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

**Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias
endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto**

Gabriela Ferraz Leone

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

**Piracicaba
2013**

Gabriela Ferraz Leone
Bióloga

**Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no
processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto**

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

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

**Piracicaba
2013**

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

Leone, Gabriela Ferraz

Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto / Gabriela Ferraz Leone.- - Piracicaba, 2013.

99 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Micropropagação 2. Eucalipto 3. Manifestação microbiana 4. Agentes antimicrobianos
5. Bactérias endofíticas I. Título

CDD 634.9734
L583e

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

À toda minha família,
em especial aos meus pais e ao meu irmão!

Dedico

Ofereço

À todos os meus mestres,
desde a infância até os dias de hoje!

*“Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre ramos muito leves,
sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas.”*

Victor Hugo

AGRADECIMENTOS

Como não poderia deixar de ser, agradeço primeiramente à Deus, por ter me concedido o grande milagre, que é a vida. E por todas as graças que alcancei, com o auxílio dos meus anjinhos que sempre me guiaram pelos caminhos que percorri.

Ao Professor Marcílio de Almeida, que sempre foi mais que um orientador. Agradeço pela sua confiança, paciência, sábios conselhos e sua enorme alegria em trabalhar.

À Dra. Cristina Vieira de Almeida, pelo carinho de sempre, pela paciência a cada dúvida, disponibilidade e amizade.

Ao Professor Antônio Natal Gonçalves pela colaboração e disponibilidade do espaço em seu laboratório para execução de parte deste trabalho.

Ao Professor Fernando Dini Andreote pela disponibilização de seu laboratório, além de todo o auxílio neste trabalho.

À toda equipe do laboratório de Microbiologia do Solo, por todo auxílio prestado durante as análises moleculares.

Aos técnicos Beto e Eveline por todo auxílio, carinho e amizade.

Aos queridos amigos da amada ‘Família Morfogênese’ (Chico, Érika, Fabi, Germana, Gilvano, Kathy e Fernando, Leandro, Lívia, Marília, Natália, Priscila, Rafinha, Raquel), pelo carinho, pelas risadas e por toda ajuda prestada.

Aos meus ‘pais científicos’, Marcílio e Cris, que sempre me trataram com muito amor e carinho, e de quem “herdei” os princípios fundamentais de qualquer trabalho: a ética, a dignidade e o humanismo, obrigada por TUDO! Tenho o maior orgulho de ser uma das ‘filhas científicas’ de vocês.

À minha maior cúmplice, minha mãe Elisete, pelo amor de sempre e principalmente por sua força avassaladora.

Ao meu pai João Mario por sempre me incentivar.

Ao Rafa, que sempre soube ser mais que irmão, agradeço pelo amor e amizade da vida toda.

Aos meus avós Lúcia, Joaquim, Clara e Ézio (*in memoriam*) por desde cedo terem me mostrado o verdadeiro sentido da palavra ‘família’.

À toda minha família pelo apoio e amor da vida inteira;

Aos meus amigos de infância que sempre foram os meus ‘magic beans’.

Ao Gustavo, pelo carinho de sempre.

Às minhas queridas Nicole, Ana Paula e Giulia, que me mostraram que a amizade sempre supera qualquer dificuldade.

À todos os amigos da graduação, que sempre tornaram tudo muito mais divertido. Em especial à minha querida Giana (*in memoriam*) que sempre me apoiou e vibrou com todas minhas vitórias.

À Maria Solizete Granziol Silva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por toda atenção e carinho prestada ao longo do curso;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/ USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela oportunidade concedida, contribuindo desta forma, com o acréscimo em minha formação.

À *InVitroPalm* Consultoria, Estudo e Desenvolvimento Biológico Ltda. por todo o auxílio científico prestado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), protocolo número 2011/15861-6, pela bolsa de Mestrado para execução do projeto.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

*“A gratidão é único tesouro dos humildes”
William Shakespeare*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 <i>Eucalyptus</i>	23
3.2 Nutrição Mineral	24
3.3 Cultivo <i>in vitro</i>	26
3.4 Bactérias endofíticas	28
3.5 Interação endófito x vegetal	30
3.6 Agentes Antimicrobianos	31
3.7 O uso de agentes antimicrobianos nos vegetais	34
3.8 Análise Molecular	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Localização da área experimental	37
4.2 Material vegetal	37
4.3 Cultivo <i>in vitro</i>	39
4.3.1 Terapia com agentes antimicrobianos	40
4.3.2 Avaliações do desenvolvimento das microcepas	42
4.4 Análises Histológicas e Histoquímicas	42
4.5 Avaliação Nutricional	43
4.6 Análise molecular	43
4.6.1 Extração do DNA genômico total	43

4.6.2 Amplificação dos genes por PCR	43
4.6.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....	44
4.7 Análise estatística	45
5 RESULTADOS	47
5.1 Terapia com agentes antimicrobianos	47
5.2 Avaliações do desenvolvimento das microcepas.....	50
5.3 Análises Histológicas e Histoquímica	51
5.4 Avaliação Nutricional.....	63
5.5 PCR-DGGE	66
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	85

RESUMO

Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto

A presença de bactérias no cultivo *in vitro* de plantas é normalmente relacionada à contaminação, acarretando o descarte de microplantas de alto valor comercial. No entanto, essa presença pode ser caracterizada como “manifestações”, decorrentes de possíveis estresses físicos ou nutricionais, da microbiota endofítica, que coloniza ativamente os tecidos vegetais, e que não necessariamente, afeta o desenvolvimento da planta. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi controlar a manifestação bacteriana, preservando as microcepas de *Eucalyptus cloeziana* em desenvolvimento *in vitro*, adicionando-se ao meio de cultura, os antibióticos gentamicina, ciprofloxacina, rifampicina, timentin (isolados ou combinados entre si) e o biocida clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona. O monitoramento do trabalho foi realizado por meio de avaliações semanais, visando verificar possíveis influências dos agentes antimicrobianos na morfofisiologia do vegetal e a eficiência no controle das manifestações bacterianas. Para tanto, foram avaliados parâmetros referentes ao incremento de massa seca, número de brotações, teor de acúmulo de nutrientes, análises histológicas e histoquímicas das microcepas. Para verificar possíveis flutuações das comunidades bacterianas endofíticas nas microcepas, utilizou-se a técnica de DGGE. Todas as análises foram realizadas aos 15 e 30 dias após a adição dos agentes antimicrobianos no meio de cultura, exceto a avaliação nutricional que foi feita apenas no final do experimento (30 dias). Os resultados obtidos permitiram inferir que ao longo dos 30 dias de cultivo, o antibiótico gentamicina, ocasionou queda no desenvolvimento das microcepas e não foi eficiente no controle das manifestações bacterianas. Os antibióticos rifampicina e ciprofloxacina apesar de não serem efetivos no controle da manifestação bacteriana, não afetaram o desenvolvimento das microcepas. Conclui-se que, o biocida clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona efetivamente controlou as manifestações bacterianas, sem alterar a morfofisiologia das microcepas, bem como o timentin, que além de controlar as manifestações, proporcionou maior vigor das microcepas em função da melhor assimilação dos nutrientes.

Palavras-chave: Micropropagação; Eucalipto; Manifestação microbiana; Agentes antimicrobianos; Bactérias endofíticas

ABSTRACT

Protocol establishment to control the manifestation of endophytic bacteria in the process of *Eucalyptus in vitro* multiplication

The in vitro bacterial presence in plant cultivation, usually is related to contamination, resulting in the elimination of the microplants with high commercial value. However, this presence can be characterized as “manifestations” arising from possible physical or nutritional stresses, from microbial endophytic that actively colonize plant tissues, and do not necessarily affect plant development. Therefore, the purpose of this study was to control the bacterial manifestation, preserving in vitro developing of *Eucalyptus cloeziana* microstumps, by adding to the culture medium, the antibiotics gentamicin, ciprofloxacin, rifampicin, timentin (alone or combined) and biocide + chloromethyl isothiazolinone methyl-isothiazolinone. The monitoring work was conducted through weekly evaluations, to verify the possible influence of antimicrobial agents in the plant morphophysiology and the efficient control of bacterial manifestations. Therefore, were evaluated parameters related to the increase in dry weight, number of buds, content of nutrient accumulation, histological and histochemical the microstumps. DGGE technique was used to check possible fluctuations of endophytic bacterial communities in microstumps. All analyzes were performed at 15 and 30 days after the addition of antimicrobial agents in the culture medium, except for the nutritional assessment that was made only at the end of the experiment (30 days). The results allow to infer that over the 30 days of culture, the antibiotic gentamicin, resulted in the microstumps development decrease and was not effective in controlling bacterial manifestations. The antibiotics rifampicin and ciprofloxacin although were not effective in controlling the bacterial manifestation, affected the development of microstumps. It was concluded that the biocide chloromethyl-methyl-Isithiazolinone + Isothiazolinone effectively controlled the bacterial manifestations without modifying the morphophysiology of the microstumps, well as the timentin, which besides controlling the manifestations, provided greater vigor of microstumps due to better assimilation of nutrients.

Keywords: Micropropagation; *Eucalyptus*; Manifestation microbial Antimicrobial agents, Endophytic bacteria

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A e B - Matrizes selecionadas de *E. cloeziana* na Estação Experimental de Ciências Florestais de Anhembi, SP (ESALQ/USP), usadas como fontes de explantes para o cultivo *in vitro*. 37
- Figura 2 - Mega estacas de matrizes selecionadas de *E. cloeziana*. A: mega estacas mantidas em casa de vegetação. B: Brotações epicórmicas em mega estaca utilizada para cultivo *in vitro* (setas) 37
- Figura 3 - Esquema representativo da metodologia realizada para execução do trabalho 38
- Figura 4 - Segmento nodal oriundo de brotações epicórmicas de mega estaca de *E. cloeziana* introduzido *in vitro*. Setas = Brotações dos segmentos nodais introduzidos *in vitro* 39
- Figura 5 - Microcepa assintomática de *E. cloeziana* com manifestação bacteriana (setas) 40
- Figura 6 - Microcepas de *E. cloeziana* submetidas a tratamento com agentes antimicrobianos por 15 dias. A: T1 testemunha (isento de antibiótico); B: T2 gentamicina; C: T3 rifampicina; D: T4 ciprofloxacina; E: T5 gentamicina + rifampicina; F: T6 gentamicina + ciprofloxacina; G: T7 rifampicina + ciprofloxacina; H: T8 gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina; I: T9 clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (biocida); J: T10 timentin 47
- Figura 7 - Microcepas de *E. cloeziana* submetidas a tratamento com agentes antimicrobianos por 30 dias. A: T1 testemunha (isento de antibiótico); B: T2 gentamicina; C: T3 rifampicina; D: T4 ciprofloxacina; E: T5 gentamicina + rifampicina; F: T6 gentamicina + ciprofloxacina; G: T7 rifampicina + ciprofloxacina; H: T8 gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina; I: T9 clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (biocida); J: T10 timentin 48
- Figura 8 - Cortes histológicos transversais na região da nervura central em folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: testemunha (T1) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C e D: gentamicina (T2) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: rifampicina (T3) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: ciprofloxacina (T4) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I e J: gentamicina + rifampicina (T5) aos 15 e 30 dias de tratamento. Setas vermelhas indicam a presença de glândulas de óleo, setas pretas estômatos, FV = feixe vascular, EAb = epiderme abaxial, EAd = epiderme adaxial. Barras: 10 µm 56
- Figura 9 - Cortes histológicos em folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: gentamicina + ciprofloxacina (T6) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C e D: ciprofloxacina + rifampicina (T7) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina (T8) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (T9) aos 15 dias e 30 dias de tratamento; I e J: timentin (T10) aos 15 e 30 dias de tratamento. Seta verde indica protuberância epidérmica, setas pretas estômatos, FV = feixe vascular, EAb = epiderme abaxial, EAd = epiderme adaxial. Barras: 10 µm 57
- Figura 10 - Cortes histológicos do mesofilo de folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: T1 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C e D: T2 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: T3 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: T4 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I e J: T5 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Setas indicam a presença de glândulas de óleo. Barras: 50 µm 58

Figura 11 - Cortes histológicos do mesofilo de folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: T6 aos 15 dias e 30 dias de tratamento (epiderme adaxial), respectivamente; C e D: T7 aos 15 dias e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: T8 aos 15 dias de tratamento e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: T9 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I: T10 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Seta indica a presença de glândulas de óleo. Barras: 50 µm..... 59

Figura 12 - Cortes histológicos da nervura central de folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: T1 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C e D: T2 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: T3 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: T4 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I e J: T5 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Barras: 50 µm 61

Figura 13 - Cortes histológicos da nervura central de folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A: T6 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C: T7 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E: T8 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G: T9 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I: T10 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Barras: 50 µm 62

Figura 14 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) gerada a partir de resultados do gel de DGGE de amostras de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à tratamentos com agentes antimicrobianos pelo período de 15 dias. T1 = testemunha (isento de antibiótico); T2 = gentamicina; T3 = rifampicina; T4 = ciprofloxacina; T5 = gentamicina + rifampicina; T6 = gentamicina + ciprofloxacina; T7 = rifampicina + ciprofloxacina; T8 = gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina; T9 = clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (biocida) e T10 = timentin 67

Figura 15 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) gerada a partir de resultados do gel de DGGE de amostras de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à tratamentos com agentes antimicrobianos pelo período de 30 dias. T1 = testemunha (isento de antibiótico); T2 = gentamicina; T3 = rifampicina; T4 = ciprofloxacina; T5 = gentamicina + rifampicina; T6 = gentamicina + ciprofloxacina; T7 = rifampicina + ciprofloxacina; T8 = gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina; T9 = clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (biocida) e T10 = timentin 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos tratamentos terapêuticos com agentes antimicrobianos.....	41
Tabela 2 - Parâmetros adotados para avaliação das microcepas	42
Tabela 3 - Representação qualitativa das médias das notas obtidas a partir das avaliações para vigor das microcepas e manifestação bacteriana aos 15 e aos 30 dias de tratamento.....	49
Tabela 4 - Incremento em massa seca e número de brotações nas microcepas de <i>E. cloeziana</i> após 15 dias na etapa de multiplicação <i>in vitro</i> sob terapia com antimicrobianos	50
Tabela 5 - Incremento em massa seca e número de brotações nas microcepas de <i>E. cloeziana</i> , após 30 dias na etapa de multiplicação <i>in vitro</i> sob terapia com antimicrobianos	51
Tabela 6 - Intensidade de compostos fenólicos em células epidérmicas e feixes vasculares, de folhas de microcepas de <i>E. cloeziana</i> , submetidas 15 dias ao tratamento com agentes antimicrobianos	53
Tabela 7 - Intensidade de Compostos fenólicos em células epidérmicas e feixes vasculares de folhas de microcepas de <i>E. cloeziana</i> submetidas 30 dias ao tratamento com agentes antimicrobianos	54
Tabela 8 - Valores reais da quantidade do acúmulo de macronutrientes nas microcepas avaliadas de <i>E. cloeziana</i> , em relação aos tratamentos utilizados com agentes antimicrobianos	63
Tabela 9 - Valores reais da quantidade de acúmulo de micronutrientes nas microcepas avaliadas de <i>E. cloeziana</i> submetidas a agentes antimicrobianos por 30 dias	65

1 INTRODUÇÃO

A técnica de micropropagação utiliza matrizes selecionadas de plantas de interesse agrícola e/ou florestal, para obtenção de clones saudáveis e geneticamente idênticos, resultando na multiplicação de inúmeras mudas em curto período de tempo e espaço físico reduzido.

Em relação às essências florestais, as espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* vem se destacando nos estudos para obtenção de clones micropropagados. Empresas de papel e celulose, têm aplicado esta técnica há muito tempo para otimizar a produção, preservar e obter de maneira rápida e uniforme, microestacas de genótipos superiores de eucaliptos. Adicionalmente, a técnica de micropropagação tem extrema importância em programas de multiplicação, cujo objetivo é maximizar ou manter o valor genético da matriz selecionada, dando vantagem a novos desenvolvimentos e melhorias de métodos para clonagem de árvores adultas de genótipos selecionados em sistemas clonais.

Todavia, apesar de sua importância, muitos são os entraves para o sucesso da técnica de micropropagação, sendo um dos maiores, a contaminação microbiana, normalmente resultante de falhas durante a manipulação ou assepsia do material vegetal, acarretando o descarte dos propágulos em desenvolvimento. Inúmeras vezes, porém, o que é caracterizado contaminação, é na verdade, a manifestação de microrganismos endofíticos latentes que, após longos períodos de cultivo são exsudados pelo hospedeiro manifestando-se no meio de cultura, em razão de estresses abióticos, como deficiência nutricional, alteração do pH, intensidade luminosa ou outros.

Pesquisas com microrganismos endofíticos são realizadas mais frequentemente em plantas cultivadas *in vivo*, no entanto, crescentes são os trabalhos que relatam a presença destes em plantas cultivadas *in vitro*, as quais, como já mencionado, são caracterizadas como contaminação. Tendo em vista que um dos principais objetivos desta técnica é justamente o desenvolvimento de plantas caracterizadas como “axênicas”, ou seja, isentas de microrganismos, tais ocorrências são consideradas prejudiciais as microplantas, sendo somente identificadas e estudadas por meio de microscopia de luz e eletrônica, e por análises moleculares.

Durante o processo de micropropagação, embora estes microrganismos vivam em equilíbrio com seu hospedeiro, ao longo dos subcultivos é comum a presença de colônias de microrganismos, principalmente bactérias, no meio de cultura ou sobre as microplantas. Muitos são os trabalhos que associam o desenvolvimento de colônias bacterianas a uma competição destas com o vegetal, por nutrientes do meio de cultura, comprometendo assim a multiplicação e desenvolvimento das microplantas. Dessa forma, o que antes era considerado contaminação,

pode ser caracterizado como *manifestação de microrganismos endofíticos*, que não foram eliminados durante o processo de desinfestação superficial, por estarem naturalmente presentes no interior de células ou tecidos da planta.

Considerando-se os benefícios que os microrganismos endofíticos proporcionam ao seu hospedeiro, avalia-se a possibilidade de não se descartar as microplantas que apresentam essa manifestação bacteriana, mas sim controlar seu desenvolvimento, uma vez que, sob controle, esses microrganismos podem atuar decisivamente na fisiologia da planta, auxiliando-a em seu crescimento, adaptação, regeneração e aclimatização.

Assim, o aprimoramento de técnicas que visam o controle dessas manifestações durante o cultivo *in vitro*, é de extrema importância para manter a interação microrganismo e vegetal, sendo uma das estratégias para o controle das manifestações bacterianas o uso de agentes antimicrobianos, os quais são adicionados aos meios de cultura.

Neste contexto, o presente trabalho selecionou a espécie *Eucalyptus cloeziana*, que apesar de pouco descrita na literatura, é destacada no setor florestal para fins energéticos, comercial e alto potencial para reflorestamento. Adicionalmente, a espécie apresenta facilidade para micropropagação, apesar da ocorrência constante de manifestações bacterianas e em função disto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos eficientes para o controle químico dessas manifestações, sem interferência nos processos morfogênicos das microplantas, durante os processos de micropropagação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Controlar a manifestação bacteriana por meio de agentes antimicrobianos, para minimizar perdas durante os processos de multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus cloeziana*.

