a planta e sua microbiota, a qual pode ser influenciada por diversos fatores, seja ambiental, fisiológico, bioquímico ou mesmo genético. Adicionalmente, Pirttilä et al. (2008), ressaltaram que 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.

Neste contexto, os resultados obtidos nas microcepas de *E. benthamii* inoculadas, podem ser devido a competição entre os isolados inoculados com microbiota endofítica nativa, ainda endófito, do clone em questão. A bacterização pode ter ocasionado uma alteração no equilíbrio do sistema de interação estabelecido, acarretando na redução ou simplesmente mantendo estável a taxa de crescimento das microplantas. Segundo Marques Júnior et al. (2008) a inoculação de bactérias, pode acarretar no aumento da densidade bacteriana endofítica, uma vez que, além dos microrganismos nativos, outros seriam inseridos, podendo assim ocasionar competição entre esses, bem como o próprio hospedeiro, por carboidratos e outras biomacromoléculas.

Adicionalmente Hardoim, Overbeek e Elsas (2008) ressaltam que a competição entre as bactérias, pode ocasionar o estabelecimento de alguns endófitos em detrimento de outros, devido ao crescimento e proliferação mais rápida pela planta hospedeira de um determinado endófito em comparação a outro, ocasionando assim a alteração de nichos. Sendo assim, pode-se observar que entre os próprios isolados a cinética de crescimento é muito discrepante (Figura 30), não se considerando ainda a cinética dos microrganismos nativos das microcepas analisadas. Segundo Abreu-Tarazi et al. (2010) e Quadts-Hallmann, Hallman e Kloepper (1997), nas plantas há diferentes nichos, os quais podem ser colonizados por diferentes bactérias, e por sua vez, diferentes grupos bacterianos possuem a capacidade de colonizar de distintas formas esses nichos. Outro fator a ser considerado, nos resultados obtidos, é o tempo de contato das microplantas aos

respectivos isolados, que no presente trabalho foi de 30 dias. Esse período pode ter sido insuficiente para se estabelecer as relações de interação, não sendo assim, possível avaliar diferenças marcantes da presença das bactérias junto com as microcepas.

No caso de *E. cloeziana*, é provável que os resultados referentes às taxas de crescimento das microplantas desta espécie tenham sido devido à falta e/ou baixa especificidade com as bactérias que foram isoladas de uma outra espécie. De acordo com Roesch et al. (2005) a inoculação de bactérias nem sempre apresenta aumento da produção, provavelmente devido à linhagem utilizada, a variação genética do hospedeiro, bem como pelas condições ambientais, os quais interferem diretamente no sucesso da bacterização. Adicionalmente, Sumner (1990) recomenda para inoculação de bactérias, a utilização de isolados que pertençam à mesma variedade da planta, uma vez que são mais eficientes, principalmente se a população nativa está presente. Ainda nesse contexto, é possível também que a própria microbiota endofítica do *E. cloeziana* tenha apresentado vantagem sobre bactérias de outra espécie, dificultando o sucesso da bacterização das microcepas.

De forma geral, os resultados obtidos na inoculação (bacterização) reforçam ainda mais a hipótese de que existe uma alta especificidade entre a microbiota endofítica, como já atribuído por Thomas et al. (2007b), os quais constataram uma associação mútua e explícita entre os endófitos e seu hospedeiro, por meio da promoção do crescimento da planta *in vitro*. De acordo com Pamphile e Azevedo (2002), essa especificidade pode ser observada em nível de famílias, gêneros e espécies. Os resultados obtidos neste trabalho inferem que a especificidade vai muito além da espécie, tratando-se de uma especificidade entre clones ou mesmo, entre indivíduos do mesmo clone. Acrescenta-se ainda que o efeito benéfico das manifestações endofíticas sobre as plantas *in vitro*, seja devido à ação conjunta de um grupo de microrganismos, coexistindo em equilíbrio homeostático com as plantas, cujos mecanismos são altamente específicos e complexos.

Desta forma, pode-se inferir que, uma vez detectadas manifestações endofíticas em microplantas, e essas por sua vez não apresentarem deficiências ou sintomas de patogenicidade, as colônias bacterianas poderão ser mantidas, desde que controladas, perpetuando assim, a interação endófito/hospedeiro, dando continuidade ao cultivo *in vitro*, corroborando com Thomas et al. (2008a), os quais

sugerem respeitar a associação das bactérias endofíticas e seu hospedeiro durante os processos de micropropagação.

É importante ressaltar que para a conservação das manifestações endofíticas junto à microcepas, os subcultivos (renovação do meio de cultura) devem ser rigorosamente controlados, sendo 30 dias o período limitante para cada transferência de *E. benthamii*. Esse procedimento é fundamental, uma vez que a manutenção das microcepas por um período prolongado pode ocasionar a perda da disponibilidade de nutrientes e água nas condições *in vitro* (SRINATH; BAGYARAJ; SATYANARAYANA, 2003), acarretando assim em estresse, o qual por sua vez poderá ocasionar a quebra do equilíbrio estabelecido entre a microcepa e os microrganismos, bem como entre os microrganismos já manifestados e os microrganismos ainda latentes. De acordo com Abreu-Tarazi (2010) o uso de antibioticoterapia também pode acarretar o desequilíbrio homeostático, uma vez que para a remoção da microbiota epifítica ou mesmo das manifestações caracterizadas como contaminações, muitas vezes os endófitos são afetados.

Sendo assim, considera-se que nem toda presença microbiana *in vitro* é prejudicial às plantas micropropagadas, pelo contrário, observou-se que na maioria dos casos em *E. benthamii*, as manifestações possuem efeito neutro ou benéfico nas microcepas, para as duas principais características relacionadas ao desenvolvimento: incremento no número de brotações e na massa seca.

Dessa forma, métodos para o controle de manifestações bacterianas podem ser adotados, como, por exemplo, a transferência periódica das microcepas para novos meios de cultura, lavagem das microcepas com água estéril no momento da transferência (subcultivos) e limpeza das mesmas, retirando tecidos oxidados. Outra estratégia que vem sendo testada no laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Planta é a utilização de meios de cultura sem autoclavagem, os quais têm apresentado resultados promissores, indicando que o composto adicionado não somente tem controlado as manifestações como também mantido o vigor das microcepas.

Ponderando o atual panorama das biofábricas, as quais descartam inúmeras microplantas cultivadas *in vitro* em decorrência das manifestações bacterianas, evitar o descarte das microcepas e simplesmente controlar sua manifestação, pode representar a considerável minimização dos prejuízos tanto para as empresas, como

para setores de pesquisas, destacando-se que se deve levar em consideração o valor e a importância do material com manifestação.

7 CONCLUSÕES

Especificamente para as condições descritas nesse trabalho, e com base nos resultados apresentados, chegou-se às seguintes conclusões:

- ✓ A presença de manifestações endofíticas não prejudicou o desenvolvimento das microplantas de *E. benthamii* cultivadas *in vitro* e/ou *ex vitro*;
- ✓ A presença de manifestação endofítica não ocasionou alterações nas características anatômicas e bioquímicas dos clones de *E. benthamii*;
- ✓ As manifestações microbianas representam uma associação de bactérias endofíticas que podem promover o desenvolvimento das microplantas de *E. benthamii* *in vitro*;
- ✓ As variações nos níveis de malondealdeído não estão associadas às manifestações bacterianas e sim a alterações no metabolismo celular decorrentes dos processos bioquímicos e fisiológicos das microplantas a cada etapa da micropropagação;
- ✓ O isolado pertencente ao gênero *Curtobacterium* mostrou-se comum às manifestações de todos os clones de *E. benthamii* analisados;
- ✓ A especificidade da interação endófito/microplanta vai muito além da espécie, tratando-se de uma especificidade entre clones ou mesmo, entre indivíduos do mesmo clone;

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2010. Brasília, 2011.

ABREU-TARAZI, M.F. **Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia**. 2010. 137p. 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**, Oxford, v. 26, p. 555-560, 2010.

AIRES, P.S.R.; CARVALHO, J.M.C; PIMENTEL, N.W.; SILVA, H. Efeito da citocinina 6-bencilaminopurina na micropropagação *in vitro* da mamona utilizando o genótipo BRS nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 8, n. 2, p. 80-85, 2008.

AKIN-IDOWU, P. E.; IBITOYE, D. O.; ADEMOYEGUN, O.T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, New Zealand, v.8, n. 16, p. 3782-3788, 2009.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442p.

ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápice caulinar de pupunheira cultivados *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.5, 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. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1757-1764, 2009.

ALMEIDA, M; ALMEIDA, C.V.; GRANER, E.M.; BRONDANI, G.E.; ABREU-TARAZI, M.F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Report**, Heidelberg, v. 31, p. 1495–1515, 2012.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, S.L. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

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.

ALVAREZ, A.S.; SILVA, R.J.F. Anatomia foliar de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) oriundas da restinga de Algodão/Maiandeuá-Pará **INSULA Revista de Botânica**, Florianópolis, n. 41, p.83-94. 2012.

ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1715-1719, dez. 2006.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; AZEVEDO, J.L. Diversidade molecular de microorganismos endofíticos. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SILVA SANTOS, C.E.R. **Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008, p. 233-258.