2.2 Objetivos Específicos

- (i) Estabelecer protocolos para controlar a manifestação bacteriana em microcepas de *E. cloeziana* com aplicações de antibióticos naturais, sintéticos e semi-sintéticos e/ou biocida;
- (ii) Avaliar eventuais alterações morfológicas e histoquímicas causadas pelos agentes antimicrobianos aplicados durante o cultivo *in vitro*;
- (iii) Aferir alterações no acúmulo de macro e micronutrientes das microcepas, nos tratamentos aplicados;
- (iv) Investigar por meio de técnicas biomoleculares, possíveis flutuações na microbiota bacteriana endofítica nas microcepas de eucalipto.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus*, originário da Austrália, Indonésia e ilhas próximas, é cultivado em diversas partes do mundo. Pertencente à família Myrtaceae apresenta cerca de 600 espécies e subespécies com ampla plasticidade e dispersão mundial, sendo que no Brasil são conhecidas cerca de 400, distribuídas em aproximadamente cinco milhões de hectares de plantações. Além da extensa gama de variedades, as espécies apresentam rápido crescimento e ampla aplicabilidade, principalmente pelo uso do caule para extração de celulose e industrialização de papel e óleos essenciais obtidos de suas folhas (COTTERILL; BROLIN, 1997; ZANUNCIO et al., 1998; ESTANISLAU et al., 2001).

As espécies de eucaliptos são muito utilizadas no mundo para estabelecimento de plantações em áreas tropicais e subtropicais. Segundo dados da ABRAF (2012), a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, em 2011 a área de plantios de *Eucalyptus* spp. no Brasil totalizou 4.873.952 ha de área plantada, representando crescimento de 2,5% (119.617 ha) em relação a 2010, e os estados que possuem maior destaque no plantio de eucaliptos são: Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. As regiões Sul e Sudeste são as maiores detentoras das áreas de plantios deste gênero no país, o que pode ser justificado em função da localização das principais unidades industriais dos segmentos de papel e celulose, siderurgia (carvão vegetal) e madeira mecanicamente processada. O principal fator deste crescimento foi o estabelecimento de novos plantios, frente à demanda futura dos projetos nas indústrias de Papel e Celulose.

O eucalipto é a espécie florestal mais cultivada para fins comerciais no Brasil (CAMPOE et al., 2012), sendo que sua preferência ocorre devido ao rápido crescimento, produção de madeira com grande aplicabilidade, além de ser facilmente adaptada e gerenciada em diferentes ambientes (ZANUNCIO et al., 1998).

Das espécies conhecidas do gênero *Eucalyptus*, menos de 1% são utilizadas pelas indústrias. Desta forma, o uso do eucalipto na indústria mundial é baseado em duas espécies, principalmente: *E. globulus*, *E. grandis* e seus híbridos como *E. urophylla*. As espécies *E. viminalis* e *E. dunnii*, predominam na região sul (COTTERILL; BROLIN, 1997).

No Brasil, o *E. cloeziana* foi introduzido há mais de 20 anos, em razão da sua aplicabilidade para fins energéticos, por possuir boa densidade e altos teores de carbono fixo, requisitos esse imprescindível à produção de carvão vegetal (OLIVEIRA et al., 1984; VITAL;

DELLA LUCIA, 1986; ROTUNDO, 1993; PASSADOR, 1994). A espécie também destaca-se por apresentar madeira de coloração castanho-amarelada, com alta densidade e por ser extremamente durável. Tais qualidades ressaltam o potencial no uso desta espécie em programas de florestamento e reflorestamento, sendo também indicado na construção civil, dormentes e postes, entre outras aplicações (BOLAND et al., 1984; BOLAND; BROPHY; HOUSE, 1991; MOURA; MELO; SILVA, 1993).

De acordo com Lorenzi et al. (2003), no Brasil esta espécie tem melhor desenvolvimento em regiões subtropicais, como sudeste e sul do país. Entretanto, Almeida (2006), ressaltou que na literatura existem poucos trabalhos relacionados ao *E. cloeziana*, pois é considerada por muitos como uma espécie de difícil propagação, por apresentar-se recalcitrante ao enraizamento de estacas, mesmo sendo de extrema importância na área florestal.

De acordo com Ferreira et al. (2004) um grande inconveniente no cultivo de eucalipto é a variação na capacidade de enraizamento existente entre espécies e clones do gênero. Assis (1997) acrescenta que, a redução gradual do potencial de enraizamento, pode estar envolvida com o envelhecimento ontogênico das matrizes selecionadas. Com o uso da técnica de cultura de tecidos vegetais, é possível obter o rejuvenescimento dos propágulos, isto ocorre devido à alta taxa de multiplicação que acelera os programas de propagação clonal, o que permite o enraizamento de espécies como o *Eucalyptus* (BACCARIN, 2012).

A micropropagação vegetal tem se mostrado valiosa para o setor florestal por garantir pequenas variações genéticas do explante original, permitindo cópias idênticas produzidas a partir do material genético selecionado, estratégia que tem despontado como uma excelente alternativa para as dificuldades de enraizamento da espécie (ROTUNDO, 1993; ALFENAS, 2004; NEHRA et al., 2005).

3.2 Nutrição Mineral

Os meios de cultura são substratos onde as microplantas (plantas micropropagadas) são cultivadas. Basicamente, são constituídos por combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Os meios nutritivos utilizados para as culturas fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas.

O crescimento e desenvolvimento das plantas dependem de muitos fatores, além da luz, água e gás carbônico e do fluxo contínuo de sais minerais, que embora requeridos em pequenas quantidades, têm fundamental importância para o desempenho das principais funções metabólicas da célula (BONATO et al., 1998).

Os nutrientes empregados nos meios de cultura são os mesmos estabelecidos para a nutrição mineral básica das plantas no campo, pois são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais, tendo grande importância, tanto na ciência básica, como na aplicada. Inúmeras pesquisas são realizadas nesta área, principalmente para compreender os mecanismos de absorção dos nutrientes e suas funções no metabolismo vegetal.

Teores adequados de macro e micronutrientes, especialmente nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e boro, são essenciais ao desenvolvimento dos vegetais (MENGEL; KIRKBY, 1987; BLAZICH, 1988; ASSIS; TEIXEIRA, 1998; ANSARI et al., 2004; CASTRO, 2007), pois tem um papel fundamental na regulação morfogênética (HIGASHI, 1996; RAMAGE; WILLIAMS, 2002), e o meio de cultura é o componente mais abundante dentre todos os fatores considerados. A disponibilidade, absorção, transporte e metabolismo dos nutrientes minerais participam na formação de meristemas e órgãos e no subsequente crescimento. O balanço existente entre nitrogênio, fósforo e cálcio é essencial, tanto para a morfogênese, como para o crescimento, e os íons potássio, magnésio e enxofre parecem cumprir papel de suporte (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Almeida (2012) cita que a importância do estímulo dos micronutrientes é notória, havendo assim, uma clara necessidade de explorar seu papel morfogênico com mais detalhe. As funções dos microelementos nos vegetais estão ligadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas, fosfatases e também na síntese de auxinas, ácido ribonucleico (RNA) e aminoácidos, estando intimamente relacionado ao metabolismo do nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2004). Ramage e Williams (2002) afirmam que o papel dos micronutrientes no controle da regeneração *in vitro* tem recebido pouca atenção, apesar de ser notório que alguns aumentam a regeneração significativamente.

Nesse contexto, é de extrema importância a avaliação do estado nutricional das microplantas quando cultivadas *in vitro* na presença de microrganismos junto ao meio de cultivo, uma vez que, segundo Pereira, Mattos e Fortes (2003), tais microrganismos quando manifestados, passam a competir tanto pelos nutrientes quanto pelos carboidratos do meio de cultura, o que por sua vez acarreta no comprometimento da multiplicação e o desenvolvimento dos propágulos, resultando em tecidos necrosados, redução da proliferação de brotações, menor taxa de enraizamento e até mesmo a morte das microplantas.

3.3 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* pode ser definido como a cultura de células isoladas, de um grupo de células, de tecidos ou órgãos, sob condições assépticas, em ambiente artificial com temperatura, umidade, fotoperíodo e irradiância controlados (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). A técnica se inicia com a escolha do melhor explante a ser utilizado, bem como a escolha do meio de cultivo ideal para a cultura em questão (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; XIAO; NIU; KOZAI, 2011).

Trata-se de uma ferramenta bastante utilizada no melhoramento genético, por ser uma alternativa para propagação de genótipos resistentes a doenças, onde se obtêm clones saudáveis e geneticamente uniformes, tendo em vista que foram gerados a partir de uma planta matriz devidamente selecionada (HARTMANN et al., 2011; WEBER et al., 2004). Melo (2000), relata que além de estar envolvida na multiplicação sistematizada de plantas, esta técnica também está envolvida com o chamado intercâmbio de material genético; resgate de germoplasma e preservação de material ameaçado; redução no período de germinação; isenção de pragas e doenças e uniformização nas mudas obtidas.

Também conhecida como micropropagação, esta técnica é de extrema importância para a biotecnologia vegetal, uma vez que suas aplicações são empregadas na propagação de espécies de interesse comercial, ecológico, agrícola, silvicultural, ornamental e farmacêutico, sendo desta forma, uma ótima alternativa para propagação (MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994; KERBAUY, 1997).

Desta maneira, a micropropagação vegetal possibilita a obtenção de clones saudáveis e geneticamente uniformes, promovendo, desta forma, uma propagação maciça, em um ambiente reduzido, além da produção de inúmeros propágulos em um curto período de tempo, em qualquer época do ano, com uma cultura padronizada gerada de uma matriz devidamente selecionada (GUIMARÃES; PASQUAL; MIRANDA, 1999; MELO et al., 1999; OLIVEIRA; SILVEIRA; SILVA, 2001).

A técnica de cultura de tecidos tem grande destaque no setor florestal e possui mais comprovações de aplicações (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007), principalmente por permitir menores variações genéticas em relação à matriz original (NEHRA et al., 2005).

De acordo com Dutra, Wendling e Brondani (2009), o *Eucalyptus* é o gênero florestal que mais possui estudos relacionados com a micropropagação. Os autores Ratnieks e Assis (1993), recomendam a utilização da técnica para espécies e híbridos de *Eucalyptus* que têm elevado valor comercial e dificuldades no enraizamento.

Almeida (2012) relata que o melhoramento de espécies lenhosas para florestas plantadas é muito importante para o desenvolvimento do setor florestal, especialmente para espécies do gênero *Eucalyptus* que apresentam elevada importância econômica, sendo o desenvolvimento de métodos biotecnológicos, fundamental para a obtenção de maior produtividade em áreas menores, por meio da seleção de fenótipos com características de alta adaptabilidade em sistemas de plantio.

Para Chaperon (1987), a micropropagação de *Eucalyptus* pode ser utilizada quando outras técnicas de propagação não apresentam resultados satisfatórios para a espécie de interesse, quando a matriz escolhida não pode ser rejuvenescida por brotações basais ou ainda, quando se deseja aumentar a taxa de propagação e abreviar o tempo para o uso comercial.

Os eucaliptos, como a maioria das espécies florestais, apresentam rotação relativamente longa, dificuldade no cruzamento para a produção de grande quantidade de híbridos, além da seleção de genótipos para características importantes demandar alguns anos, podendo tornar o melhoramento demorado (WIECHETECK, 1990).

De acordo com Paz et al. (2012), plantações clonais de *Eucalyptus* têm aumentado nos últimos anos, no entanto, alguns clones que possuem qualidades de alta produção têm dificuldades quanto a propagação, por apresentarem dificuldades no desenvolvimento radicular e aéreo.

Com o auxílio da micropropagação, busca-se o rejuvenescimento de matrizes adultas de eucaliptos para que haja a quebra da recalcitrância rizogênica, característica deste gênero. Baccarin (2012) ressalta que o potencial de enraizamento e vigor dos propágulos de árvores maduras aumentam com os sucessivos subcultivos *in vitro*. Para os autores Dutra, Wendling, Brondani (2009) é necessário pelo menos 12 subcultivos para que ocorra o rejuvenescimento de clones de eucaliptos, melhorando assim seu enraizamento.

Para que a cultura de tecidos seja bem sucedida, é necessário o conhecimento de biologia vegetal no que se refere a aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos e anatômicos. Desta forma, os conhecimentos destes aspectos, podem ser aprofundados no estudo de plantas micropropagadas, uma vez que, as vias metabólicas e bioquímicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células *in vitro*, embora existam alguns processos que possam sofrer inativação e/ou controle devido a essas condições de cultivo e o estado de diferenciação das células (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

A morfogênese vegetal está relacionada às fases de desenvolvimento do vegetal, desde a célula individualizada até a planta como um todo, bem como as mudanças estruturais em células e tecidos, podendo gerar embriões somáticos ou órgãos adventícios. É a integração

entre os processos de crescimento (mudanças quantitativas) e diferenciação (alterações qualitativas), mediada por divisão e especialização celular, conduzindo assim, a uma estrutura organizada (HANDRO; FLOH, 1990; ALMEIDA, 1994), em resposta a um complexo controle hormonal múltiplo, espacial e temporal, através da regulação e expressão de sistemas gênicos múltiplos. Na planta *in vivo* é mediada pela ação dos meristemas e de seus produtos. Na planta *in vitro*, ao se romper as correlações endógenas, os tecidos ficam sujeitos às condições exógenas, representadas pelos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura (GUERRA; NODARI, 2006), ou ainda, por aqueles produzidos pela ação de bactérias endofíticas.

No entanto, apesar de todas essas vantagens que a cultura de tecidos vegetais apresenta, uma grande dificuldade encontrada está no aparecimento de colônias microbianas. Normalmente são relacionadas às contaminações causadas por desinfestações ineficientes ou até mesmo manipulação do material no laboratório, erros de manuseio e/ou instrumentação mal esterilizada. Acredita-se que uma forma de se evitar essas contaminações está na escolha de uma planta matriz de alta qualidade sanitária, além do cuidado básico e essencial com o material no laboratório, já que o grande problema causado por essas contaminações bacterianas está na perda do material genético, bem como o tempo e recursos investidos, além da possibilidade em se contaminar as demais plantas estabelecidas na mesma sala de cultivo (THOMAS; PRAKASH 2004, THOMAS et al. 2008, THOMAS; KUMARI 2010; PINHAL et al., 2011).

Para que o resultado da clonagem vegetal seja bem sucedido, é necessário que seu cultivo seja realizado sob condições assépticas, sendo este o principal objetivo da técnica de micropropagação (ESPOSITO-POLESI, 2011). No entanto, mesmo que se atinja o sucesso no estabelecimento da cultura, ou seja, sem microrganismos aparentes, muitas vezes, após longos períodos ou devido a estresses mecânico, físico ou nutricional, ocorre o aparecimento de colônias bacterianas na superfície ou sobre o vegetal. Levando-se em conta o fato de que essas colônias não tenham se manifestado nos primeiros dias do cultivo *in vitro*, estas não necessariamente são caracterizadas contaminação, considerando-se o fato de que não afetam o desenvolvimento do vegetal e, muitas vezes, apresentam associações benéficas (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; PIRTILÄ et al., 2008; THOMAS et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; ABREU-TARAZI et al., 2010; ESPOSITO-POLESI, 2011; BATAGIN-PIOTTO, 2013).

3.4 Bactérias endofíticas

Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior dos vegetais, sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro ou estruturas externas visíveis. Embora ainda existam

aqueles que classifiquem micorrizas e rizóbios como sendo endófitos estes não entram nessa definição, por promoverem alterações morfológicas no vegetal hospedeiro (HALLMAN et al., 1997; AZEVEDO et al., 2000; BRESSAN; VASCONCELLOS, 2002; AZEVEDO; ARAÚJO, 2003; LACAVA et al., 2006).

Os benefícios que as bactérias endofíticas proporcionam ao seu hospedeiro são inúmeros, e estão direta ou indiretamente associados à nutrição e consequentemente, ao desenvolvimento dos vegetais (SILVA, 2008). Além disso, têm importante papel na indução de resistência sistêmica. Sua penetração ativa no vegetal, com hidrólise da celulose, pode ocasionar uma hipersensibilidade, ativando desta forma mecanismos de defesa da planta. Estão também envolvidos na produção de fitorreguladores (IZUMI et al., 2007; QUECINE et al., 2012), atuando como promotores de crescimento e auxiliando na sobrevivência da planta, no controle biológico de doenças (GAI et al., 2011), bem como fixação do nitrogênio, solubilização do fósforo e auxílio em fitorremediação (GOMES et al., 2003; LACAVA et al., 2006; SILVA, 2008; ESPOSITO-POLESI, 2011).

Em cultura de tecidos, mesmo não apresentando manifestação no meio de cultura aos quais seus hospedeiros vinham sendo cultivados, os endófitos foram observados em plantas sadias e assintomáticas, ou seja, sem qualquer evidência de contaminação ou manifestação microbiana, com auxílio de microscopia de luz e eletrônica, bem como análises moleculares e microbiológicas, quebrando então o paradigma de que plantas cultivadas *in vitro* são axênicas (BARROW et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; ABREU-TARAZI et al., 2010), estes microrganismos foram encontrados no interior dos tecidos de abacaxizeiro (ABREU-TARAZI, 2010); banana (THOMAS et al., 2008); batata (GARBEVA et al., 2001); cana-de-açúcar (ESPOSITO-POLESI, 2010; TOLEDO, 2011); citros (ARAÚJO et al., 2002); eucalipto (ANDREOTE et al., 2009a; ESPOSITO-POLESI, 2010); pupunheira (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005), entre outros.

Quando estes microrganismos deixam o tecido vegetal ao qual estavam colonizando e passam para o meio de cultura, são os responsáveis por grande parte das perdas das plantas que vinham sendo cultivadas *in vitro*. Vale lembrar que apenas neste momento as bactérias endofíticas podem se tornar prejudiciais ao vegetal (TOLEDO, 2011). Os endófitos podem se expressar logo após a introdução do explante *in vitro* ou então permanecerem latentes por certo período de tempo.

Desta forma, o que antes era considerado como contaminação, pode agora ser caracterizado como manifestação de microrganismos presentes no interior dos tecidos vegetais

e que durante o processo de desinfestação superficial, não foram eliminados (PANICKER et al., 2007).

Neste contexto, uma maneira eficaz de se evitar o descarte de plantas micropropagadas, que apresentem a manifestação de microbiana endofítica, é o controle do crescimento dessa manifestação, evitando que se torne prejudicial ao desenvolvimento do vegetal. Ressaltando que, de forma controlada, esses microrganismos endofíticos, podem estar diretamente envolvidos com a fisiologia do vegetal, influenciando em seu crescimento, adaptação, regeneração e aclimatização (NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004; LACAVA et al., 2006; PIRTILÄ et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; BALDOTTO et al., 2010).

Desta maneira, estudos como o de Abreu-Tarazi (2010), vêm trabalhando com a aplicação de agentes antimicrobianos ao meio de cultura, buscando o controle da manifestação bacteriana endofítica em plantas cultivadas *in vitro*.