ANDREOTE, F.D.; ROCHA, U.N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; van OVERBEEK, L.S.. 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.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.JR.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.JR.; VAN OVERBEEK, L.S.; ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ontario, v. 52, p. 419-426, 2006.

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, 2009.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v.204, p. 57-67, 1998.

APÓSTOLO, N.M.; BRUTTI, C.B.; LLORENTE, B.E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In vitro Cell Developmental Biological - Plant**, Columbia, v. 41, p. 307-313, 2005.

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

ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; KLEINER, A.A.P.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Guia Prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba: CALQ, v. 1, 2010.167p.

ARDANOV, P.; OVCHARENKO, L.; ZAETS, I.; KOZYROVSKA, N.; PIRTILÄ, A.M. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Biological Control**, Orlando, v. 56, p. 43-49, 2011.

ASLANTAFL, R.; CAKMAKCI, R.; FIAHIN, F. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple trees growth and fruit yield under orchard conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 111, p. 371-377, 2007.

ASMAR, S.A.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; ARAUJO, A.G.; PIO, L.A.S.; OLIVEIRA E SILVA, S. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.7, p. 1127-1131, 2011.

ASMAR, S.A.; RESENDE, R.F.; ARARUNA, E.C.; MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q. Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia Alba*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, p.149-153, 2012.

ASSIS, A.A.R. **Estudo de *Mycobacterium phlei* (ATCC 11758) como agente agregante para hematita e quartzo**. 2007. 69p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BOREM, A. (Ed) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: [s.n.], 2007. p. 93-121.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. p. 261-96.

ASSIS, T.F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 185, p.32-51, 1996.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.JR.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microorganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p.235-268.

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

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from levated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRÉ, P.; PROUTEAU, M.; BOUDET, A.M.; CHRIQUI, D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.51, p.9-16, 1997.

BACCARIN, F.J.B. **Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cam** 2012. 77p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v.331, p.806–814, 2008.

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**, Oxford, v.22, p. 707-712, 2006.

BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C; LANI, E.R.G. Aclimação *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 3, n. 5, p. 773 - 781, 2007.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* plant relations: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.

BASSO, L.H.M.; GONÇALVES, A.N.; SILVEIRA, L.V.A.; PACE, G.; LIMA, P. Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas *in vitro* Aluminum effect on *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots growth *in vitro*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 63, p. 167-177, 2003.

BELMONTE, U.C.F. **Variabilidade genética de isolados de *Curtobacterium* sp. associados a citros**. 2002. 67p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L.K.; BODANESE-ZANETTINI M.H.; PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.3, n.3, p.311-320, 2008.

BENKOVÁ, E.; MICHNIEWICZ, M.; SAUER, M.; TEICHMANN, T.; SEIFERTOVÁ, D.; JÜRGENS, G.; FRIML, J. Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. **Cell**, Cambridge, v.115, p. 591-602, 2003.

BENSON, D.; McDOUGALL, L. Ecology of Sydney plant species. Part 6 Dicotyledon family Myrtaceae. **Cunninghamia**, Mount Annan, v.5, n.4, p.809-987, 1998.

BENSON, D.H. Aspects of the ecology of a rare tree species, *Eucalyptus benthamii*, at Bents Basin, Wallacia. **Cunninghamia**, Mount Annan, v.1, n.3, p.371-383, 1985.

BENT, E.; BREUIL, C.; ENEBAK, S.; CHANWAY, C.P. Surface colonization of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* [Dougl. Engelm.]) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Paenibacillus polymyxa* under gnotobiotic conditions. **Plant Soil**, The Hague, v. 241, p.187-196, 2002.

BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.44, p.980-988, 1998.

BERDITSCH, A.; AFONIN, S.; ULRICH, A.S. The Ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to Produce the Antibiotic Gramicidin S is Correlated with Phenotype Variation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 20, p. 6620-6628, 2007.

BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M. DAS G.; GAVILANES, M.L.; SANTIAGO, E.J.A.; LAMEIRA, O.A. Micropropagação de *Tounefortia paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.1, p. 43-49, 2000.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion Plant Biology**, v.4, p.343-350. 2001.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. DE; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F. L. DE; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, The Hague, v.174, p.195-209, 1995.

BOSCARDIN, P.M.D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* MAIDEN CAMBAGE – MYRTACEAE**. 2009. 139p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOTTINI, R.; CASSA'N, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, p.497-503. 2004.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNIK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1158-1249.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.535-538, 1991.

BRONDANI, G.E. **Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii***. 2012. 184 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden ; Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.1, p.11-19, 2009a.

BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Determinação do tempo ótimo de enraizamento para miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. In: REUNIÓN ARGENTINA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, 28., 2010, La Plata. **Libro de resúmenes...** LaPlata: Asociación Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal, 2010. p. 194. 1 CD-ROM.

BRONDANI, G.E.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 667–674, 2010a

BRONDANI, G.E.; ONDAS, H.W.W.; BACCARIN, F. J.; GONCALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 478-487, Oct 2012.

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; ARAUJO, M.A.; PIRES, P.P. Ácido indolbutírico em gel para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 153–158, 2008.

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*: (II) sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 453-465, 2010b.

BRONDANI, G.E.; WIT ONDAS, H.W.; FIGUEIREDO, C.R.F.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Indução e expressão das respostas morfogênicas em cultura *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage (Angiospermae: Myrtaceae) em função de BAP e ANA. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 60., 2009b, Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: UEFS, 2009b. 1 CD-ROM.

BUNN, E.; SENARATNA, T.; SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K.W. *In vitro* propagation of *Eucalyptus phyllaxis* L. Johnson and K. Hill., a critically endangered relict from Western Australia. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.41, n.6, p.812-815, 2005.

CAKMAKCI, R.M., ERAT, U.G.; ERDO, A.N.; DONMEZ, M.F. The influence of PGPR on growth parameters, antioxidant and pentose phosphate oxidative cycle enzymes in wheat and spinach plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, New York, v.170, p.288-295, 2007.

CAKMAKCI, R.; KANTAR, F.; Algur, O.F. Sugar beet and barley yields in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* inoculation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, New York, v. 162, p. 437- 442, 1999.

CAKMAKCI, R.; KANTAR, F.; FIAHIN, F. Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, New York, v.164, p. 527-531, 2001.

CALDERÓN BALTIERA, X.; MONTENEGRO, G.; DE GARCÍA, E. Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globules*. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v.40, p.499–503, 2004.

CALVETE; E.O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M.H.; SUZIN, M. Anatomic analyses and biomass of strawberry plants cultivated *in vitro* and *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p.649-653, 2002.

CANBOLAT, M.; BILEN, S.; CAKMAKCI, R.; FIAHIN, F.; AYDIN, A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.42, p.350-357, 2006.

CANUTO, E.L.; SALLES, J.F.; OLIVEIRA, A.L.M.; PERIN, L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Resposta de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, Itaguai, v.37, p.67-72, 2003.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v. 69, p. 2-9, 1998.

CASTRO, M.M.; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: Appezzato-DA-GLÓRIA B, CARMELLO-GUERREIRO SM (Ed.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p.179-203.

CASTRO, R.A. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga**. 2011. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

CATAPAN, E.; OTUKI, M. F.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae). **Plant Cell and Organ Culture**, Dordrecht, v.62, p.195-202, 2000.

CHRISTOU, P.; SWAIN, W.F.; YANG, N.S.; McCABE, D. E. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soyben plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.86, n.19, p. 7500-7501, 1989.

COCKING, E.C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, p. 169-175, 2003.

COLLINS, M.D.; JONES, D. Reclassification of *Curtovacterium flaccunfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium ooti* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb, **Journal of General Microbiology**, Reading, v.129, p.3545-3548, Nov. 1983.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; AIT BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Appl. Environ. Microbiol Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p.71, p.1685-1693, 2005.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth promoting bacteria in the rhizo – and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.30, p. 669-678, may. 2010.

COSTA, L.E.O. **Diversidade genética, antagonismo microbiano e produção de fitases por bactérias endofíticas de folhas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)**. 2010. 98p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

CUNHA, A.C.M.C.M.; WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Produtividade e sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em sistema de hidroponia e em tubete. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 307–310, 2005.

DAVITT, A. J.; CHEN, C.; RUDGERS, J. A. Understanding context-dependency in plant–microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 71, p.137-145, 2011.

DE TOLEDO, B.F.B., MARCONDES, J.& LEMOS, E.G.M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, n.4, p.384-391, 2009.

DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, Washington, v.141, n.2, p.330-335, 2006.

DEWIR, Y.H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M.B.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia milii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 58, p. 93-99, 2006.

DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D. ; LACAVA, P.T.; TEIXEIRA, M.A.; ASSUMPTÃO, 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**, Oxford, v. 25, p.189-195, 2009.

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.

DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKÖ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). ***In vitro Embryogenesis in Plants***, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1995. p. 267-280.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Brasília, v.58, p.49-59, 2009.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SUZUKI, H.; SATO, Y.I.; MORISAKI, H.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 46, p. 617-629, 2000.

EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado de Santa Catarina**. Colombo: EMBRAPACNP. 1988. 113p.(Documentos, 21.).

ERIG, A. C.; SCHUCH, M.W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p. 575-581, 2005.