3.5 Interação endófito x vegetal

A interação existente entre o endófito e seu hospedeiro vem sendo muito estudada, para se entender o mutualismo e/ou simbiose existente por parte das bactérias endofíticas, bem como a relação com patógenos. Devido ao fato de se ter inúmeras interpretações sobre a definição de microrganismos endofíticos, considera-se como sendo fungos, bactérias e actinomicetos, que em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, habitam o interior de vegetais (CARROLL, 1986; PETRINI, 1991), podendo colonizar órgãos, e tecidos nos espaços inter e intracelulares (AZEVEDO; ARAÚJO, 2003; STROBEL, 2003; ALMEIDA et al., 2009). Os microrganismos endofíticos podem ser comensais, não tendo efeito direto sobre o vegetal e mutualísticos, interagindo no metabolismo e na fisiologia do vegetal, podendo ajudar no desenvolvimento da planta, tendo destaque a produção de reguladores de crescimento (ARAÚJO et al., 2001; SCHULZ; BOYLE, 2005; TSAVKELOVA et al., 2006; RYAN et al., 2008;).

Ryan et al. (2008), acrescentam como vantagens que estes microrganismos exercem no vegetal, a potencialização do desenvolvimento das plantas hospedeiras micropropagadas, por seu envolvimento na solubilização do fosfato, produção do ácido indol acético (AIA), ajuste osmótico, regulação estomática, absorção de minerais e metabolismo e acúmulo de nitrogênio.

Serafini, Barros e Azevedo (2002) acreditam que a cultura *in vitro* é uma ferramenta muito importante para investigar a interação existente entre plantas e endófitos, principalmente devido ao fato de que as influências ambientais são facilitadas, bem como os nutrientes que serão absorvidos pelo vegetal, em decorrência da produção maciça e velocidade de crescimento das plantas (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005). Trabalhos como o de Gai et al. (2011),

estudam a possibilidade do uso de endófitos como um veículo no controle de fitopatógenos e de insetos, lembrando que os microrganismos endofíticos e os fitopatogênicos, colonizam nichos ecológicos similares no vegetal, podendo existir uma competição nesses nichos, prevenindo assim, que os patógenos se estabeleçam como hospedeiro. Os endófitos atuam como agentes biocontroladores, através da síntese de compostos estruturais, como sideróforos e enzimas extracelulares, além da indução e expressão de genes ligados à imunidade do vegetal.

Seguindo-se assim, o contexto da definição de endófitos que colonizam internamente o vegetal, estes têm distinção dos patógenos, por não causarem doenças ao hospedeiro, e dos epifíticos, que vivem na superfície vegetal (AZEVEDO, 1998). No entanto, ainda assim, essa definição é puramente didática, já que esta distinção é muito tênue, não havendo um limite claro, apenas um gradiente entre elas. Abreu-Tarazi (2010), ressalta que um endófito pode tornar-se patógeno de acordo com condições ambientais as quais é submetido, e um microrganismo que até então era considerado epifítico, pode, de alguma forma, penetrar no vegetal, tornando-se assim, endofítico. Cabe ressaltar que, caso haja algum desequilíbrio no decorrer do desenvolvimento da planta, endófitos podem acabar tornando-se patógenos aos seus hospedeiros (SILVA, 2006). Existem autores que consideram a relação endófito-hospedeiro, como sendo simbiótica e muito provavelmente, mutualística (GUO et al., 2008).

Além disso, de acordo com seu grau de interação com o vegetal, os microrganismos endofíticos podem ser denominados de facultativos ou verdadeiros (PAMPHILE; AZEVEDO, 2002; HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). Ryan et al. (2008), acrescenta que essa interação pode ser considerada como sendo comensalismo, simbiose, mutualismo ou trofobiose, caracterizada pela capacidade de sobrevivência de um ser vivo apenas se houver alimento adequado à sua disposição.

Considerando-se a grande influência que os endófitos exercem no desenvolvimento do vegetal, o estudo sobre a comunidade endofítica vem tendo grande destaque. Acredita-se que houve uma co-evolução entre os endófitos e seus hospedeiros, já que possuem uma associação muito íntima entre eles (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990). Essa co-evolução é, por muitos autores, comprovada pela capacidade destes microrganismos produzirem compostos que auxiliam no desenvolvimento vegetal (TOLEDO, 2011).

3.6 Agentes Antimicrobianos

Agente antimicrobiano é um termo que faz referência tanto aos antibióticos, quanto aos agentes quimioterapêuticos. Antibióticos são substâncias de origem biológica (produzidos por microrganismos), e os quimioterapêuticos são agentes químicos sintéticos. Entretanto, de forma

geral é utilizado o termo antibiótico para mencionar todos os agentes antimicrobianos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1996; MAYER, 2006).

Os agentes antimicrobianos são agrupados de acordo com sua origem, biossíntese, espectro de ação, estrutura química ou mecanismo de ação. São substâncias tóxicas para bactérias, podendo matá-las (ação bactericida) ou inibir seu crescimento (ação bacteriostática) (FOX, 2006). Em bactérias, os alvos de ação dos agentes antimicrobianos são: parede celular, membrana citoplasmática, e os processos de biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos (PELCZAR; CHANE; KRIEG, 1997). Porém, nenhuma destas classificações citadas é satisfatória quando se trata de rotular um antibiótico. Desta forma, os antibióticos utilizados para interesse clínico são dispostos nos seguintes grupos: β -lactâmicos, glicopeptídios, polimixina B, macrolídeos, lincosamidas, cloranfenicol, tetraciclina, aminoglicosídeos, sulfonamidas + trimetoprim, quinolonas, metronidazol e ansamicina (MEDGRUPO, 2008).

A rifampicina é um antibiótico semi-sintético do grupo das rifamicinas (MOUTON et al., 2000), apresentam amplo espectro de ação sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micobactérias, e estafilococos produtores de penicilinas, que primariamente tem ação bacteriostática, porém, observa-se também efeito bactericida devido ao fato de os microrganismos apresentarem sensibilidade a este antibiótico, por inibir a iniciação da síntese de RNA por se ligarem à subunidade β da RNA polimerase (di MAURO et al., 1969; TRAVERS; BURGESS, 1969; JIN; ZHOU, 1996;), o que pode impedir assim, a transcrição de informações genéticas, formando complexos estáveis com a RNA polimerase dos microrganismos sensíveis. (LACAZ, 1975; YOUNG; HUTCHINS; CANFIELD, 1984; SPINOSA, 1996). Este antibiótico foi desenvolvido na década de 60, sendo utilizado em duas formas principais como fármaco anti-tuberculose (LESTER, 1972), e como ferramenta para análises bioquímica e genética dos mecanismos intracelulares de vários processos.

Os antibióticos do grupo β -lactâmicos, são utilizados por inibirem a síntese da parede celular bacteriana, bloqueando desta forma a divisão celular das bactérias (TAMBARUSSI, 2009). Antibióticos desse grupo são bactericidas apenas quando as bactérias estão na fase de crescimento ativo (MEDIIVILLA, FLÓREZ E GARCÍA-LOBO, 1997). Dentre os principais antibióticos deste grupo, se encontram: timentin, ceforaxima e carbenicilina (TAMBARUSSI, 2009). O timentin é uma mistura entre ticarcilina, um derivado da penicilina e ácido clavulânico (NAUERBY; BILLING; WYNDAELE, 1997).

Outro grupo de antibióticos amplamente utilizados são os aminoglicosídeos, formados por um grupo amino e um glicosídeo com ação bactericida para a maioria das bactérias aeróbias Gram-negativas e algumas Gram-positivas. São responsáveis pela inibição da síntese

de proteínas nas bactérias, ao ligarem-se à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a leitura correta do RNA mensageiro e, conseqüentemente, a síntese da proteína correspondente. Essa ação é irreversível, impedindo a iniciação da síntese protéica e ainda reduzem a síntese já iniciada (FOX, 2006). Os principais antibióticos dessa classe são: canamicina, gentamicina, estreptomicina, neomicina, entre outros (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006; ABREU-TARAZI, 2010).

As quinolonas e fluoroquinolonas são grupos relacionados aos derivados do ácido nalidíxico, e possuem como principal representante a classe das ciprofloxacinas, bactericidas efetivos tanto contra bactérias Gram-negativas, quanto Gram-positivas. As quinolonas penetram no citoplasma das bactérias através dos canais de porinas ou da camada fosfolipídica. No interior das células, estes antibióticos agem sobre a subunidade A da enzima bacteriana DNA-girase (DNA topoisomerase II), importante na desnovelação do DNA na divisão celular da bactéria. Elas impedem a função da DNA topoisomerase II, provocando o relaxamento da espiral de DNA que ocupará um grande espaço dentro do citoplasma, levando ao rompimento da célula bacteriana (FOX, 2006).

Antimicrobianos industriais, ou biocidas, diferem dos antibióticos pelo fato de serem em geral, menos específicos e, portanto, menos provável que induzam a resistência bacteriana (BALLANTYNE; JORDAN, 2004).

Os biocidas são muito populares e são utilizados com diversas finalidades, principalmente como conservantes em produtos como cosméticos, artigos de higiene pessoal e de limpeza doméstica, além de terem a grande vantagem de prevenir o crescimento de bactérias patogênicas e não patogênicas no produto ao qual é inserido. Na década de 1980, o principal produto utilizado como conservante era o formaldeído, no entanto, uma publicidade negativa do produto, que alegava ameaça a saúde do seu manipulador, fez com que caísse em desuso. Sendo assim, da união de duas isotiazolinonas com alto potenciais como biocidas, e que não apresentavam risco à saúde humana, estabeleceu-se o uso do biocida clorometil-isotiazolinona (5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one) em adição à metil-isotiazolinona (2-metil-4-isotiazolin-3-one). Desta forma surgiu a primeira isotiazolinona mista, tendo como principal característica sua alta eficiência contra bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), fungos e algas. Este produto chegou ao mercado com a proposta de substituir nas funções já realizadas pelos demais biocidas e, também passou a ser utilizado para a fabricação de papel e em água de piscinas, além de uma ampla variedade de aplicações nas indústrias (WRIGHT et al., 1983; GROOT; WEYLAND, 1988).

Estudos como o de Knee (2000), idealizaram o uso deste biocida clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona em plantas, com o intuito de proteger os vasos do xilema do acúmulo de microrganismos em flores de cortes. O autor cita que além de proteger do ataque de microrganismos, o produto não afetou o desenvolvimento do vegetal.

3.7 O uso de agentes antimicrobianos nos vegetais

O principal objetivo da técnica de cultura de tecidos é a obtenção de plantas saudáveis, ou seja, a erradicação de patógenos das plantas é pré-requisito para seu cultivo *in vitro*, pois só nessas condições consideram-se as microplantas isentas de doenças (como mencionado no item 3.2), para tanto, a introdução do material *in vitro* requer uma desinfestação superficial, removendo assim, a microbiota epifítica. Para plantas que são cultivadas *in vitro*, a manifestação endofítica pode ser extremamente prejudicial, podendo levar à redução nas taxas de crescimento, multiplicação e enraizamento e, dependendo do caso, podem acarretar a morte do explante (FANG; HSU, 2012).

Por este motivo, o controle destes microrganismos é de fundamental importância, e o uso de antibióticos e biocidas é uma alternativa viável para se evitar o descarte dessas culturas. Considerando-se sua importância na medicina e, conseqüentemente, na indústria farmacêutica, o uso de antibióticos contra bactérias em plantas, vem sendo estudado desde a década de 50 até hoje, na tentativa de aproveitar o potencial bactericida ou bacteriostático dos antibióticos, para evitar a patogenicidade de algumas bactérias no cultivo *in vitro* (ANDERSON; GOTTLIEB, 1952). De acordo com Fang; Hsu (2012), os microrganismos endofíticos devem ser combatidos quando manifestados no cultivo *in vitro* de plantas, desta forma, uma maneira eficaz para que haja este controle está no uso de agentes antimicrobianos, que são incorporados ao meio de cultura por períodos que variam de dias a meses, podendo assim, conduzir a eliminação ou a redução da manifestação bacteriana (KULKARNI et al., 2007). Além disso, produtos utilizados na comunidade médica podem ser muito eficazes, para o controle de microrganismos no cultivo *in vitro* de plantas.

Por agirem de maneira específica devem ser administrados cuidadosamente para evitar fitotoxicidade e/ou desenvolvimento de resistência (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003; KULKARNI et al., 2007). De acordo com Crisan et al. (1995), um dos grandes problemas relacionados à utilização de antibióticos, está no seu uso inadequado, podendo levar à seleção de microrganismos mutantes ou patogênicos resistentes.

O uso de antibióticos no cultivo *in vitro* de plantas, pode ser muito útil quando se trata de sua função como agentes antimicrobianos, no entanto, testes preliminares para fitotoxicidade são necessários para evitar efeitos negativos, como repercussões sobre a capacidade de regeneração do material, bem como manter sua estabilidade genética (SILVA et al., 2003).

3.8 Análise Molecular

A grande vantagem do uso de técnicas moleculares está na compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento de suas interações com outros componentes da biodiversidade, como as plantas hospedeiras (SOBRAL, 2003). As análises independentes de cultivo têm permitido um estudo mais aprofundado da diversidade microbiana, o que anteriormente só era possível graças às análises dependentes de cultivo (HUGHES et al., 2001).

A diversidade das comunidades bacterianas pode ser avaliada pela amplificação em reações em cadeia da polimerase (PCR), a partir de regiões variáveis do gene ribossomal 16S rRNA para bactérias, que vem permitindo avanços consideráveis no estudo de comunidades bacterianas, excluindo os problemas e limitações devidos a baixa culturabilidade (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; ANDREOTE, 2007).

A aplicação destas metodologias no estudo da diversidade de bactérias tem permitido a descoberta de um número extenso de novas linhas evolutivas neste grupo. Métodos independentes de cultivo tendem a complementar os métodos baseados em isolamento e cultivo, para a realização de levantamentos e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (HUGENHOLTZ; GOEBEK; PACE, 1998; HUGENHOLTZ; PACE, 1996; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). Além disso, essa diversidade e estrutura podem ser avaliadas pela variabilidade das sequências do gene 16S para bactérias, após sua amplificação em reações em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), em somatória às técnicas de *fingerprinting* como ARDRA (*“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”*), DGGE (*“Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis”*), TGGE (*“Temperature Gradient Gel Electrophoresis”*), RISA (*“Ribosomal Intergenic Spacer Analysis”*), ARISA (*“Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis”*), T-RFLP (*“Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism”*) e SSCP (*“Single-strand Conformation Polymorphism”*) (MUYZER, 1999; GARBEVA et al., 2001; ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; ABREU-TARAZI et al., 2010).

Dentre todas as técnicas acima citadas, para o estudo de populações microbianas complexas, o DGGE identifica diferenças baseadas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA (SOBRAL, 2003), e se destaca por fornecer uma rápida caracterização das comunidades microbianas, sendo estas cultiváveis ou não cultiváveis (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2006), separando fragmentos de DNA de mesmo tamanho, obtidos por amplificação de uma região específica de um gene pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante de uréia e formamida (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

O padrão de migração desses fragmentos (*amplicons*, bandas) no gel de DGGE é resultado da composição de nucleotídeos dos mesmos e seu teor G+C (LAMBAIS et al., 2005). No entanto, esta técnica não é o suficiente para determinar e identificar diretamente espécies ou grupos taxonômicos em uma amostra (JOYNT et al., 2006), e de acordo com Lambais et al. (2005), para isto, é necessário a excisão da banda do gel para posterior sequenciamento.

Ainda cabe salientar que, com o uso da técnica de DGGE para investigar comunidades bacterianas associadas às plantas, deve-se ter um cuidado especial para que se minimizem interferências por parte das organelas vegetais, cloroplastos e mitocôndrias, que possuem origem procariótica que possuem exemplares do gene 16S rRNA remanescentes, podendo concorrer, desta forma, com a amplificação do DNA bacteriano. Com o intuito de eliminar essa interferência, sugere-se o uso dos *primers* 799f (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1492r (HEUER et al., 1997) para aumentar a concentração do DNA bacteriano, antes da amplificação com grampo GC (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009).

Vários trabalhos já foram realizados para o estudo de comunidades endofíticas em espécies vegetais como abacaxi (ABREU-TARAZI, 2010; ABREU-TARAZI et al., 2010); banana (THOMAS et al., 2008); citros (ARAÚJO et al., 2002; ANDREOTE et al., 2006); soja (SOBRAL, 2003); pupunheira (ALMEIDA et al., 2009; ESPOSITO-POLESI, 2010) e até mesmo em eucalipto (ANDREOTE et al., 2009a, 2009b; ESPOSITO-POLESI, 2010), demonstrando que esta técnica tem grande importância para compreensão da diversidade microbiana cultivável ou não.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização da área experimental

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas e no Laboratório de Fisiologia de Árvores, no Departamento de Ciências Florestais, ambos pertencentes à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP – Piracicaba/SP.

4.2 Material vegetal

Matrizes selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* (Figura 1), procedentes da Estação Experimental de Ciências Florestais de Anhembi, SP (ESALQ/USP) foram utilizadas para este trabalho. Brotações oriundas de mega estacas, obtidas e estabelecidas *in vitro* pelo doutorando Leandro Silva de Oliveira (PPG em Recursos Florestais/ESALQ/USP) foram utilizadas para introdução *in vitro* (Figura 2). As matrizes são resultados do plantio de progênies de 25 árvores, cujas sementes são provenientes da Austrália (CSIRO 14425, Lat. 26018', Long. 152018', Alt. 600m, Gympie, Queensland, Austrália).

Figura 1 - **A** e **B** - Matrizes selecionadas de *E. cloeziana* na Estação Experimental de Ciências Florestais de Anhembi, SP (ESALQ/USP), usadas como fontes de explantes para o cultivo *in vitro*

Figura 2 - Mega estacas de matrizes selecionadas de *E. cloeziana*. **A**: mega estacas mantidas em casa de vegetação. **B**: Brotações epicórmicas em mega estaca utilizada para cultivo *in vitro* (setas)

A Figura 3 representa um esquema resumido do procedimento metodológico utilizado no presente trabalho.

Figura 3 - Esquema representativo da metodologia realizada para execução do trabalho

4.3 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* de *E.cloezi* consistiu no resgate de galhos da copa de uma árvore selecionada desta espécie com 26 anos, mantidos em condições de casa de vegetação para indução de brotações epicórmicas.

Para a introdução *in vitro*, segmentos nodais das brotações epicórmicas, com 15-20 mm de comprimento (Figura 4) foram lavados em água estéril por 30 minutos e desinfestados com álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de NaClO 30% (v/v) durante 5 minutos e enxaguados novamente com água estéril. Após a desinfestação, os explantes foram introduzidos em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 gL⁻¹ de sacarose e 4,5 gL⁻¹ de ágar. Os segmentos nodais foram mantidos neste meio de cultivo por 30 dias e as brotações que se mantiveram assintomáticas e com desenvolvimento adequado foram transferidas para novo meio.