ESPOSITO-POLESI, N.P. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em micropilantas “axênicas”**. 2010. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ESPOSITO-POLESI, N.P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

FERREIRA, A. **Interação Entre Bactérias Endofíticas e do Rizoplane com *Eucalyptus***. 2008. 77p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FERREIRA, A.; QUECINE, A.C.; LACAVA, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.287, n.1, p.8–14, Oct. 2008.

FORD, Y.Y.; BONHAM, E.C.; CAMERON, R.W.F.; BLAKE, P.S.; JUDD, H.L.; HARRISON-MURRAY, R.S. Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy and a difficult to root plant. **Plant Growth Regulation**, New York, v.36, n.2, p.149-159, 2002.

FOYER, C.H.; DESCOURVIERES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell Environment**, Dordrecht, v.17, p.507-523, 1994.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiology Plant**, Berne, v.119, p.355-364, 2003.

FREITAS, J.R. Yield and N assimilation of winter wheat (*Triticum aestivum* L., var Norstar) inoculated with rhizobacteria. **Pedobiologia**, Jena, v.44, p.97-104, 2000.

GALDIANO JÚNIOR, R.F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas**. 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2009.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures **Plant Growth Regulation**, New York, v.37, p. 263-285, 2002.

GENEVE, R.; KESTER, S.; POMPER, K. Autonomous shoot production in pawpaw (*Aimonia triloba* (L.) Dunal) on plant growth regulator free media. **Propagation of Ornamental Plants**, Washington, v.7, n.2, p.51-56, 2007.

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

GONZÁLEZ, T.O. **Caracterização, diversidade genética e nodulação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) de isolados de rizóbios do Brasil e da Venezuela**. 2008. 72p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Jaboticabal, 2008.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Washington, v.26, p.192-195, 1951.

GOVINDARAJAN, R.; VIJAYAKUMAR, M.; SINGH, M.; RAO, C.H.V.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A.K.S.; PUSHANGADAN, P. Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.106, p. 57-61, 2006.

GRAÇA, M.E.C.; SHIMIZU, J.Y.; TAVARES, F.R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n. 39, p. 135-138, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPq, v.1, 1998, p. 183-260.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDEL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, n.8, p.1968–1977, 2007.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 44, n.2, p.136-142, 2008.

GUPTA, S.K.; KHANUJA, S.P. S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **Current Science**, Columbus, v. 81, n.2, 2001.

HALLMANN, J.; QUADTHALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HAN, J.; SUNA, L.; DONG, X.; CAIA, X.; SUNA, X.; YANGD, H.; WANGE, Y; SONGA, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, p. 66-76, 2005.

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.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915p.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.125, p.189-198, 1968.

HIGA, R.C.V.; PEREIRA, J.C.D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage**. (Comunicado Técnico, 100). Colombo: Embrapa Florestas-CNPQ, 2003. 4p.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus***: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Piracicaba: IPEF, 2000. 11 p. (IPEF. Circular Técnica, 192)

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ. 1998. p. 371-393.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; van MONTAGU, M.; KELLEMBERGER, E. Root colonizing and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in glasses. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, p. 913-1923, 1994.

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

JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNYAL, D.P. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.

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

KEELING, C.L.; BOHLMANN, J. Gene, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. **New Phytologist**, Cambridge, v.170, n.4, p.657-875, 2006.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CBA, v.2, 1999. p.519-530.

KLOPPER, J.W. RYU; C.M.; ZHANG, S. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v.94, p.1259-1266, 2004.

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**, Washington, v. 74, p. 2218-2228, 2008.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. Enviromental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.51, p.49-56, 1997.

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

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.39, p.55-59, 2004.

LARCHER W. **Physiological Plant Ecology**. New York:Springer Verlag. 1980. 530p.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A.C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 37, n.2, p.133-138, 2001.

LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p.83-88, 1998

LEMOES, M.T.O. **Prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em quatro espécies arbóreas nativas do Brasil**. 2009. 59p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2009.

LI, J.H.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.40, n.1, p.238-246, 2008.

LICHTENTHALER, J.; ELMAYAN, T.; FROMENTIN, J.; ELARAQUI, K.T.; VESA, S.; MOREL, J.; VERRIER, J.L.; CAILLETEAU, B.; BLEIN, J.P.; SIMON-PLAS, F. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.22, n.7, 868-881, 2009.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 37, n. 3, 2001.

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

LIMA, R. V.; LOPES, J. C.; SCHMILDT, E. R.; MAIA, A. R.. Germinação *in vitro* de urucu. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29, n.1, p. 171-177, 2007.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Elmsford, v. 30, p. 421-427, 1980.

LONDE, L.N.; SOUSA, C.S. de; 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**, Uberlandia, v.23, n.3, p.94-100, 2007.

IPOSZYK, M.M.; KONTEK, R.; JANAS K.M. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.72, v.2, p. 596-602, Febr. 2009.

LORENZI, H. et al. **Árvores exóticas no Brasil**. Nova Odessa, São Paulo: Ed. Instituto Operacionais, 384p. 2003.

LUTTS. S.; D KINET, J.M. Les effets des stress sur la croissance et le développement: vue synoptique. **Société Royale des Sciences**, Liège, v.67, p. 117-136, 1998.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, R.M.; ZARPELON, T.G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.6, p. 843-851, 2005.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHTH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in *Brazilian sugarcane*. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.9, n.1, p.250-258, 2010.

MAIA, V. **Técnica histológica**. São Paulo:Atheneu,1979. 246p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319p.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1201-1206, 2006.

MANO, H.; MORISAKI, H. Endophytic bacteria in rice plant. **Microbes and Environments**, Paris, v.23, p.109-117, 2008.

MARIANO, R.L.M.; SILVEIRA, I.B.SAYONARA MARIA ; ASSIS,P.; GOMES, A.M.A; NASCIMENTO, A.R.P.; DONATO, V.M.T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 1, p.89-111, 2004.

MARINO, G.; ALTAN, A.D.; BIAVATI, B. The effect of bacterial contamination on the growth and gas evolution of *in vitro* cultured apricot shoots. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, New York, v.32, p.51-56, 1996.

MARINO, G.; GAGGIA, F.; SAIANO, F.; BIAVATI, B.; MARANGONI, B. Elimination of *in vitro* bacterial contaminants in shoot cultures of 'MRS 2/5' plum hybrid by the use of *Melia azedarach* extracts. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.123, p.195-205, 2009.

MARQUES JUNIOR, R.; CANELLAS, L.P.; SILVA, L.G. ; OLIVARES, F.L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.32, p.1121-1128, 2008.

MEDEIROS, J.D. Anatomia foliar de *Eugenia umbelliflora* Berg (Myrtaceae). **Biotemas**, Florianópolis, v.13, n.1, p.7-20, 2000.

MEINS, F. Jr.; SELDRAN, M. Pseudo directed variation in the requirement of cultured plant cells for cell-division factors. **Development**, Oxford, v.120, n.5, p.1163-1168, 1994.

MEINS, F.Jr. Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.23, p.395-408, 1989.

MELLO, M.R.F. **Efeito de bactérias na promoção de crescimento e no biocontrole da fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas**. 2001. 93p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2001.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.29, p.315-332, 2006.

MONCALEÁN, P.; ALONSO, P.; CENTENO, M.L.; CORTIZO, M.; RODRÍGUEZ, A; FERNÁNDES, B.; ORDÁS, R.J. Organogenic response of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. **Tree Physiology**, Oxford, v.5, p.1-9, 2005.

MORAES, C.P.; JOSÉ ALBERTO DIOGO, J.A; CANABRAVA, R.I.; PEDRO, N.P.; FURTADO, A.L.F.F.; MARTELINE, M.A. Desenvolvimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lind. (Orchidaceae) em recipientes de diferentes volumes. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.8, n.2, p.225-228, abr./jun. 2010.

MORRETES, B.L.; FERRI, M.G. Contribuição ao estudo da anatomia de folhas de plantas do cerrado. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP**, São Paulo, v.16, p.7-70, 1959.

MOURA, V.P.G.; GUIMARÃES, D.P. **Produção de mudas de *Eucalyptus* para o estabelecimento de plantios florestais**. Comunicado Técnico. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 85p.

MULLINS, K.V.; LLEWELLYN, D.J.; HARTNEY, V.J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E.S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.16, p.787-791, 1997.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology; **Kluwer Academic Publishers**, The Netherlands, v.73, p. 127-141, 1998.

NEUMANN, K.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology Basics and Application**, Germany: Springer. 2009. 333p.

NILSEN, E.T.; ORCUTT, D.M. **The Physiology of Plants under Stress – Abiotic factors**, New York: John Wiley, 1996. 696p.

NOWAK, J. Benefits of *in vitro* “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In vitro Cell and Development Biology Plant**, Largo, v.34, p.122-130, 1998.

PAIVA, H.N.; GOMES, J.M.; COUTO, L.; SILVA, A.R. Propagação vegetativa de eucalipto por estaquia. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.185, p.23-27, 1996.

PALHARES, D. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae Jussieu). **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 29-36, 2003.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P.E.T.; FERREIRA, C.A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 45p. (Documentos, 129).

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 & Biotechnolo**, Oxford, v. 18, n. 5, 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 & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.43, p.614–622, 2007.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1997. 159p.