Figura 4 - Segmento nodal oriundo de brotações epicórmicas de mega estaca de *E. cloeziana* introduzido *in vitro*.
Setas = Brotações dos segmentos nodais introduzidos *in vitro*

Após o período de 30 dias, as brotações assintomáticas que se desenvolveram foram transferidas para meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1981) para multiplicação, suplementado com 0,5 mgL⁻¹ de BAP e 0,05 mgL⁻¹ de ANA (BRONDANI et al., 2012), além de 30 gL⁻¹ de sacarose e 4,5 gL⁻¹ de ágar. Ambos os meios de cultura foram preparados com água deionizada, pH ajustado para 5.8 (± 1) com HCl (1M) e NaOH (1M), sendo autoclavados durante 25 minutos a 121°C. As brotações foram mantidas em sala de crescimento com temperatura, fotoperíodo e luminosidade controlados (25 $\pm$ 2°C, 16 horas e 42 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente). Para o cultivo *in vitro* a tendência é utilizar o termo “tufo de brotações”, mas, como ainda não está bem definida a nomenclatura para estas estruturas, neste trabalho optou-se por “microcepas”. Além disso, vale ressaltar que o termo “microcepa” é usado quando ocorre a formação de raiz, sendo o que mais se assemelha às condições *in vivo*.

Para o estabelecimento deste trabalho considerou-se “manifestação” e não “contaminação”, as colônias que surgiram após a formação de microcepas assintomáticas (60 dias de cultivo *in vitro*).

As microcepas sob manifestação foram submetidas aos experimentos de terapia com agentes antimicrobianos (Figura 5).

Figura 5 - Microcepa assintomática de *E. cloeziana* com manifestação bacteriana (setas)

4.3.1 Terapia com agentes antimicrobianos

Microcepas de *E. cloeziana* cultivadas *in vitro* por 60 dias, e que apresentaram manifestação bacteriana, foram transferidas para meios de cultura contendo antibióticos ou biocida. Baseado na metodologia descrita por Toledo (2011), testes preliminares foram realizados quanto à autoclavagem dos meios de cultura acrescidos de antibióticos, bem como para determinação da melhor concentração a ser utilizada. Assim, estabeleceu-se o uso dos antibióticos gentamicina, ciprofloxacina e rifampicina na concentração de (250 µg/ml), o antibiótico timentin, na concentração de 400 mg/L, e o biocida clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona, na concentração de (325 µg/ml). Todos adicionados ao meio de cultura WPM de multiplicação (LLOYD; McCOWN, 1981; BRONDANI et al., 2012).

Os antibióticos foram testados isolados e/ou em combinações, e o biocida, compondo os tratamentos como descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos tratamentos terapêuticos com agentes antimicrobianos

Tratamentos	Grupos	Classificação	Concentração (µg/ml)
T1	testemunha	---	---
T2	gentamicina	aminoglicosídeo	250
T3	rifampicina	ansamicinas	250
T4	ciprofloxacina	quinolonas	250
T5	gentamicina	---	250
	rifampicina		250
T6	gentamicina	---	250
	ciprofloxacina		250
T7	rifampicina	---	250
	ciprofloxacina		250
T8	gentamicina	---	250
	rifampicina		250
T9	ciprofloxacina	---	250
	clorometil-isotiazolinona		325
T10	+ metil-isotiazolinona	biocida	325
T10	timentin	β-lactâmicos	400

As microplantas foram submetidas ao tratamento com agentes antimicrobianos durante o período de 30 dias. Para tanto, utilizou-se dos dados de 15 e 30 dias após o início com tratamento com agentes antimicrobianos, para verificar se houve diferenças significativas ao longo do tempo em cada planta, alterações no desenvolvimento das microcepas nos diferentes tratamentos, além de verificar a eficiência de cada tratamento no controle das bactérias manifestadas.

Semanalmente, foi avaliada a sobrevivência das microcepas, por meio de avaliação visual do aspecto geral de cada uma delas, levando em consideração, principalmente, a coloração e o vigor das microcepas como um todo, verificando também a manifestação bacteriana após o tratamento com agentes antimicrobianos. Os dados destas avaliações foram gerados por atribuição de notas, baseando-se desta forma, no método adotado por Esposito-Polesi (2011), seguindo os parâmetros como apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros adotados para avaliação das microcepas

Microcepas		Manifestação bacteriana	
-	Morte	-	Ausente
+	Reduzido vigor	+	Manifestação reduzida
++	Vigor moderado	++	Manifestação moderada
+++	Vigor elevado	+++	Manifestação Intensa

4.3.2 Avaliações do desenvolvimento das microcepas

Os dados referentes ao incremento no número de brotações e peso da massa seca das microcepas foram coletados nos períodos de 15 e 30 dias de cultivo nos respectivos tratamentos.

4.4 Análises Histológicas e Histoquímicas

Microcepas de *E. cloeziana* com 15 e 30 dias de cultivo em terapia com antimicrobianos, foram avaliadas por meio de técnicas de anatomia e histoquímica e analisadas em microscopia de luz.

As folhas completamente expandidas foram fixadas em solução de Karnovsky (1965), seguida de desidratação alcoólica-etílica em concentrações crescentes de 10 a 100% (v/v), permanecendo 10 minutos em cada uma delas. Em seguida, as amostras foram incluídas em resina de hidroxiethylmetacrilato (Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos contendo as amostras foram seccionados em micrótomo rotativo manual (Leica), com secções longitudinais de 5 µm de espessura.

Os cortes histológicos do material emblocado foram aderidos em lâminas histológicas e submetidos à dupla coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) (MAIA, 1979) e Naftol blue-black (ALMEIDA et al., 2012), resultando em uma coloração rosa 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). Atribuiu-se como critério para a avaliação histoquímica os parâmetros adotados por Esposito-Polesi (2011): ausência (-) ou presença (+) das substâncias e, quantitativamente, classificados como pouco presente (+), moderadamente presente (++) ou intensamente presente (+++), de acordo com a intensidade das respostas aos testes aplicados.

4.5 Avaliação Nutricional

Após a mensuração do peso de massa fresca, as microcepas foram armazenadas em sacos de papel e acondicionadas em estufa a 60°C, até manutenção de peso constante. Em seguida, as microcepas foram pesadas e moídas para o preparo das amostras, para posterior análise química do teor nutricional no Laboratório de Tecidos Vegetais, do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas na ESALQ/USP/Piracicaba/SP.

As amostras foram analisadas seguindo metodologia desenvolvida por Sarruge e Haag (1974).

4.6 Análise molecular

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo, do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas na ESALQ/USP/Piracicaba/SP.

4.6.1 Extração do DNA genômico total

Para a extração do DNA genômico total das amostras, utilizou-se o Kit Powersoil DNA Isolation Mobio (MoBio Laboratories EUA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Foram coletadas amostras de microcepas de *E. cloeziana*, 15 e 30 dias após início do tratamento com agentes antimicrobianos. Cada amostra constituiu de 200 mg de tecido fresco trituradas em N₂ líquido.

Após a extração um volume de 5 µL de DNA de cada amostra foi carregado em gel de eletroforese com agarose 1% (p/v) e tampão TAE 1X e posteriormente corado com brometo de etídeo (BRODY; KERN, 2004). As amostras foram visualizadas em transiluminador DNR minibis Pro (bio-imagem Systems), as bandas formadas foram comparadas com o padrão molecular de 1Kb Ladder (Invitrogen) para estimar a qualidade de DNA.

4.6.2 Amplificação dos genes por PCR

Para reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase), foram utilizados os oligonucleotídeos f799 (5'AAC MGG ATT AGA TAC CCK G 3'), específico para DNA bacteriano (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) em conjunto com o iniciador r1492 (5'TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (HEUER et al., 1997). A reação de amplificação (PCR) foi realizada para um volume final de 25 µL contendo: tampão para PCR 1X, 0,25mM de dNTP, 1,25mM de MgCl₂, 5pmol de cada oligonucleotídeo, 1U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (0,2µL), 1µL da amostra de DNA e água ultrapura (Milli-Q)

esterilizada. A reação foi realizada em termociclador modelo Veriti (Applied Biosystems) nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20s, anelamento a 53°C por 40s e extensão a 72°C por 40s, extensão final a 72°C por 10 minutos e ao final de cada reação, as amostras permaneceram no termociclador a 4°C. Para cada amostra, uma alíquota de 5µL do produto da PCR foi carregado em gel de eletroforese com agarose 1% (p/v) e tampão TAE 1X e posteriormente corado com brometo de etídeo foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo (BRODY; KERN, 2004). Os produtos foram comparados com o padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 100pb (Invitrogen).

4.6.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A amplificação do fragmento alvo e a adição do grampo GC para realização da PCR-DGGE, foram utilizados os *primers* U968-GC e R1387, resultando em um *amplicon* de aproximadamente 524pb.

A reação foi realizada para um volume final de 50 µL contendo PCR buffer 1X, MgCl₂ 2,00 mM, formamida 100%, dNTP's 0,20 mM, e os primers forward and reverse com 0,4 pmol e Taq polymerase 0,06 U.

Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 4 minutos à 94 °C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto à 94 °C, 1 minuto à 56 °C, 2 minutos à 72 °C, e uma extensão final de 10 minutos à 72 °C. Os produtos de PCR foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, com posterior coloração em solução de brometo de etídeo e visualização em luz ultra-violeta.

A análise em DGGE foi realizada utilizando o sistema *phorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda). O protocolo da técnica de DGGE foi adaptado de Muyzer; de Waal; Uitterlinden (1993). Os produtos amplificados da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (p/v) em tampão TAE 0,5x (10Mm de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,0). O gel foi preparado com gradiente desnaturante GC variando de 45 a 65%, onde 100% de desnaturação consiste na concentração de uréia 7M e formamida 40%. Os géis foram submetidos à eletroforese por 16 horas a 100V em temperatura de 60 °C. Após eletroforese, os géis foram corados com SYBR Green I, visualizados utilizando fotodocumentador Storm 845 (General Electric).

As imagens dos géis foram analisadas pelo programa Image Quant. A análise das bandas geraram uma matriz de presença e ausência e intensidade de bandas. A matriz foi

analisada no programa Past Estatistic (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) através do teste de coordenadas principais PCoA, utilizando o algoritmo de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957).

4.7 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial 10 x 2 (10 tratamentos x 2 períodos de análise), com 3 repetições por tratamento.

Todos dados 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 boxcox do pacote MASS no R software. Os dados de massa seca, número de brotações e teor nutricional das microcepas nos respectivos tratamentos foram transformados com $n^{0,5}$, $(n+1)^{0,22}$, $(n+1)^1$ e $n^{0,5}$, respectivamente, onde n representa cada observação. Sendo as análises realizadas utilizando o software R.

5 RESULTADOS

5.1 Terapia com agentes antimicrobianos

Avaliações semanais foram realizadas para analisar a influência dos antibióticos na morfofisiologia do vegetal, bem como verificar se houve alterações entre os tratamentos, e o controle das manifestações bacterianas *in vitro* (Figuras 6 e 7). A Tabela 3 representa qualitativamente as notas obtidas nessas avaliações aos 15 e 30 dias de terapia com antimicrobianos.

Figura 6 - Microcepas de *E. cloeziana* submetidas a tratamento com agentes antimicrobianos por 15 dias. A: T1 testemunha (isento de antibiótico); B: T2 gentamicina; C: T3 rifampicina; D: T4 ciprofloxacina; E: T5 gentamicina + rifampicina; F: T6 gentamicina + ciprofloxacina; G: T7 rifampicina + ciprofloxacina; H: T8 gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina; I: T9 clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (biocida); J: T10 timentin

Figura 7 - Microcepas de *E. cloeziana* submetidas a tratamento com agentes antimicrobianos por 30 dias. A: T1 testemunha (isento de antibiótico); B: T2 gentamicina; C: T3 rifampicina; D: T4 ciprofloxacina; E: T5 gentamicina + rifampicina; F: T6 gentamicina + ciprofloxacina; G: T7 rifampicina + ciprofloxacina; H: T8 gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina; I: T9 clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (biocida); J: T10 timentin

Tabela 3 - Representação qualitativa das médias das notas obtidas a partir das avaliações para vigor das microcepas e manifestação bacteriana aos 15 e aos 30 dias de tratamento

15 dias			30 dias		
Tratamento	Aparência	Manifestação	Tratamento	Aparência	Manifestação
1	+++	++	1	++	++
2	++	++	2	++	++
3	+++	+	3	+++	+
4	+++	+	4	+++	+
5	++	+	5	++	+
6	++	++	6	++	+
7	+++	+	7	+++	+
8	++	++	8	+	+++
9	+++	-	9	+++	-
10	+++	-	10	+++	-

Nota: os sinais (-) e (+) atribuídos representam qualitativamente a intensidade de vigor das microcepas de *E. cloeziana* mantidas em tratamento com agentes antimicrobianos por 15 dias, bem como a manifestação bacteriana durante este período. As aparências das microcepas foram classificadas como: vivas com vigor elevado (+++), vivas com vigor moderado (++) , vivas com reduzido vigor (+) ou mortas (-). E, no caso das manifestações, foram classificadas como presença intensa (+++), presença moderada (++) , presença reduzida (+) ou ausência (-).

As avaliações realizadas para analisar o experimento de terapia com antimicrobianos mostram que independentemente do período de cultivo, os tratamentos T9 (clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona) e T10 (timentin), foram os que apresentaram os melhores resultados, tanto em relação ao vigor das microcepas, quanto ao controle da manifestação bacteriana (Figuras 6I e 6J, Figuras 7I e 7J, Tabela 3).

De acordo com as avaliações semanais para o vigor das microcepas e manifestações bacterianas, verificou-se que o tratamento T1 (testemunha), ao longo dos 30 dias de tratamento, como era de se esperar, por ser o único isento de antibióticos, não ocorreu diminuição da manifestação bacteriana.

Os tratamentos T2 (gentamicina) e T8 (gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina), não foram bem sucedidos quanto ao controle da manifestação bacteriana. Além disso, apesar de não ter ocorrido queda no vigor ao longo dos subcultivos, nos primeiros quinze dias ambos os tratamentos demonstraram ter grande influência no vigor das microcepas.

Por outro lado, os tratamentos T5 (gentamicina + rifampicina) e T6 (gentamicina + ciprofloxacina), apesar de terem afetado o vigor das microcepas, obtiveram sucesso quanto ao controle das manifestações.

Os tratamentos T3 (rifampicina), T4 (ciprofloxacina) e T7 (composto pela união dos dois), embora ainda tenham apresentado manifestação aos 30 dias de cultivo, essa foi contida, e aparentemente não refletiu no vigor e desenvolvimento das microcepas.

5.2 Avaliações do desenvolvimento das microcepas

Avaliou-se a taxa de crescimento por meio do incremento em massa seca, bem como o número de brotações nas microcepas de *E. cloeziana* nos diferentes tratamentos testados. Essas avaliações foram realizadas aos 15 (Tabela 4) e 30 dias (Tabela 5).

Tabela 4 - Incremento em massa seca e número de brotações nas microcepas de *E. cloeziana* após 15 dias na etapa de multiplicação *in vitro* sob terapia com antimicrobianos

Tratamentos	Massa Seca	Número de Brotações
1	0,128a	20,17 ab
2	0,126a	18,00 b
3	0,126a	15,83 bc
4	0,119a	17,17 b
5	0,098a	16,83 b
6	0,111a	18,00 b
7	0,116a	16,83 b
8	0,110a	12,167 c
9	0,111a	18,50 b
10	0,143a	23,50 a

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

Na tabela 4 verifica-se que ao longo dos 15 dias de tratamento, não houve diferença significativa quanto ao incremento de massa seca nos tratamentos avaliados. Entretanto, quanto ao número de brotações, houve diferenças significativas entre os tratamentos, onde os tratamentos que apresentaram as maiores médias foram o T10 (timentin) e T1 (testemunha). Sendo seguidos pelos tratamentos T9, T2, T6, T4, T5, T7 e T3. O tratamento T8 (gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina) apresentou as menores médias em relação ao número de brotações, não diferindo, entretanto, significativamente do tratamento T3 (rifampicina).

Tabela 5 - Incremento em massa seca e número de brotações nas microcepas de *E. cloeziana*, após 30 dias na etapa de multiplicação *in vitro* sob terapia com antimicrobianos

Tratamentos	Massa Seca	Número de Brotações
1	0,039 bc	13,67 a
2	0,046 b	11,17 bc
3	0,033 c	10,33 cde
4	0,037 bc	10,50 cd
5	0,035 bc	8,50 de
6	0,035 bc	8,00 e
7	0,035 bc	11,333 abc
8	0,042 bc	8,50 de
9	0,036 bc	10,33 cde
10	0,067 a	13,33 ab

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

Aos 30 dias de tratamento, a partir da análise de variância (Figura 5), verificou-se que quanto ao incremento de massa seca, o tratamento T10 apresentou a maior média em relação aos demais tratamentos. Enquanto o tratamento T3 (rifampicina) apresentou a menor média nesse parâmetro.

Em relação ao número de brotações, os tratamentos que apresentaram as melhores resultados foram T1 (testemunha), T10 (timentin) e T7 (rifampicina + ciprofloxacina), seguidos pelos tratamentos 2, 4, 3, 9, 5, 8 e 6, respectivamente (Figura 5).

5.3 Análises Histológicas e Histoquímica

Microcepas de *E. cloeziana* submetidas a tratamentos com agentes antimicrobianos, foram analisadas histológica e histoquimicamente por meio de secções transversais dos terços medianos foliares e submetidas ao teste histoquímico com os reagentes PAS e Naphtol blue black (Figuras 8, 9, 10 e 11). As análises evidenciaram que os tratamentos T1 (testemunha) e T9 (clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona) apresentaram epiderme adaxial com células isodiamétricas ou discretamente alongadas no sentido periclinal à superfície, independentemente do período analisado. No entanto, a epiderme abaxial apresentou-se heterogênea devido à presença de células com distintas dimensões, porém menores em relação ao observado para as células epidérmicas adaxiais (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Todas as amostras analisadas do tratamento T1 (testemunha) apresentaram reduzido conteúdo fenólico nas células epidérmicas adaxiais, sendo ausentes aos 15 dias de cultivo. Incremento de fenóis foi detectado aos 30 dias de cultivo, com elevada presença nas células epidérmicas adaxiais e presença moderada nas células epidérmicas abaxiais. Observou-se a presença de estômatos em ambas as epidermes, com maior densidade na epiderme abaxial, caracterizando a folha como anfihipoestomática (Figuras 8 e 10).

Ainda em relação ao tratamento Testemunha (T1), as folhas apresentaram mesofilo heterogêneo, constituído por um estrato de células parenquimáticas paliçádicas adjacentes à epiderme adaxial e por quatro a cinco estratos de células no parênquima lacunoso. Aos 15 dias de cultivo, os espaços intercelulares observados nos parênquimas paliçádico e lacunoso apresentaram-se mais amplos em relação ao observado aos 30 dias de cultivo, além disso, as células de ambos os parênquimas, evidenciaram paredes celulares primárias delgadas. Em relação ao formato celular, enquanto as células do parênquima paliçádico apresentaram-se alongadas no sentido anticlinal, as células do parênquima lacunoso apresentaram-se isodiamétricas ou discretamente alongadas no sentido periclinal (Figuras 8 e 10).

Aos 30 dias de cultivo, comumente observou-se a presença de glândulas de óleo nas folhas das microcepas cultivadas na ausência de antibióticos (tratamento T1), no entanto, aos 15 dias de cultivo, foram raramente observadas e em estágio inicial de desenvolvimento, estas estruturas secretoras localizaram-se em ambas as superfícies adaxial e abaxial, do tecido epidérmico às células parenquimáticas do mesofilo (Figuras 8 e 10).

As secções foliares de todos os tratamentos das amostras analisadas em ambos os períodos, reagiram negativamente à presença de polissacarídeos e amido com o teste histoquímico para o reagente PAS (Figuras 8, 9, 10 e 11), apresentando reação positiva, em alguns casos, somente para compostos fenólicos (Tabelas 6 e 7) nas folhas das microcepas.

Tabela 6 - Intensidade de compostos fenólicos em células epidérmicas e feixes vasculares, de folhas de microcepas de *E. cloeziana*, submetidas 15 dias ao tratamento com agentes antimicrobianos

15 dias			
Tratamento	Amido	Proteína	Compostos Fenólicos
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	-	++
4	-	-	-
5	-	-	++
6	-	-	-
7	-	-	+
8	-	-	++
9	-	-	+
10	-	-	-

Nota: os sinais (-) e (+) representam respectivamente ausência ou presença da substância e, quantitativamente, classificados como intensamente presente (+++), moderadamente presente (++) ou pouco presente (+), de acordo com a intensidade das respostas ao teste aplicado em folhas de microcepas de *E. cloeziana* mantidas em tratamento com agentes antimicrobianos por 15 dias.

Tabela 7 - Intensidade de Compostos fenólicos em células epidérmicas e feixes vasculares de folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidas 30 dias ao tratamento com agentes antimicrobianos

30 dias			
Tratamento	Amido	Proteína	Compostos Fenólicos
1	-	-	+++
2	-	-	+++
3	-	-	++
4	-	-	-
5	-	-	++
6	-	-	+
7	-	-	+
8	-	-	+
9	-	-	-
10	-	-	++

Nota: os sinais (-) e (+) representam respectivamente ausência ou presença da substância e, quantitativamente, classificados como intensamente presente (+++), moderadamente presente (++) ou pouco presente (+), de acordo com a intensidade das respostas ao teste aplicado em folhas de microcepas de *E. cloeziana* mantidas em tratamento com agentes antimicrobianos por 30 dias.

Assim como no tratamento T1 (testemunha), ambas as epidermes adaxial e abaxial de todos os tratamentos contendo a presença de antibióticos evidenciaram aumento no conteúdo fenólico no interior das células aos 30 dias de cultivo, em relação ao período anterior (15 dias) (Figuras 8, 9, 10 e 11), exceção feita apenas ao tratamento T8 (gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina) e do tratamento T9 (clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona), nos quais as células de ambas as epidermes apresentaram redução no conteúdo desta substância ergástica aos 30 dias de cultivo (Figuras 9 e 11). No entanto, todas as amostras foliares analisadas, para todos os tratamentos, evidenciaram maior conteúdo de fenóis nas células epidérmicas adaxiais em relação às abaxiais (Figuras 8, 9, 10 e 11).

De forma similar ao observado no tratamento T1 (testemunha), as folhas dos demais tratamentos caracterizaram-se como anfihipoestomáticas, no entanto, no tratamento T5 (gentamicina + rifampicina), as folhas apresentaram uma sensível redução do número de estômatos na epiderme adaxial em relação ao tecido correspondente nos demais tratamentos (Figuras 6 e 8).

Nos tratamentos com presença de antibióticos e biocida (T1: testemunha; T2: gentamicina; T3: rifampicina; T4: ciprofloxacina; T5: gentamicina + rifampicina; T6: gentamicina + ciprofloxacina; T7: rifampicina + ciprofloxacina; T8: gentamicina + rifampicina + Ciprofloxacina; T9: clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona e T10: timentin), os mesófilos apresentaram-se heterogêneos ao final dos 30 dias de cultivo, assim como no tratamento T1 (testemunha), no entanto, nas microcepas submetidas ao tratamento 5 (gentamicina + rifampicina), o estrato de células parenquimáticas paliádicas evidenciou-se pouco definido aos 15 dias de cultivo, visto que as células apresentaram elevada heterogeneidade (Figuras 8 e 10). Já as microcepas cultivadas nos tratamentos T9 (clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona) e T10 (timentin) evidenciaram, ao final dos 30 dias de cultivo, a presença de dois a três estratos de células parenquimáticas em paliçada e separados por amplos espaços intercelulares, particularmente naquelas cultivadas no tratamento T9 (clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona) (Figuras 9 e 11).

Ao final dos 30 dias de cultivo, o número de estratos celulares no parênquima lacunoso variou segundo o tratamento empregado, e apenas as microcepas cultivadas no tratamento T2 (gentamicina) evidenciaram similaridade ao tecido correspondente das microcepas do tratamento T1 (testemunha), contendo quatro a cinco estratos de células parenquimáticas (Figuras 8 e 10). Os espaços intercelulares do parênquima lacunoso apresentaram-se muito reduzidos nas folhas das microcepas dos tratamentos T3 (rifampicina) e T4 (ciprofloxacina), aos 15 e 30 dias de cultivo (Figuras 8 e 10), bem como nos tratamentos T5 (gentamicina + rifampicina) e T7 (ciprofloxacina + rifampicina), aos 30 dias de cultivo em relação ao observado nos demais tratamentos (Figuras 8, 9, 10 e 11). Salienta-se, ainda, que nos tratamentos T6 (gentamicina + ciprofloxacina) e T10 (timentin), os estratos celulares do parênquima lacunoso evidenciam sensível heterogeneidade, contendo células com distintas dimensões e formas e consequente indução de irregularidades na espessura das células deste tecido, bem como formando pronunciadas ondulações observadas na superfície abaxial destas folhas (Figuras 9 e 11).

Como observado nas Figuras de 8 a 11, aos 30 dias de cultivo *in vitro* sob tratamento com agentes antimicrobianos, observou-se a presença de três a quatro estratos de células no parênquima lacunoso das microcepas cultivadas nos tratamentos T4 (ciprofloxacina), T5 (gentamicina + rifampicina), T9 (clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona) e T10 (timentin); três a seis estratos no parênquima lacunoso das microcepas cultivadas no tratamento T6 (gentamicina + ciprofloxacina) e cinco a seis estratos no parênquima lacunoso das microcepas no tratamento T8 (gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina). A presença de

espaços intercelulares no parênquima lacunoso foi sensivelmente reduzida nas microcepas cultivadas no tratamento T2 (gentamicina), aos 30 dias de cultivo, no entanto, nos tratamentos T3 (rifampicina), T4 (ciprofloxacina) e T7 (ciprofloxacina + rifampicina), os espaços intercelulares observados apresentaram-se reduzidos em ambos os períodos analisados (15 e 30 dias), quando comparados ao controle e demais tratamentos (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Figura 8 - Cortes histológicas transversais na região da nervura central em folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: testemunha (T1) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C e D: gentamicina (T2) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: rifampicina (T3) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: ciprofloxacina (T4) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I e J: gentamicina + rifampicina (T5) aos 15 e 30 dias de tratamento. Setas vermelhas indicam a presença de glândulas de óleo, setas pretas estômatos, FV = feixe vascular, EAb = epiderme abaxial, EAd = epiderme adaxial. Barras: 10 μ m

Figura 9 - Cortes histológicos em folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: gentamicina + ciprofloxacina (T6) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C e D: ciprofloxacina + rifampicina (T7) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina (T8) aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (T9) aos 15 dias e 30 dias de tratamento; I e J: timentin (T10) aos 15 e 30 dias de tratamento. Seta verde indica protuberância epidérmica, setas pretas estômatos, FV = feixe vascular, EAb = epiderme abaxial, EAd = epiderme adaxial. Barras: 10 µm

Figura 10 - Cortes histológicos do mesofilo de folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: T1 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C e D: T2 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: T3 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: T4 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I e J: T5 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Setas indicam a presença de glândulas de óleo. Barras: 50 μm

Figura 11 - Cortes histológicos do mesofilo de folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: T6 aos 15 dias e 30 dias de tratamento (epiderme adaxial), respectivamente; C e D: T7 aos 15 dias e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: T8 aos 15 dias de tratamento e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: T9 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I: T10 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Seta indica a presença de glândulas de óleo. Barras: 50 μm

No tratamento T1 (testemunha), os feixes vasculares colaterais das nervuras centrais não apresentaram compostos fenólicos aos 15 dias de cultivo, no entanto, observou-se elevada presença desta substância ergástica aos 30 dias de cultivo, inclusive nos feixes vasculares menores colaterais e centralizados no mesofilo (Figura 12).

Ao final dos 30 dias de cultivo, os feixes vasculares colaterais localizados nas nervuras centrais das secções foliares das microcepas cultivadas nos tratamentos T5 (gentamicina + rifampicina) e T9 (clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona) evidenciaram-se reduzidos em relação ao observado nos demais tratamentos, contendo ou não a presença de antibióticos (Figuras 12 e 13). Diferentemente do observado nas microcepas cultivadas no tratamento T1 (testemunha), as quais não evidenciaram a presença de fenóis nos tecidos destes feixes vasculares aos 15 dias de cultivo, as secções foliares dos tratamentos T2 (gentamicina), T5 (gentamicina + rifampicina), T6 (gentamicina + ciprofloxacina), T7 (ciprofloxacina + rifampicina), T8 (gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina) e T9 (clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona) apresentaram presença reduzida desta substância ergástica neste mesmo período (Figuras 12 e 13). Destes, apenas os tratamentos T7, T8 e T9 promoveram a queda de compostos fenólicos nesta estrutura, nas quais não foram detectadas estas substâncias ergásticas aos 30 dias de cultivo (Figura 13).

A presença de fenóis não foram observadas nos feixes vasculares centrais das secções foliares do tratamento T4 (ciprofloxacina), em ambos os períodos analisados (Figura 12). Nas microcepas cultivadas no tratamento T6 (gentamicina + ciprofloxacina), a presença desta substância ergástica manteve-se inalterada, evidenciando reduzido conteúdo fenólico nos feixes vasculares centrais das secções foliares analisadas (Figura 13). Somente as microcepas cultivadas nos tratamentos T2 (gentamicina), T3 (rifampicina), T5 (gentamicina + rifampicina) e T10 (timetin) evidenciaram um incremento desta substância ergástica, quando comparados os períodos de cultivo (15 e 30 dias), no entanto, apenas o tratamento T2 apresentou conteúdo fenólico no feixe vascular da nervura central, similar ao observado no tratamento T1 (testemunha), com elevada presença desta substância ergástica (Figuras 12 e 13).

Os feixes vasculares menores do mesofilo, colaterais e centralizados, em todos os tratamentos e períodos analisados, apresentaram o mesmo padrão anteriormente descrito à presença de substâncias fenólicas no feixe vascular colateral da nervura central e, de forma similar ao observado no tratamento T1 (testemunha) (Figuras 12 e 13). No entanto, o desenvolvimento de glândulas de óleo ocorreu de forma esporádica e, somente foram detectadas na superfície adaxial dos tratamentos T2 (aos 15 e 30 dias de cultivo) e T7 (aos 30

dias de cultivo) e na superfície abaxial nos tratamentos T5 e T10 (aos 30 dias de cultivo) (figuras 12 e 13).

Figura 12 - Cortes histológicos da nervura central de folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A e B: T1 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C e D: T2 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E e F: T3 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G e H: T4 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I e J: T5 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Barras: 50 μ m

Figura 13 - Cortes histológicos da nervura central de folhas de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à terapia com agentes antimicrobianos. A: T6 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; C: T7 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; E: T8 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; G: T9 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente; I: T10 aos 15 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Barras: 50 μ m

5.4 Avaliação Nutricional

Para melhor entender como os meios de cultura, os nutrientes disponíveis e os antibióticos aplicados em cada tratamento influenciaram na composição dos nutrientes das microcepas de *E. cloeziana*, realizou-se a análise nutricional de macro e micronutrientes (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 - Valores reais da quantidade do acúmulo de macronutrientes nas microcepas avaliadas de *E. cloeziana*, em relação aos tratamentos utilizados com agentes antimicrobianos

Tratamentos	N (Média)	P (Média)	K (Média)	Ca (Média)	Mg (Média)	S (Média)
1	0,859 b	0,245 bc	1,432 b	0,195 ab	0,0565 bc	0,3455 c
2	1,065 b	0,3255 ab	1,196 bc	0,184 ab	0,0485 bcd	0,381 b
3	0,8283 b	0,2073 c	1,2957 bc	0,1513 ab	0,045 cd	0,3177 def
4	0,8577 b	0,2263 c	1,4343 b	0,1597 ab	0,0417 cd	0,3377 cd
5	0,944 b	0,260 abc	0,9905 c	0,125 b	0,0390 d	0,310 ef
6	1,0015 b	0,2605 abc	0,9905 c	0,135 ab	0,0390 d	0,3035 f
7	0,8327 b	0,209 c	1,446 b	0,1447 ab	0,0507 bcd	0,333 cde
8	1,1155 ab	0,279 abc	1,221 bc	0,1535 ab	0,044 cd	0,3705 b
9	0,9037 b	0,214 c	1,2853 bc	0,1497 ab	0,0623 ab	0,313 ef
10	1,425 a	0,349 a	2,187 a	0,2423 a	0,0780 a	0,6247 a

Notas:¹As letras na mesma coluna indicam a comparação das médias de acúmulo de nutriente entre os tratamentos. Em uma mesma coluna, as letras distintas representam diferença significativa entre as médias dentro de cada tratamento pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

²N = Nitrogênio; P = Fósforo; K = Potássio; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; S = Enxofre.

De acordo com as médias encontradas para os valores de acúmulo de nitrogênio (N) nas microcepas de *E. cloeziana* submetidas à tratamentos de agentes antimicrobianos, o T10 (timentin) foi o único tratamento que obteve maior acúmulo deste nutriente que o tratamento testemunha (T1). O tratamento T8 (gentamicina + rifampicina + ciprofloxacina), não apresentou diferenças significativas quando comparado ao tratamento T10 e com os demais tratamentos (Tabela 8).

Levando-se em consideração o tratamento testemunha (T1), além do tratamento T10, os tratamentos que obtiveram médias maiores em relação ao acúmulo de nitrogênio, foram T8, T2, T6 e T5, todos apresentando em comum o antibiótico gentamicina. E, os tratamentos que apresentaram resultados inferiores da testemunha, embora não tenham diferido de forma significativa, são os constituídos por rifampicina e ciprofloxacina isolados (T3 e T4), além da combinação desses antibióticos (T7).

Em relação ao elemento fósforo (P), o tratamento T10 foi o que obteve os maiores resultados no acúmulo deste elemento, seguido dos tratamentos T2, T8, T6 e T5, não havendo

diferença significativa entre eles. Os tratamentos que apresentaram as menores médias quanto ao acúmulo de fósforo, foram T4, T9, T7 e T3. O tratamento testemunha apenas difere de forma significativa do tratamento T10 que apresenta o maior acúmulo desse nutriente (Tabela 8).

Assim como foi observado quanto ao acúmulo de nitrogênio, os tratamentos que apresentaram maiores médias para o acúmulo de fósforo, com exceção do T10, foram os que contêm gentamicina (T2, T8, T6 e T5). E, além disso, os tratamentos que apresentaram menores médias para o acúmulo de fósforo foram os que contêm rifampicina e ciprofloxacina (T3 e T4), e também a combinação dos dois (T7), além do biocida clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (T9).

Da mesma forma como observado no acúmulo de nitrogênio, o tratamento T10 foi o que apresentou maiores médias para o acúmulo de potássio (K). Seguido dos tratamentos T7, T4, e T1, além dos tratamentos T3, T9, T8 e T2, não havendo diferença significativa entre estes. Embora estes não tenham diferido entre si os tratamentos T5 e T6, eles foram os tratamentos que apresentaram as menores médias para ao acúmulo de potássio (Tabela 8).

Levando-se em conta o fato de que o tratamento T7 é composto pela união dos tratamentos T3 (rifampicina) e T4 (ciprofloxacina), pode-se assumir que estes antibióticos influenciaram positivamente a absorção de potássio em microcepas de *E. cloeziana*, já que estão próximos do tratamento testemunha e estão entre os tratamentos que obtiveram maiores médias no acúmulo de potássio, sendo somente superados pelo T10 (timentin).

Em relação ao cálcio (Ca), o tratamento que obteve a maior média quanto ao acúmulo deste nutriente foi o T10, enquanto o T5 obteve a menor média. Os demais tratamentos não diferiram de forma significativa entre eles (Tabela 8).

A análise nutricional mostrou que os únicos tratamentos que apresentaram médias de acúmulo do elemento magnésio (Mg) superiores ao tratamento testemunha (T1), foram T10 e T9, não havendo diferença significativa entre eles. Os tratamentos T7, T2, T3, T8 e T4; embora tenham apresentado médias menores quanto ao acúmulo deste nutriente, não diferiram de forma significativa da testemunha (T1). Sendo os tratamentos T5 e T6, os únicos que apresentaram médias inferiores (Tabela 8).

Quanto ao enxofre (S), os tratamentos T2, T8 e T10 apresentaram os maiores resultados quanto ao seu acúmulo, sendo que T2 e T8 mesmo sendo significativos em relação ao T1, não diferem entre si, e apresentaram acúmulo deste composto muito inferior ao T10. A testemunha apenas se mostrou semelhante estatisticamente com os tratamentos formados com rifampicina e

ciprofloxacina isolados (T3 e T4) e com a combinação deles (T7). Os tratamentos com médias inferiores para o acúmulo de enxofre foram o T9, T5 e T6 (Tabela 8).

Tabela 9 - Valores reais da quantidade de acúmulo de micronutrientes nas microcepas avaliadas de *E. cloeziana* submetidas a agentes antimicrobianos por 30 dias

Tratamentos	B (Média)	Fe (Média)	Mn (Média)	Zn (Média)
1	1,6545 b	25,0575 bcd	8,2195 b	9,2235 c
2	1,9725 ab	38,870 a	7,3485 b	10,028 b
3	1,2637 b	21,395 bcd	7,7773 b	7,667 e
4	1,464 b	22,755 bcd	7,7643 b	8,251 de
5	1,450 b	28,175 b	5,7925 b	7,779 e
6	1,530 b	27,0375 bc	6,1515 b	7,9805 e
7	1,5093 b	19,6583 cd	7,852 b	7,6243 e
8	2,0605 ab	29,190 b	6,363 b	8,925 cd
9	1,4997 b	18,360 d	7,698 b	7,494 e
10	3,2823 a	37,4083 a	13,2887 a	13,40 a

Notas: ¹As letras na mesma coluna indicam a comparação das médias de acúmulo de nutriente entre os tratamentos. Em uma mesma coluna, as letras distintas representam diferença significativa entre as médias dentro de cada tratamento pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

²B = Boro; Fe = Ferro; Mn = Manganês; Zn = Zinco.