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

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.3795-3801, 2002.

PAZ, I.C.; SANTIN, R.C.; GUIMARÃES, A.M.; ROSA, O.P.; DIAS, A.C.; QUECINE M.C.; AZEVEDO, J.L.; MATSUMURA, A.T. *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.11, n.4, p.3711-20, Oct. 2012.

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

PEDRAZA, R.O.; RAMÍREZ-MATA, A.; XIQUI, M.L.; BACA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.233, p.15-21, 2004.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; Araujo, A.R. B.; Januário, A.H.; Lourenço, M.V.; França, S.C. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell and Organ Culture**, Dordrecht, v.60, p.47-53, 2000.

PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.R.L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p.827-834, 2003.

PEREIRA, R.M.; DA SILVEIRA, E.L.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, p.1921-1927, 2008.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.22, p.187-193, 2011.

PINTO, J.E.B.; LAMEIRA, O.A. **Micropropagação e metabólitos secundários in vitro de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 101p.

PIOTTO, F.A. **Avaliação de tolerância ao Cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.** 2012. 114p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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.

POLESSKAYA, O.G.; KASHIRINA, E.I.; ALEKHINA, N.D. Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v.51, p. 615-620, 2004.

POTTERS, G.; PASTERNAK, T.P. ; GUISEZ, Y.; PALME, K.J.; JANSEN, M.A.K. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? **Trends in Plant Science**, Oxford, v.12, p. 98-105, 2007.

PREECE, F.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micro propagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.71-93.

PROCÓPIO, R.E.L. **Diversidade de bactérias endofíticas de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 68p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

PROCÓPIO, R.E.L.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, Jr; AZEVEDO, J.L. Characterization of na endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirao Preto, v.8, n.4, p.1408-1422, 2009.

PRYOR, L.D. **Australian endangered species: *Eucalyptus***. Canberra: Commonwealth of Australia, 1981. 139p.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.H.; XU, L.H.; LI, W.J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, n.89, p. 457-473. 2011.

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.

RAMOS, H.J.O.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Strategies for bacterial tagging and gene expression in plant-host colonization studies. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.43, p.1626-1638, 2011.

RAO, M.V.; PALIYATH, G.; ORMROD, D.P. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Washington, v.110, p.125-136, 1996.

REDDY, P.S.; RODRIGUES, R.; RAJASEKHARAN, R. Shoot organogenesis and mass propagation of *Coleus forskohlii* from leaf derived callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.66, p.183-188, 2001.

REVA, O. N.; SOROKULOVA, I.B.; SMIRNOV, V.V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Britain, v.51, p.1361-1371, 2001.

REZENDE, J.C.; CARVALHO, C.H.S.; SANTOS, A.C.R.; PASQUAL, M.; MENDES, A.N.G. Influência de auxina e citocinina no desenvolvimento de embriões somáticos de *Coffea arabica* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.7, n.1, p.1-8, 2011

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.1201-1204, 2005.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.19, p.827-837, 2006.

RUSSOWSKI, D. **Nitrogênio e Fósforo na micropropagação de *Ptaffia aglomerata* (Spreng.) Pedersen**. 2001. 120p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

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

SANTOS, L.D.T.; THADEO, M.; IAREMA, L.; MEIRA, R.M.S.A.; FERREIRA, F.A. FOLIAR ANATOMY AND HISTOCHEMISTRY IN SEVEN SPECIES OF *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.32, n.4, p.769-779, 2008.

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

SANTOS-SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; SOARES, T.L.; SILVA, K.M. Meios Nutritivos para Micropropagação de Plantas. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz da Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

SCHMILDT, E.R.; TEIXEIRA, S.L.; SCHMILDT, O. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* do mamoeiro 'Sunrise Solo Line 72/12' e 'Tainung 01'. In: MARTINS, D. dos S. (Ed). **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: INCAPER, 2005. p. 221-224.

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

SCHWAMBACH, J.; RUEDELL, C.M.; ALMEIDA, M.R.; PENCHEL, R.M.; ARAÚJO, E.F.; FETT-NETO, A.G. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidennii* minicuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. **New Forests**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 261-271, 2008.

SEMPREBOM, T.R. **Glutamina e metabolismo antioxidante durante a organogênese adventícia em folhas de *Ananas comosus***. 2008. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SERRANO, L.; ROCHANGE, F.; SEMBLAT, J.P.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C.; BOUDET, A.M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.47, p.285-290, 1996.

SHARMA, V.; NOWAK, J. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.44, p. 528–536, 1998.

SILVA, A.B.; LEITE, H.A.C.; DE SOUZA, J.T.; LOGUERCIO, L.L. Efeito do uso de bactérias endofíticas na promoção de crescimento e tolerância à seca em mudas de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55., 2009. Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: SBG, 2009. 57p.