Resultados semelhantes ao enxofre foram observados para o elemento boro (B), onde de forma semelhante, os tratamentos T2, T8 e T10 foram superiores no acúmulo do elemento em relação ao T1, porém, somente o T10 apresentou diferença significativa. Para os demais tratamentos (T3, T4, T5, T6, T7 e T9), apesar de apresentarem valores de acúmulo inferiores ao T1, não diferiram significativamente deste.

Quanto ao ferro (Fe), os tratamentos que apresentaram as médias significativamente superiores quanto ao acúmulo deste nutriente, foram os tratamentos T2 e T10. Embora não tenham apresentado diferenças significativas, em relação à testemunha, os tratamentos T8, T5 e T6 apresentaram médias superiores, enquanto que os tratamentos T4 e T3 apresentaram médias inferiores (Tabela 9).

Em relação ao manganês (Mn), o único tratamento que se apresentou superior à testemunha quanto as médias de acúmulo deste elemento, foi o tratamento T10. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas com o tratamento testemunha T1 (Tabela 9).

Quanto a absorção do elemento zinco (Zn), os tratamentos T10 e T2 apresentaram média de acúmulo superior deste elemento em relação a testemunha T1, porém, somente o T10 diferiu significativamente. Todos os demais tratamentos apresentaram resultados de acúmulo

de zinco inferiores à testemunha, sendo o tratamento T8 o único que não teve diferença significativa de T1 (Tabela 9).

Quanto ao cobre (Cu), não houve diferenças significativas quanto ao seu acúmulo para todos os tratamentos testados.

5.5 PCR-DGGE

Com o intuito de verificar possíveis diferenças nos grupos bacterianos endofíticos das microcepas de *E. cloeziana* submetidos ou não a tratamento com agentes antimicrobianos, foi realizada a análise PCR-DGGE, onde constatou-se a presença de microrganismos endofíticos em todos os tratamentos testados (Figuras 14 e 15) e independentemente do período de cultivo de 15 ou 30 dias.

Para melhor compreensão dos dados, realizou-se a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), método este utilizado para visualizar as diferenças existentes entre os dados trabalhados. Suas coordenadas principais separam as amostras por dissimilaridade, ou seja, através de quadrantes, sendo assim possível analisar as diferenças existentes entre as populações selecionados pelos diferentes tratamentos.

A PCoA realizada permitiu visualizar a distribuição dos perfis das comunidades ao longo de eixos de ordenação, com base na presença e ausência de bandas detectadas por DGGE. Conjuntamente, os dois eixos plotados em cada ordenação apresentada, evidenciaram a distribuição dos dados, onde pode se observar nas Figuras 14 e 15, diferenças significativas na diversidade bacteriana em ambos os períodos (15 e 30 dias, respectivamente).

Após 15 dias de cultivo sob os diferentes agentes antimicrobianos, verificou-se dissimilaridade entre os grupos bacterianos endofíticos das microcepas em relação ao tratamento testemunha, evidenciando os tratamentos T4, T5 e T6 distribuídos no 3º quadrante; T7, T8 e T9, no 4º quadrante e, T10 no 2º quadrante (Figura 14). A única exceção foram os tratamentos T2 e T3, que devido a proximidade apresentada entre os tratamentos no 1º quadrante.

Figura 14 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) gerada a partir de resultados do gel de DGGE de amostras de microcepas de *E. cloeziana* submetidas a tratamentos com agentes antimicrobianos pelo período de 15 dias. T1 = testemunha (isento de antibiótico); T2 = gentamicina; T3 = rifampicina; T4 = ciprofloxacina; T5 = gentamicina + rifampicina; T6 = gentamicina + ciprofloxacina; T7 = rifampicina + ciprofloxacina; T8 = gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina; T9 = clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (biocida) e T10 = timentin

Decorridos 30 dias de cultivo sob as respectivas condições, constatou-se uma aleatoriedade dos perfis das comunidades bacterianas presentes nas microcepas de *E. cloeziana*, onde se observou uma elevada variação na diversidade bacteriana das microcepas quando comparadas aos 15 dias de cultivo (Figura 15). No entanto, notou-se uma considerável similaridade entre os tratamentos em relação à testemunha estando presentes nos mesmos quadrantes aos quais essa se encontra. A única exceção foi nas microcepas sob timentin (T10), o qual apresenta dissimilaridade na diversidade bacteriana quando comparado a T1.

Figura 15 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) gerada a partir de resultados do gel de DGGE de amostras de microcepas de *E. cloeziana* submetidos à tratamentos com agentes antimicrobianos pelo período de 30 dias. T1 = testemunha (isento de antibiótico); T2 = gentamicina; T3 = rifampicina; T4 = ciprofloxacina; T5 = gentamicina + rifampicina; T6 = gentamicina + ciprofloxacina; T7 = rifampicina + ciprofloxacina; T8 = gentamicina + ciprofloxacina + rifampicina; T9 = clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (biocida) e T10 = timentin

6 DISCUSSÃO

O principal objetivo da técnica de cultura de tecidos é a obtenção maciça de microplantas axênicas, ou seja, totalmente livre de microrganismos. No entanto, embora a desinfestação superficial dos explantes e a manipulação da cultura tenham sido conduzidas de maneira assépticas, muitas vezes, após o período de estabelecimento da cultura *in vitro*, ocorrem manifestações de microrganismos no meio de cultura (LONDE et al. 2007, PANICKER et al. 2007).

Há de se considerar que existem diferenças entre “contaminações” e “manifestações”, sendo no primeiro caso, a ocorrência de colônias resultantes de falhas na desinfestação dos explantes, onde os microrganismos são observados nos meios de cultura entre 48 e 72 horas após a introdução *in vitro*. Sendo assim, a presença, principalmente de fungos, neste período, caracteriza a não remoção de microrganismos epifíticos anteriormente à introdução *in vitro* do material vegetal. Todavia, a presença inesperada, principalmente de colônias bacterianas após longos períodos de subcultivos, é constante em qualquer espécie em micropropagação.

No caso específico de eucaliptos, as manifestações bacterianas são comuns em todas as fases de desenvolvimento das microplantas, seja na introdução, multiplicação ou alongamento (ALMEIDA et al., 2005).

Levando-se em conta que esses microrganismos, quando controlados, não acarretam sintomas de patogenicidade nas microcepas, e nem sempre afetam o desenvolvimento e o vigor do vegetal, como foi observado por Batagin-Piotto (2013), pode-se inferir que se trata de endófitos latentes que se manifestam durante o cultivo *in vitro* sob estresses, sejam, nutricional, mecânico ou físico. Apesar de esses microrganismos atuarem no controle biológico ou nas fontes de metabólitos secundários como observado por Almeida et al. (2005), Donato et al. (2005) e Londe et al. (2007), em se tratando de propagação maciça de eucalipto, as biofábricas têm prejuízos significantes, quando esses se manifestam, acarretando o descarte do material *in vitro*.

Considerando-se o fato de que as transferências das microcepas de eucalipto são realizadas em média a cada 30 dias (BACCARIN, 2012; BRONDANI, 2012), este trabalho estudou estratégias para minimizar as perdas de material vegetal, através da adição de agentes antimicrobianos nos meios de cultura para micropropagação de *E. cloeziana* durante esse período, sendo as análises realizadas aos 15 e 30 dias de cultivo, ou seja, no período que compreende a metade e o final do ciclo do subcultivo.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram inferir que no tratamento T1 (testemunha), as manifestações bacterianas junto às microcepas (Tabela 3), não interferiram no

desenvolvimento das plantas, em relação aos demais tratamentos. A diminuição do vigor das microcepas que apresentam manifestações bacterianas, nem sempre significa que a multiplicação *in vitro* será afetada, ou seja, uma vez controlado o crescimento das bactérias, as microcepas continuam se desenvolvendo, assim como foi observado por Batagin-Piotto (2013), onde o autor ressalta que, apesar da presença das bactérias exsudadas em *E. benthamii*, o desenvolvimento não foi prejudicado em qualquer uma das fases *in vitro*. Em T1, o desenvolvimento das microcepas, alcançou médias superiores quanto ao incremento de massa seca e maior média quanto ao número de brotações, nas análises realizadas aos 15 e 30 dias de cultivo das microcepas, inferindo assim que, mesmo na presença da comunidade bacteriana manifestada, o desenvolvimento do eucalipto *in vitro* não foi severamente afetado (Tabelas 4 e 5).

Em relação aos testes histoquímicos em T1, as avaliações realizadas aos 15 e 30 dias de cultivo, evidenciaram ausência de amido, proteína e compostos fenólicos, sendo este último, observado apenas aos 30 dias, na epiderme, nervuras centrais e colaterais. A manifestação causada por microrganismos endofíticos está intimamente relacionada a estresses causados ao vegetal durante seu cultivo *in vitro*, como observado por diversos autores (NILSEN; ORCUTT, 1996; ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002) e de acordo com Esposito-Polesi (2010), existem indícios de que os microrganismos endofíticos atuam no sistema de defesa da planta. Desta forma, o aumento na deposição de compostos fenólicos nas células das microcepas de *E. cloeziana*, pode ser atribuído ao estresse causado tanto pelo seu desgaste ao longo do cultivo *in vitro*, como pelo aumento acentuado da própria comunidade bacteriana, sendo então uma resposta do vegetal a intensa multiplicação das bactérias.

O sistema de defesa vegetal é multicomponente, atuando de maneira dinâmica e coordenada, no momento e local apropriados e com magnitude adequada (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Essa complexidade funcional, espacial e temporal inicia-se com o reconhecimento, pelo hospedeiro, de sinais exógenos provenientes do patógeno, como descrito por Walters; Newton; Lyon (2007), onde os autores elucidam as atividades da planta em relação aos patógenos. Neste trabalho não foram estudados patógenos, mas sim, analisadas a presença de endófitos exsudados pelas células e/ou tecidos de eucalipto em desenvolvimento *in vitro*, cultivados sob condições assépticas. É importante ressaltar que, a distinção entre patógenos, que causam doenças nas plantas, epifíticos que vivem na superfície dos vegetais e endofíticos que colonizam o interior da planta sem lhes causar problemas é meramente didática, ou seja, o mesmo microrganismo que ora fora epifítico, em função de alterações físicas, químicas ou mesmo bióticas, poderá tornar-se patogênico, ou simplesmente penetrar na planta

tornando-se endofítico que por sua vez, poderá pelas mesmas razões tornar-se patogênico. Essas distinções causadas pelos estresses aos quais as plantas são submetidas acarretam a produção de metabólitos secundários, com funções de proteção dos tecidos vegetais e dentre eles, os compostos fenólicos destacam-se como mecanismos bioquímicos de defesa (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Sendo assim, neste trabalho, a presença de compostos fenólicos possivelmente está relacionada com a multiplicação intensa da comunidade bacteriana exsudada das microcepas de eucalipto (estresse biótico) que desencadearam a produção de metabólitos, como estratégia de defesa, corroborando as informações de Beckman (2000) onde o autor afirma que quando a planta é submetida a qualquer tipo de estresse biótico ou abiótico, estes compostos passam de uma forma atóxica, reduzida e compartimentalizada, para uma forma tóxica, não reduzida e descompartimentalizada.

Uma estratégia para combater ou controlar as manifestações bacterianas *in vitro*, é a aplicação de agentes antimicrobianos, e para tanto, foram aplicadas combinações diferenciadas de antibióticos que não acarretassem alterações morfológicas nas plantas ou desequilíbrio da comunidade endofítica com seu hospedeiro, bem como o uso de biocida.

Um dos antibióticos utilizados neste trabalho foi a gentamicina (T2), do grupo dos aminoglicosídeos, que ligam-se às subunidades ribossomais 30S nas células bacterianas, inibindo a síntese de oleína, e/ou a síntese de proteínas nos cloroplastos e mitocôndrias nos tecidos vegetais (REED; BUCKLEY; DeWILDE, 1995). Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram que a adição de gentamicina ao meio de cultura para micropropagação de *E. cloeziana*, apesar de sua ação bactericida, foi ineficiente para o controle das manifestações bacterianas ao longo dos 30 dias de cultivo, uma vez que as colônias permaneceram moderadas na base das microcepas (Figuras 6B e 7B; Tabela 3). A ineficiência deste tratamento no controle das manifestações bacterianas pode ser atribuída, ao fato de este composto pertencer a um grupo de antibióticos que mostram-se mais ativo em pH alcalino (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2012), o que justifica sua ineficiência em função do pH do meio de cultivo da microcepa ser 5,8. Resultados semelhantes foram divulgados por Reed; Buckley e DeWilde (1995), bem como por Fang e Hsu (2012) onde os autores concluíram que este antibiótico isoladamente foi ineficiente no controle de microrganismos em plantas, por acarretar fitotoxicidade ou fraca penetração nos tecidos vegetais, da mesma forma como observado em *Mentha* por Reed; Buckley e DeWilde (1995).

As microcepas submetidas a esse tratamento (T2) quando comparadas ao tratamento isento de agentes antimicrobianos (T1) evidenciaram, aos 15 dias de cultivo, redução no vigor,

caracterizado neste trabalho como vigor moderado, mantendo-se assim até os 30 dias de cultivo (Tabela 3), corroborando novamente com as observações de Reed; Buckley e DeWilde (1995) e Fang e Hsu (2012). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Eichholtz; Hasegawa e Robitaille (1982) em microplantas de tabaco, onde os autores observaram que na presença deste antibiótico, o desenvolvimento do vegetal foi inibido consideravelmente.

Pereira e Fortes (2003), afirmam que em cultura de tecidos, mesmo que antibióticos de amplo espectro sejam utilizados, o controle de bactérias nem sempre é bem sucedido, como foi observado com o uso da gentamicina, que ao longo dos 30 dias de cultivo, manteve a manifestação bacteriana endofítica, semelhante ao tratamento testemunha (T1). No entanto, embora em T1 a presença das colônias bacterianas não tenha afetado o desenvolvimento do vegetal, em T2, aos 30 dias, observou-se que houve diferença estatística em relação ao T1 referente ao número de brotações (Tabelas 4 e 5), resultado esperado, considerando que antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos, como a estreptomicina, neomicina, canamicina, tobromacina e a gentamicina, são tóxicos aos vegetais, mesmo em baixas concentrações (POLLOCK; BARFIELD; SHIELD, 1983; OKKELS; PEDERSEN, 1988; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Os resultados obtidos a partir das análises histológicas evidenciaram que apesar da ineficiência no controle das manifestações bacterianas e possível ação de toxidez no tecido vegetal, como descritos na literatura, a gentamicina não alterou a estrutura anatômica do eucalipto *in vitro*.

A presença de compostos fenólicos aos 15 dias foi observada de forma sutil, enquanto que aos 30 dias (Tabelas 6 e 7), essa presença aumentou consideravelmente nas folhas de *E. cloeziana* inferindo que a planta encontrava-se sob condições de estresse, como observado por Probst (2012), que revela que além de estresses abióticos, características inerentes à planta, também podem influenciar no seu metabolismo, resultando na produção de compostos secundários, assim como descrito no T1 em relação à presença de compostos fenólicos nas células vegetais.

Em relação ao parâmetro vigor das microcepas de *E. cloeziana* submetidas ao tratamento com rifampicina (T3), os resultados permitiram inferir que o antibiótico não alterou negativamente esse parâmetro, pelo contrário, o vigor foi caracterizado como elevado ao longo dos 30 dias de cultivo (Tabela 3; Figura 7B). As microcepas não apresentaram sinais de fitotoxicidade na presença desse antibiótico, como ocorre na maioria das vezes quando se adiciona antibiótico aos meios de cultura. Esses resultados também foram observados em cana-de-açúcar por Toledo (2011), onde o autor revela que, a rifampicina é indicada para o controle

das manifestações bacterianas, podendo inclusive, ser aplicada em larga escala por ser autoclavável e eficiente.

Em relação ao parâmetro incremento de massa seca (Tabelas 4 e 5), embora tenha apresentado a menor média em comparação aos demais tratamentos, não diferiu significativamente da testemunha (T1), corroborando com os resultados encontrados nos trabalhos divulgados por Haldeman; Thomas; McKamy (1987) com *Camellia sinensis*, Reuveni; Shlesinger; Lavi (1990) e Vianna et al. (1997) com *Carica papaya*. O número de brotações em ambos os períodos avaliados, manteve a média dos demais tratamentos, sendo que aos 30 dias, o resultado foi significativamente distinto do tratamento T1 (Tabelas 4 e 5).

A rifampicina tem origem semi-sintética e pertence à família das rifamicinas, produzida por cepas de *Nocardia (Streptomyces) mediterranei*. Atua na inibição da atividade da enzima RNA polimerase DNA-dependente através da formação de um complexo estável com a enzima, o que suprime a iniciação da síntese do RNA bacteriano. Este antibiótico age tanto em microrganismos intra quanto extracelulares e em bacilos em processo de divisão ou em estado latente (ZHANG, 2005; BACCHI et al., 1998; GOODMAN; HAYDEN, 1996). Lima; Moraes (2006) citam em seu trabalho que a maior eficiência no controle da contaminação em microplantas de bananeiras foi obtida com a imersão prévia em rifampicina, com subsequente cultivo em meio de cultura com este antibiótico. Reuveni; Shlesinger; Lavi (1990) observaram o máximo de 70% de controle utilizando rifampicina na desinfestação, assim como foi observado por Winnaar (1988).

A rifampicina aplicada nas microcepas de *E. cloeziana* para controlar os endófitos manifestados nas plantas *in vitro*, resultou na presença moderada de compostos fenólicos nas células em ambos os períodos avaliados, 15 e 30 dias (Tabelas 6 e 7). Este resultado, observado mais intensamente no tratamento T1 (testemunha), possivelmente está relacionado com a multiplicação intensa da comunidade bacteriana endofítica exsudada, que desencadeou a produção de metabólitos como estratégia de defesa corroborando novamente com as informações de Beckman (2000).

Dentre todos os antibióticos utilizados para uso clínico, este é o único que bloqueia a transcrição bacteriana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010) e vem sendo utilizado para o controle de microrganismos em várias espécies de plantas cultivadas *in vitro* (VIANNA et al., 1997; TOLEDO, 2011). No caso específico da rifampicina, sabe-se que esta possui um amplo espectro de ação, atuando sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micobactérias, além de estafilococos produtores de penicilinases, interferindo na RNA-polimerase, impedindo a transcrição de informações genéticas. Estes antibióticos formam complexos estáveis com a

RNA polimerase dos microrganismos sensíveis, sendo a inibição da atividade enzimática proporcional à quantidade de complexo formado.

As rifampicinas têm ação primariamente bacteriostática, porém, inúmeras vezes se observa efeito bactericida dos microrganismos quando estes apresentam sensibilidade à concentração aplicada (LACAZ, 1975), além disso, não causam toxicidade nos tecidos vegetais sendo, portanto, uma alternativa para o controle das manifestações endofíticas, desde que sejam realizados testes específicos para a espécie em estudo.

Outro agente antimicrobiano utilizado neste trabalho foi a ciprofloxacina, aplicada isoladamente ou em combinação. No tratamento T4, ciprofloxacina isolada, foi possível observar que, embora não tenha ocorrido o controle total da manifestação bacteriana, pode-se inferir que houve uma sutil redução das colônias em ambos os períodos avaliados (Tabela 3). Durante este tratamento, observou-se ainda que, as microcepas apresentavam vigor elevado, além de apresentarem-se estatisticamente semelhante à testemunha (T1) quanto ao incremento de massa seca, exibindo diferenças apenas em relação ao número de brotações (Tabelas 3, 4 e 5).

O que provavelmente acarretou os resultados obtidos neste trabalho, com relação à aplicação da ciprofloxacina, é que se trata de uma fluoroquinolona sintética que atua como agente antimicrobiano, e de acordo com Weber et al. (2011), tem amplo espectro de ação, tanto contra bactérias Gram-positivas, como Gram-negativas. As quinolonas e fluoroquinolonas são grupos relacionados de antibióticos com ação bactericida, agem na degradação cromossomal além de prejudicar a duplicação do DNA, impedindo a multiplicação bacteriana (GOERKE; KÖLLER; WOLZ, 2005; FOX, 2006, TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; ABREU-TARAZI, 2010).

Assim, como observado nos demais tratamentos, as folhas das microcepas não apresentaram alterações anatômicas, preservando desta forma, as características pertinentes à família Mirtaceae. Em relação ao teste histoquímico, nenhuma substância ergástica apresentou resultados positivos, nos períodos avaliados, indicando que sua presença no meio de cultura não acarretou estresses nos tecidos vegetais, como também sua ação sobre as manifestações, não desencadearam ações de defesa dos tecidos vegetais, em função da presença dos microrganismos.

Os antibióticos são incorporados em meios de cultura ou utilizados como tratamentos breves para os contaminantes de superfície específicos. Existem trabalhos que utilizam combinações para acabar com contaminantes, pela maior eficiência comparado ao uso isolado

de antibióticos e reduzir o risco de resistência de populações microbianas (FALKINER, 1988; LEIFERT et al., 1991; KNEIFEL; LEONHARDT, 1992).

De acordo com Reed et al. (1998), em microplantas de avelã, o controle da manifestação foi mais efetivo, quando utilizou-se antibióticos combinados. No entanto, neste trabalho, no tratamento que utilizou gentamicina combinada com rifampicina (T5), observou-se que, a manifestação bacteriana endofítica apresentou sutil redução em ambos os períodos de avaliação (15 e 30 dias) em relação à testemunha (T1).

Em ambos os períodos avaliados (15 e 30 dias), resultados negativos foram observados tanto para amido, quanto para proteína. A presença de compostos fenólicos foi moderadamente presente nas avaliações aos 15 dias, mantendo-se assim até os 30 dias de cultivo.

Em relação ao incremento de massa seca, em ambos os períodos avaliados, o tratamento T5 não apresentou diferença estatística em relação à testemunha, no entanto, este tratamento apresentou-se como uma das menores médias, o mesmo foi observado em relação ao número de brotações. Todavia, ao longo dos 30 dias de cultivo, este tratamento se manteve com vigor elevado e manifestação bacteriana reduzida nas microcepas de *E. cloeziana*.

Assim como em todos os tratamentos em que a gentamicina foi utilizada em combinação com outros antibióticos, T6 apresentou uma tendência a reduzir o número de brotações das microcepas aos 15 dias de cultivo. Resultados estes ainda mais expressivos e significativos aos 30 dias, sendo, em comparação com os demais, o tratamento que apresentou as menores médias neste parâmetro avaliado. Em relação ao incremento de massa seca, apesar de ter apresentado valores medianos, não diferiu significativamente dos tratamentos em que a gentamicina e a ciprofloxacina foram utilizados separadamente (T2 e T4) (Tabelas 4 e 5). Cabe ressaltar que a gentamicina, mesmo em baixas concentrações, pode ser tóxica ao vegetal (POLLOCK; BARFIELD; SHIELD, 1983; OKKELS; PEDERSEN, 1988; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), sendo a ciprofloxacina, de acordo com Ebert et al. (2011) utilizada no controle de cianobactérias por acarretar alta toxicidade, apresentando-se com efeito inibitório em seu desenvolvimento. Dessa forma, a combinação, nas concentrações aplicadas, destes dois antibióticos provavelmente, ocasionou toxicidade nas células das plantas, apesar de aos 30 dias apresentar redução moderada das manifestações bacterianas, em relação ao efeito desse tratamento aos 15 dias, porém, o objetivo deste trabalho é controlar as manifestações sem alterar o desenvolvimento das plantas.

Em relação aos testes histoquímicos, na avaliação realizada aos 15 dias de cultivo, T6 evidenciou ausência para amido, proteína e compostos fenólicos, apresentando este último, incremento significativo aos 30 dias (Tabelas 6 e 7). As avaliações anatômicas caracterizaram

as folhas das microcepas como anfihipoestomáticas com mesofilo heterogêneo, e aos 30 dias, observou-se ondulações na superfície abaxial da epiderme, característica esta que, segundo Chaves et al. (2002), ocorre quando há toxicidade de flúor na epiderme vegetal, o que conduz à ideia que a presença de ciprofloxacina, antibiótico do grupo fluoroquinolona, tenha causado esse efeito quando combinado com a gentamicina, já, quando combinado com rifampicina (T7) esta característica não foi observada.

Assim como todos os tratamentos que a ciprofloxacina foi utilizada, o tratamento T7, após os 30 dias de cultivo, apesar da manifestação bacteriana ainda estar presente, foi caracterizada reduzida e o vigor das microcepas foi elevado (Tabela 3), existem trabalhos que afirmam que o uso de antibióticos para controlar microrganismos em plantas pode ser mais eficaz se utilizado em combinações do que no seu uso individual (LEIFERT et al., 1991, KNEIFEL; LEONHARDT, 1992).

Em relação ao incremento de massa seca, apesar de não ter apresentado médias elevadas, T7 não diferiu estatisticamente da testemunha (T1). Já, quanto ao número de brotações, manteve-se entre as médias mais altas, com semelhança estatística à testemunha (Tabelas 4 e 5).

Aos 15 dias de avaliação, observou-se a presença, embora reduzida, de compostos fenólicos nos feixes vasculares colaterais e, aos 30 dias, essas substâncias não foram observadas. No mesofilo, os compostos fenólicos apresentaram reação positiva, caracterizando-se como presença reduzida, em ambos os períodos avaliados.

As folhas das microcepas submetidas ao tratamento T7 se caracterizaram como anfihipoestomáticas, com parênquima lacunoso com espaços intercelulares reduzidos, com 3 a 4 estratos celulares. Aos 30 dias de avaliação, observou-se a presença de glândulas de óleo na superfície adaxial.

No tratamento em que houve a combinação simultânea dos antibióticos gentamicina, ciprofloxacina e rifampicina (T8), apesar de não ser estatisticamente diferente da testemunha (T1) quanto ao incremento de massa seca, tanto aos 15, quanto aos 30 dias, apresentou significativa redução no número de brotações (Tabelas 4 e 5). Além disso, aos 30 dias, observou-se a ausência de amido, proteína e declínio no acúmulo de compostos fenólicos (Tabelas 5 e 6). As microcepas submetidas a este tratamento apresentaram aos 30 dias, redução no vigor, seguida de morte das microestacas na parte inferior da microcepa (figura 5). Acredita-se que este resultado seja consequência da quimioterapia constituída por três antibióticos simultaneamente, salientando que nos tratamentos com gentamicina observou-se queda no vigor e ineficiência no controle das manifestações, e a aplicação de ciprofloxacina e

rifampicina isoladamente ou em combinação (T3, T4 e T7), mantiveram as microcepas com vigor elevado e as manifestações bacterianas reduzidas. Em microplantas de tabaco os autores Eichholtz; Hasegawa e Robitaillem (1982) associaram a queda de vigor com a presença da gentamicina, onde o desenvolvimento do vegetal foi inibido consideravelmente. Desta forma, os resultados conduzem a ideia de que a gentamicina tenha sido o agente prejudicial ao desenvolvimento *in vitro* das microcepas.

A intensa atividade de um antibiótico sob um microrganismo depende de diversos fatores, dentre eles absorção pela planta hospedeira e sua estabilidade química dentro do tecido vegetal. Existem evidências de que ocorre uma alteração molecular dos antibióticos dentro do corpo vegetal, fazendo com que não haja o controle dos microrganismos, como já foi constatado em estudos clássicos (PRESCOTT; EMERSON; FORD, 1956; SANWAL, 1956). Dessa forma, uma alternativa utilizada neste trabalho foi a aplicação de um composto biocida, utilizado como conservante em cosméticos, artigos de higiene pessoal e de limpeza doméstica, que previnem o crescimento de bactérias patogênicas e não patogênicas no produto ao qual é inserido.

Sendo assim, foi testado o clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona com alto potencial como biocida, e por não apresentar risco à saúde humana, espera-se que não afete o desenvolvimento das células e tecidos vegetais. Este produto chegou ao mercado com a proposta de substituir as funções já realizadas pelos biocidas existentes e, também passou a ser utilizado para a fabricação de papel e em água de piscinas, além de uma variedade de aplicações nas indústrias (WRIGHT et al., 1983; GROOT; WEYLAND, 1988). Estudos como o de Knee (2000), idealizaram o uso deste biocida em plantas, com o intuito de proteger os vasos do xilema do acúmulo de microrganismos em flores de cortes. O autor cita que além de proteger do ataque de microrganismos, o produto não afetou o desenvolvimento do vegetal.

Baseado nessas informações, o tratamento T9 foi aplicado nas microcepas de *E. cloeziana*, onde se observou que as manifestações bacterianas foram totalmente controladas e o vigor das plantas foi caracterizado elevado quando comprado aos demais tratamentos, embora os resultados referentes ao incremento de massa seca e número de brotações, foi estatisticamente inferior à testemunha, corroborando com Minamiguchi (2013), com microplantas de batata doce.

Comparando-se tratamento T9 com os demais, pode-se inferir que este foi um dos mais eficazes para o controle das manifestações bacterianas, sendo que aos trinta dias observou-se um vigor elevado das microcepas, como se observa na figura 5I.

As folhas das microcepas submetidas a este tratamento apresentaram feixes vasculares colaterais reduzidos, única diferença tecidual observada em relação aos demais tratamentos.

Este produto vem sendo testado não apenas no cultivo *in vitro* de eucalipto, como também em ensaios com bromélias, palmeiras e orquídeas, apresentando resultados promissores (Cristina V. Almeida com. Pessoal).

As análises histoquímicas não evidenciaram presença de nenhuma substância ergástica, inferindo que as microcepas não apresentaram sintomas de estresses fisiológicos.

O último tratamento aplicado nas microcepas foi o antibiótico timentin, utilizado comercialmente na regeneração de plantas *in vitro*, principalmente em pesquisas com transformação em eucalipto, por ser altamente eficaz e não afetar o crescimento do vegetal (CHENG; SCHNURR; KAPAUN, 1998). Além disso, Costa et al. (2000) menciona que o uso de timentin tem mostrado efeitos positivos na morfogênese *in vitro* de tomate, assim como Tambarussi (2009) para regeneração de tecas, o qual observou a ocorrência de um maior número de brotações nas microplantas, utilizando esse antibiótico, assim como o observado neste trabalho, onde foi evidenciado ótimo vigor das microcepas, aumento do incremento de massa seca e maior número de brotações em relação aos demais tratamentos (Tabelas 4 e 5), apesar de não apresentar diferenças significativas em relação a testemunha. A análise nutricional das microcepas evidenciou que a assimilação de boro e cálcio foi estatisticamente significativa, evidenciando que estes dois elementos influenciaram positivamente no incremento de massa seca, número de brotações, corroborando o trabalho de Brondani et al. (2012)

As análises histoquímicas realizadas aos 15 dias de cultivo evidenciaram que o tratamento com timentin, apresentou reações negativas para proteína, amido e compostos fenólicos, já nas análises referentes aos 30 dias apenas os compostos fenólicos reagiram positivamente, semelhante ao observado em T1. Abreu et al. (2002), afirma que o acúmulo de compostos fenólicos pode estar relacionado ao estresse causado ao longo do cultivo *in vitro*, entretanto, não se deve considerar que esta seja a razão dos resultados obtidos neste trabalho, uma vez que 30 dias compreende um período considerado normal em se tratando de cultivo *in vitro* de eucalipto (BRONDANI, 2012, BACCARIN, 2012, BATAGIN-PIOTTO, 2013).

De acordo com Nogueira et al. (2008), os compostos fenólicos são descritos como metabólitos secundários, originados diretamente do metabolismo do carbono, sendo a biossíntese dessa substância diretamente relacionada a processos de crescimento e diferenciação celular, regulados pela disponibilidade de recursos ambientais. Considerando-se que os resultados referentes ao número de brotações e incremento de massa seca foram

estatisticamente significativos no tratamento com timentin (T10), as afirmações de Nogueira et al. (2008) são corroboradas neste trabalho, acrescentando-se ainda que as análises químicas para macro e micronutrientes mostraram os resultados mais relevantes nesse tratamento quando comparado aos demais.

Assim como foi observado em T6 (gentamicina + ciprofloxacina), no tratamento T10, também se observou ondulações na superfície abaxial da epiderme (Figuras 7I e 9I).

Os resultados obtidos nas avaliações nutricionais (Tabelas 7 e 8) evidenciaram maior assimilação de macro e micronutrientes na presença de timentin (T10), resultados esses diretamente relacionados com o aumento na massa seca e número de brotações, bem como, com o vigor das microcepas submetidas a esse tratamento, as quais apresentaram melhores resultados quando comparados com os demais. Costa et al. (2000), constataram efeitos semelhantes utilizando este antibiótico no meio de cultura para promover brotações tomateiro.

O uso de antibióticos durante o cultivo *in vitro* pode influenciar na absorção de nutrientes das microplantas, resultado esse constatado no presente trabalho, onde foram verificadas diferenças significativas nas microcepas submetidas aos diferentes tratamentos em relação ao controle, com exceção do tratamento T10, que evidenciou melhores resultados nos parâmetros analisados em relação à testemunha. É importante, entretanto, mencionar que, embora os demais tratamentos tenham afetado significativamente o incremento em massa seca, o número de brotações e o teor nutricional, bem como o vigor das microcepas e os perfis de DGGE, evidenciaram flutuações na microbiota endofítica, na presença de agentes antimicrobianos isoladamente ou em combinações variáveis, utilizados nesse experimento. Esses resultados também foram observados por Abreu-Tarazi (2010) em ensaios de antibioticoterapia, no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro.

A elevada dissimilaridade na microbiota bacteriana endofítica das microcepas nos respectivos tratamentos, em ambos os períodos de análise (15 e 30 dias), evidenciaram aos 15 dias, que somente os tratamentos T2 e T3 apresentaram similaridade em relação a testemunha, como se observa na Figura 14, onde esses tratamentos se encontram no mesmo quadrante da testemunha. Esse resultado pode ser decorrente não somente da ação de cada agente antimicrobiano, mas também da especificidade da microbiota endofítica com seu hospedeiro. Segundo Batagin-Piotto (2013), a especificidade da interação endófito/microplanta vai muito além da espécie, podendo se tratar de uma especificidade entre clones ou mesmo, entre indivíduos do mesmo clone.

Não obstante, o tempo de exposição das microcepas aos respectivos agentes antimicrobianos, pode influenciar na flutuação das comunidades. Segundo Abreu-Tarazi

(2010), o uso prolongado destes compostos pode acarretar o desequilíbrio homeostático, uma vez que para a remoção das manifestações, muitas vezes os endófitos são drasticamente afetados. Essa afirmação corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que, após 30 dias, foi observada significativa redução na diversidade bacteriana dos respectivos tratamentos quando comparados aos 15 dias de cultivo.

Dessa forma, pode-se dizer que com 30 dias de cultivo sob efeito de antibióticos, ocorreu aleatoriedade dos perfis das comunidades bacterianas nas microcepas de *E.cloeziana*, provavelmente em decorrência da diminuição de populações microbiana, o que dificultaria um perfil mais fiel.

Outro parâmetro a ser analisado refere-se ao possível estresse ocasionado às microcepas em relação ao tempo de cultivo, uma vez que houve alteração na composição da comunidade bacteriana endofítica nas microcepas isentas de agentes antimicrobianos (T1), conforme pode se observar nas Figuras 14 e 15. Segundo Batagin-Piotto (2013), o intervalo prolongado entre os subcultivos pode causar um estresse, o qual por sua vez poderá ocasionar a quebra do equilíbrio homeostático estabelecido entre a microcepa e os microrganismos, bem como entre os microrganismos já manifestados e os microrganismos ainda latentes.

O tempo de exposição aos antibióticos, também pode ter gerado um demasiado estresse nas microcepas, o qual pode ser responsável pela similaridade entre os perfis das comunidades bacterianas observada na Figura 15. É importante, entretanto, levar em consideração o espectro de ação dos antibióticos, onde alguns deles são bactericidas e outros bacteriostáticos. O antibiótico rifampicina pertence ao grupo das rifamicinas (MOUTON et al., 2000), com amplo espectro de ação sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, tendo ação bacteriostática, no entanto, também pode se observar seu efeito como bactericida, devido ao fato de os microrganismos apresentarem sensibilidade a este antibiótico, por inibir a iniciação da síntese de RNA, por se ligarem à subunidade β da RNA polimerase (di MAURO et al., 1969; TRAVERS; BURGESS, 1969; JIN; ZHOU, 1996;). O antibiótico timentin pertence ao grupo β -lactâmicos, têm ação bactericida apenas quando as bactérias estão na fase de crescimento ativo, bloqueando a divisão celular das bactérias (MEDIIVILLA, FLÓREZ E GARCÍA-LOBO, 1997). Já, o grupo dos aminoglicosídeos, a gentamicina tem ação bactericida para a maioria das bactérias aeróbias Gram-negativas e algumas Gram-positivas, agem na inibição da síntese proteica, bem como na redução da síntese já inicializada (FOX, 2006), enquanto a ciprofloxacina, fluoroquinolona sintética, do grupo das quinolonas, tem ação bactericida efetiva tanto contra bactérias Gram-negativas, quanto Gram-positivas (FOX, 2006).

Agentes antimicrobianos industriais, ou biocidas, diferem dos antibióticos pelo fato de serem em geral, menos específicos e, portanto, menos provável que induzam a resistência bacteriana (BALLANTYNE; JORDAN, 2004). Possuem alta eficiência contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GROOT; WEYLAND, 1988).

A maioria dos agentes antimicrobianos apresentou aos 30 dias de cultivo, similaridade na diversidade bacteriana endofítica com o tratamento testemunha (Figura 15), apresentando-se nos mesmos quadrantes que o T1, com exceção do tratamento com timentin (T10), onde as microcepas apresentaram uma significativa diferença na diversidade endofítica em relação as microcepas isentas de antibiótico.

É importante novamente mencionar, que as microcepas mantidas sob ação do antibiótico timentin (T10), apresentaram os melhores resultados nos parâmetros analisados, levantando a hipótese que, embora esse tenha alterado a composição da microbiota endofítica das microcepas em relação à testemunha, a sua utilização pode ter resultado em uma seleção benéfica de microrganismos, assim como o observado no tratamento com o biocida clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona (T9).