SKOOG, F.; MULLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society of Experimental Biology**, Cambridge, v.11, n.118-131, 1957.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NERY, F.C.; VARGAS, D.P.; SILVA, D.R.G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.1, p. 152-157, 2011.

SOLANO, B.R.; BARRIUSO, J.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J. Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions** - strategies and techniques to promote plant growth. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008, p.41-54.

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.

SOUZA, S.A. **Diversidade de bactérias endofíticas em bananeira ‘Prata-anã’**. 2011. 101p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2011

SRINATH, J.; BAGYARAJ, D.J.; SATYANARAYANA, B.N. Enhanced growth and nutrition of micropropagated *Ficus benjamina* to *Glomus mosseae* co-inoculated with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus coagulans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.19, p.69-72, 2003.

STUDHOMES, D.J.; DOWNIE, J.A.; PRESTON, G.M. Protein domains and architectural innovation in plant-associated Proteobacteria. **BMC Genomics**, San Diego, v.6, n.1, p.1-17.

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

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.

SUMNER, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**, New York, v.12, p.54-123, 1990.

SUNDARA, B.; NATARAJAN, V.; HARI, K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yield. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.77, p.43-49, 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**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) ver. 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.24, p.1596-1599, 2007.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**, The Hague, v. 329, p. 421-431, Apr. 2010.

THOMAS, P. Isolation of *Bacillus pumilus* from *in vitro* grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, p.114-123, 2004.

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.; KUMARI, S.; SWARNA, G.K.; GOWDA, T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and host–endophyte interaction *in vitro* and *in vivo*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.53, p.380-390, 2007b.

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, 2007a.

THOMAS, P.; PANICKER, B.; JANAKIRAM, T.; SATHYANARAYANA, B. N. *In vitro* propagation of 'Arka Ravi' chrysanthemum on growth regulator-free medium harbouring endophytic bacteria. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Washington, v.84, p. 653- 659, 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.; 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.; SWARNA, G. K.; PATIL, P.; RAWAL, R. D. Ubiquitous presence of normally non-cultivable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.93, p.39-54. 2008a

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, 2008b.

THORPE, T.A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.37, n.2, p.169-180, 2007.

TIBOK, A.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, Oxford, v.110, p.139- 145, 1995.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.6, p.665-673, 2002.

TOLEDO, C.P. **Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar**. 2011. 71p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TOLEDO, M.Z.; FONSECA, N.R.; CÉSAR, M.L.; SORATTO, R.P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIO, C.A.C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania v. 39, n. 2, p. 124-133, 2009.

- TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetais**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8th .ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 894p.
- TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Hormones and hormone-like substances of microorganisms: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.42, p.229-235, 2006a.
- TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.42, n.2, p.117-126, 2006b.
- ULRICH, K.; ULRICH, A.; EWALD, D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. - **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.63, n.2, p.169-180, 2008.
- VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J.S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.45, n.5, p.371-380, 2005.
- VEGA-HERNÁNDEZ, M. C., LEON-BARRIOS, M., PÉREZ-GALDONA, R. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.34, p. 665-668, 2002.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v.255, p.571-586, 2003.
- VIDAVER, A.K. The plant pathogenic corynebacteria. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.36, p.495-517, 1982.
- WATT, M.P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, n.3, p.233-240, 2003.
- WEBER, O.B; CORREIA, D.; ROCHA, M.W.; ALVEZ, G.C.; OLIVEIRA, E.M.; SÁ, E.G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, p.1419-1426, 2003.
- WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia**, 1999. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- WENDLING, I.; BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; HANSEL, F.A. Mini-cuttings technique: a new *ex vitro* method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 343–353, 2010.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 681-689, 2005.

WIT ONDAS, H.W.; BRONDANI, G.E.; FIGUEIREDO, C.R.F.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Exposição ao frio e análise histológica no enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 17., 2009, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: FMVZ, 2009. 1 CD-ROM.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas *in vitro*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.51, p.29-36, 1997.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 55-74.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura Clonal (Princípios e Técnicas)**. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 272p.

XIE, G.H.; CAI, M.Y.; STERINBERGR, Y. Cultovavle heterotrophic N₂- fixing bacterial diversity in Rice fields in teh Yangtze River Plain. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 37, p. 29-38, 2003.

ZHENG, Y.; XUE, Q.Y.; XU, L.L.; XU, Q.; LU, S.; GU, C.; GUO, J.H. A screening strategy of fungal biocontrol agents towards Verticillium wilt of cotton. **Biological Control**, Orlando, v.56, p. 209-216, 2011.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B. FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G, VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p.2198-2208, 2002.