Dessa forma, pode-se considerar que os efeitos benéficos ou prejudiciais das manifestações endofíticas sobre as plantas *in vitro*, sejam devido à ação conjunta de um grupo de microrganismos, os quais coexistem em equilíbrio homeostático com as plantas, e cujos mecanismos são altamente específicos e complexos. Assim acredita-se que a manifestação deva ser controlada, com subcultivos (renovação do meio de cultura) periódicos e o uso de agentes antimicrobianos específicos para cada espécie.

A associação existente entre microrganismos intercelulares e seu hospedeiro pode ser mais frequente do que se é relatado, e pode estar relacionada ao potencial morfogenético acelerado de plantas micropropagadas, dentre outros fatores bioquímicos e morfológicos.

7 CONCLUSÕES

- ✓ O antibiótico gentamicina, além de não controlar as manifestações bacterianas, ocasionou queda no vigor das microplantas de *E. cloeziana*;
- ✓ Os antibióticos rifampicina e ciprofloxacina apesar de não afetarem o vigor das microcepas de *E. cloeziana*, não foram eficientes no controle da manifestação bacteriana;
- ✓ O biocida clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona e o antibiótico timentin foram os agentes antimicrobianos que apresentaram maior efetividade no controle das manifestações bacterianas na cultura *in vitro* de microcepas de *E. cloeziana*;
- ✓ O antibiótico timentin além de ter controlado as manifestações bacterianas em *E. cloeziana*, as microcepas apresentaram maior vigor em função da maior assimilação dos nutrientes avaliados;
- ✓ A adição dos agentes microbianos não interferiu drasticamente no perfil das comunidades bacterianas endofíticas nas microcepas de *E. cloeziana*.

REFERÊNCIAS

- ABRAF. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2011**. Brasília, 2012.150p.
- ABREU I.N.; PINTO B.P.; FURTININETO A.E.; BERTOLUCCI S.K.V.; LADEIRA A.; GEROMEL C. Nitrogênio e fósforo na produção vegetal e na indução de mucilagem em plantas de insulina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, p.536-540, 2002.
- 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 – São Paulo, 2010.
- ABREU-TARAZI, M.F.; NAVARRETE, A.A.; ANDREOTE, F.D.; ALMEIDA, C.V.; TSAI, S.M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.26, p.555-560, 2010.
- ALFENAS, A.C. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442p.
- ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.467-470, 2005.
- ALMEIDA C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.25, p.1757-1764, 2009.
- ALMEIDA, F.D. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estquia e miniestquia**. 2006. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais, 2006.
- ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson**. 2012. 107p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2012.
- ALMEIDA, M. **Emprego da cultura “*in vitro*” para a multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Palmae**. 1994. 120p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- 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.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, p.143-169, 1995.

ANDERSON, H.W.; GOTTLIEB, D. Plant Disease Control with Antibiotics. **Economic Botany**, Saint Louis, v.6, p.294-308, 1952.

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.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.40, p.417-432, 2009.

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

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

ANSARI, T.M.; IKRAM, N.; NAJAM-UL-HAQ, M.; FAYYAZ, I.; FAYYAZ, Q.; GHAFOR, I.; KHALID, N. Essential trace metal (zinc, manganese, copper and iron) levels in plants of medicinal importance. **International Journal of Biological Sciences**, Maryland, v.4, p.95-99, 2004.

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

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

ASSIS, T.F. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia** In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTUS, Salvador, 1997. **Anais...** Colombo: EMBRAPA/CNPQ. v.1, p.300-304, 1997. p.300-304.

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, CNPH, 1998. p. 261-296.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p.117-137.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.; 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, J.L.; ARAÚJO, W.L. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. **Mutation Research**, Amsterdam, v.544, p.223-233, 2003.

BACCARIN, F.J.B. **Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**. 2012. 78p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2012.

BACCHI, A.; PELIZZI, G.; NEBULONI, M.; FERRARI, P. Comprehensive study on structure-activity relationships of rifamycins: Discussion of molecular and crystal structure and spectroscopic and thermochemical properties of rifamycin. **Journal of Medicinal Chemistry**, Gerezano, v.41, p.2319-2331, 1998.

BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P, BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, n.2, p.349-360, 2010.

BALLANTYNE, B.; JORDAN, S.L. Biocides. In: MARRS, T.C.; BALLANTYNE, B. **Pesticide toxicology and international regulation**. Chichester:Wiley, 2004. 535p.

BARROW, J.R.; LUCERO, M.E.; REYES-VERA, I.; HAVSTAD, K.M. Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress? **Communicative and Integrative Biology**, Austin, v.1, p.69-73, 2008.

BATAGIN-PIOTTO, K.D. **Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage 2013**. 165p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2013.

BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Kingston, v.57, n.3, p.101-110, 2000.

BLAZICH, F.A. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides, 1988. p.132-149.

BOLAND, D.J.; BROOKER, M.I.H.; CHIPPENDALE, G.M.; HALL, N.; HYLAND, B.P.M.; JOHNSTON, R.D.; KLEINIG, D.A.; McDONALD, M.W.; TURNER, J.D. **Forest Trees of Australia**. Melbourne:Nelson and CSIRO, 1984. 768p.

BOLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A.P.N *Eucalyptus* leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne:Inkata, 1991. p.11-28.

BONATO, C.M.; RUBIN FILHO, C.J.; MELGES, E.; dos SANTOS, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Maringá:Universidade Estadual de Maringá (UEM), 1998. 58p.

BRAY, J.R.; CURTIS, J.T. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, Washington, v.27, n.4, p.325–349, 1957.

BRESSAN, W.; VASCONCELLOS, C.A. Alterações morfológicas no sistema radicular do milho induzidas por fungos micorrízicos e fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.509-517, 2002.

BRONDANI, G.E.; ONDAS, H.W.de W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Corvallis, v.48, n.5, p.35-48, 2012.

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

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v.36, p.214-216, 2004.

BUCKLEY, P.M.; DeWILDE, T.N.; REED, B.M. Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Corvallis, v.31, p.58–64, 1995.

CAMPOE, O.C.; STAPE, J.L.; LACLAU, J.P.; MARSDEN, C.; NOUVELLON, Y. Stand-level patterns of carbon fluxes and partitioning in a *Eucalyptus grandis* plantation across a gradient of productivity, in São Paulo State, Brazil. **Tree Physiology**, Oxford, v.32, n.6, p.696-706, 2012.

CARROLL, G. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N.J.; VAN DER HEAVEL, J. (Ed.). **Microbiology of the Phylloplane**. London: Cambridge University Press, 1986. p.205-222.

CASTRO, A.C.R. **Deficiência de macronutrientes em Helicônia ‘Golden Torch’**. 2007. 102p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

CHAPERON, H. Vegetative Propagation of Eucalyptus. In: SYMPOSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENETICO DE ESPECIES FLORESTALES, 1987. Buenos Aires, Argentina. **Anales...** (s.l): AFOCEL, 1987. p.215-232.

- CHAVES, A.L.F.; SILVA, E.A.M.; AZEVEDO, A.A.; CANO, M.A.O.; KIYOSHI, M. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-rhodes) – Poaceae. **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, v.16, p.395-406, 2002.
- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v.41, p.252-263, 2001.
- CHENG, Z.M.; SCHNURR, J.A.; KAPAUN, J.A. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.17, p. 646–649, 1998.
- COSTA, M.G.C.; NOGUEIRA, F.T.S.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CECON, P.R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.19, p.327–332, 2000.
- COTTERIL, P.P.; BROLIN, A. Improving Eucalyptus wood, pulp and paper quality by genetic selections. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPT, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1997. p.1-13.
- CRISAN, I.; ZAHARIA, C.N.; POPOVICI, F.; JUCU, V.; BELU, O.; DASCALU, C.; MUTIU, A.; PETRESCU, A. Natural Propolis Extract Nivcrisol in the Treatment of Acute and Chronic Rhinopharyngitis in Children. **Romanian Journal of Virology**, Bucureste, v.46, p.115-133, 1995.
- Di MAURO, E.; SNYDER, L.; MARINO, P.; LAMBERTI, A.; COPPO, A.; TOCCHINI-VALENTINI, G.P. Rifampicin Sensitivity of the Components of DNA-dependent RNA Polymerase, **Nature**, London, v.222, p.533-537, 1969.
- 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.
- DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58, p.49-59, 2009.
- EBERT, I.; BACHMANN, J.; KÜHNEN, U.; KÜSTER, A.; KUSSATZ, C.; MALETZKI, D.; SCHLÜTER, C. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v.30, n.12, p.2786-2792, 2011.
- EICHHOLTZ, D.A.; HASEGAWA, P.M.; ROBITAILLEM, H.A. Effects of gentamicin on growth of shoot initiation from cultured tobacco callus and salpiglossis leaf discs. **In Vitro**, Santiago, v.18, n.1, p.12-14, 1982.

ESPOSITO-POLESI, N.P. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. 2010. 121p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 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.

ESTANISLAU, A.A.; BARROS, F.A.Z, PEÑA AP, SANTOS SC, FERRI PH, PAULA JR. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.11, p.95-98, 2001.

FALKINER, F.R. Strategy for the selection of antibiotics for use against common bacterial pathogens and endophytes of plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.225, p. 53-56, 1988.

FANG, J.Y.; HSU, Y.R. Molecular Identification and Antibiotic Control of Endophytic Bacterial Contaminants from Micropropagated Aglaonema cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.110, p.53–62, 2012.

FERREIRA, E.M.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; LEITE, H.G.; SARTORIO, R.C.; FILHO, R.M.P. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.2, p.183-187, 2004.

FOX, A. 2006. Antibiotics that Affect Plant Envelope. Disponível em <<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/antibiotics1.htm>> Acesso em: 30 Ago. 2012, às 13:00hrs.

GAI, C.S.; DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; LOPES, J.R.S.; ARAÚJO, W.L.; MILLER, T.A.; AZEVEDO, J.L.; LACAVA, P.T. Endophytic Bacteria Associated to Sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae), Insect Vectors of *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, Westlake, v.2, n.3, p.2-8, 2011.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN ELSAS, J.D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, New York, v.41, p.369-383, 2001.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht:Springer, 2008. 501p.

GOERKE, C.; KÖLLER, J., WOLZ, C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v.50, n.1, p.171-177, 2005.

GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.4, p.699-703, 2003.

GOODMAN, L.S.; HAYDEN, F.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. São Paulo: Mac Graw-Hill Interamericana, 1996. 1160p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. 433p.

GROOT, A.C.; WEYLAND, J.W. KATHON CG: a review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Bristol, v.18, n.2, p.350-358 part I, 1988.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Apostila de Biotecnologia vegetal, 2006. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila.htm>>. Acesso em: 22 jan. 2013.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova**, São Paulo, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

GUIMARÃES, P.T.C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A.M.P. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação *in vitro* de Samambaia-espada (*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, p.309-316, 1999.

GUO, S.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Heidelberg, v.44, p.153-158, 2008.

HALDEMAN, J.H. ; THOMAS, R.L.; McKAMY, D.L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **HortScience**, Alexandria, v.22, p. 306-307, 1987.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMAN, N.A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.43, p.895-914, 1997.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological eelectronica**, Copenhagen, v.4, p.1-9, 2001.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPH, 1990. p.203-212.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. 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.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P. SMALLA, K., WELLINGTON, E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-

electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.3233-3241, 1997.

HIGASHI, E.N. **Diagnose da eficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus* spp. cultivados *in vitro***. 1996. 90p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 1996.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.14, p.190-197, 1996.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEK, B.M.; PACE, N.R. Impacto f culture independente studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, New York, v.180, p.4765-4774, 1998.

HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J.; ROCKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.4399–4406, 2001.

IZUMI, H.; MOORE, E.R.B.; KILLHAM, K.; ALEXANDER, I.J.; ANDERSON, I.C. Characterisation of endobacterial communities in ectomycorrhizas by DNA- and RNA-based molecular methods. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v.39, p.891–899, 2007.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, **Medical Microbiology**, 25. ed. McGraw-Hill Medical, 2012. 880p.

JIN, D.J.; ZHOU, Y.N. **Mutational analysis of structure-function relationship of RNA polymerase in *Escherichia coli* in “Methods in enzymology”** In: ADHYA, S., Ed.), New York: Academic Press, 1996.v.273, p.300-319.

JOYNT. J.; BISCHOFF, M.; TURCO, R.; KONOPKA. A.; NAKATSU, C.H. Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. **Microbial Ecology**, New York, v.51, p.209-219, 2006.

KARNOVSKY, M.J.A. A Formaldehyde-glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for use in Electron Microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, n.2, p.137-138, 1965.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.1 p.30-33, 1997.

KULKARNI, A.A.; KELKAR, S.M.; WATVE, M.G.; KRISHNAMURTHY, K.V. Characterization and Control of Endophytic Bacterial Contaminants *in vitro* cultures of *Piper* spp., *Taxus baccata* subsp. *wallichiana*, and *Withania somnifera*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.53, p.63-74, 2007.

KNEE, M. Selection of biocides for use in floral preservatives. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v.18, p.227-234, 2000.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.29, p.139-144, 1992.

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

LACAZ, C.S **Antibióticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. 510p.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p.43-84.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S.M.; WAITES, B.; CHEYNE, V.A.; WAITES, W.M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 71, n. 4, p. 307-330, 1991.

LESTER, W. Rifampin: a semisynthetic derivative of rifamycin-a prototype for the future. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.26, p.85-102, 1972.

LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (Musa AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.36, n.3, p.181-186, 2006.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Southold, v.30, p.421-427, 1981.

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**, Uberlândia, v.23, n.3, p.94-100, 2007.

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

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock: Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 986p.

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

MANTELL, S.H.; MATTHEUS, J.A.; McKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 333p.

MAYER, G. Antibiotics: Protein Synthesis, Nucleic Acid Synthesis and Metabolism. 2006. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu.fox/antibiotics1.htm>. Acesso em: 30 Ago. 2012.

MEDGRUPO. **Manual de antibioticoterapia**: residência médica. Rio de Janeiro: Medwriters Editora, 2008. 64p.

MEDIAVILLA, A.; FLÓREZ, J. GARCÍA-LOBO, J.M. Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. In: **Farmacología Humana**. 5th ed. Santander:Elsevier, 1997. 1479p.

MELO, N.F.; OKASAKI, W.Y.; LEITE C.B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, p.102-107, 1999.

MELO, B. **Cultivo de Embrião *in vitro* da Gabirobeira (*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.)**. 2000. 117p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2000.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Switzerland.: Bern: Intern. Potash Institute, 1987. 687p.

MINAMIGUCHI, J.Y. **Uso de diferentes gelificantes e de um esterilizante em cultura de segmentos nodais de batata doce**. 2013. 77p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente – São Paulo, 2013.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. **Phytopathology**, São Paulo, v. 80, p. 808-811, 1990.

MOURA, V.P.G.; MELO, J.T., SILVA, M.A. Comportamento de Procedências de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. aos nove e meio anos de idade, em Planaltina, DF área de Cerrado. **IPEF**, Piracicaba, n.46, p.52-62, 1993.

MOUTON, Y.; BINGEN, É. Y.; DEBOSCKER, Y.; DUBREUIL, L. **Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux**. Paris: John Libbey Eurotext, 2000. 141p.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-493, 1962.

MUYZER, G.; de WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel eletrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.695-700, 1993.

MUYZER, G. DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Vatican, v.2, p.317–322, 1999.

NAUERBY, B.; BILLING, K.; WYNDAELE, R. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration compared to carbennicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, Oxford, v.123, p.169-177, 1997.

NEHRA, N.S.; BECWAR, M.R.; ROTTMANN, W.H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H.D.; KODRZYCKI, R.J.; ZHANG, C.; GAUSE, K.C.; PARKS, D.W.;

HINCHEE, M.A. Forest Biotechnology: Innovative Methods, Emerging Opportunities. ***In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant***, Corvallis, v.41, n.6, p.701-717, 2005.

NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microorganismos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v.3, p.69-72, 2004.

NILSEN, E.T.; ORCUTT, D.M. **The Physiology of Plants under Stress – Abiotic factors**. New York, John Wiley, 1996. 683p.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; LIMA, E C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMRICH, E.B.; CASTRO, A.H.F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, p.44-48, 2008.

OKKELS, F.T.; PEDERSEN, M.G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. **Acta Horticulture**, Wageningen, v.225, p.199-207, 1988.

OLIVEIRA, A.C.; FONSECA, E.P.; ANJOS, N.; SANTOS, G.P.; ZANÚNCIO, J.C. Resistência Interespecífica de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) à Lagarta Desfolhadora *Thyrineina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.8, n.2 p.93-103, 1984.

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

OLIVEIRA, J.F.P.; CIPULLO, J.P.; BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v.21, n.4, p.444-452, 2006.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

PAMPHILE, J.A.; AZEVEDO, J.L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from Maize (*Zea mays* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, 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***, Corvallis, v.43, p.614-622, 2007.

PASSADOR, G.C. **Resistência à Ferrugem e Análise de Isoenzimas em Procedência e Progênes de *Eucalyptus cloeziana***. 1994. 69p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais. 1994.

PAZ, I.C.P. ; SANTIN, R.C.M.; GUIMARÃES, A.M. ; ROSA, O.P.P.; DIAS, A.C.F. ; QUECINE, M.C.; AZEVEDO J.L.; MATSUMURA, A.T.S. *Eucalyptus* growth promotion by

endophytic *Bacillus* spp. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.11, n.4, p.3711-3720, 2012.

PELCZAR, M.J.; CHANE, E.C.S.; KRIEG, R.N. **Microbiologia Conceitos e Aplicações**. 2ed. São Paulo: Ed. McGraw-Hill, 1997. v.2.517p.

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

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

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**, London, v.95, p.47-55, 2008.

PINHAL, H.F.; ANASTÁCIO, M.R.; CARNEIRO, P.A.P.; da SILVA, V.J.; de MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.7, p.1136-1142, 2011.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G., SHIELD, R. The toxicity of antibiotics to plant cell culture. **Plant cell reports**, New York, v.2, p.36-39, 1983.

PRESCOTT, G.C; EMERSON, H.; FORD, J.H. Pesticide residues: determination of cycloheximide (acti-dione) residues in cherries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.4, p.343-345, 1956.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 102p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada - Biomoléculas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Botucatu – São Paulo, 2012.

QUECINE, M.C.; ARAÚJO, W.L.; ROSSETTO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LAVACA, P.T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1 **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.78, n.21, p.7511-7518, 2012.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Oxon, v. 38, p.115-124, 2002.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v.151, p.167-177, 2000.

RATNIEKES, E.; ASSIS, T.F. O que há adiante da árvore? **O papel**, São Paulo, v.54, n.1, p.41-48, 1993.

REED, B.M.; BUCKLEY, P.M.; DeWILDE, T.N. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. ***In Vitro Cellular and Development Biology***, Oxon, n.31, p.53-57, 1995.

REED, B.M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, Dordrecht, v.52, p.67-70, 1998.

REUVENI, O.; SHLESINGER, D. R.; LAVI, U. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. ***Plant Cell Tissue and Organ Culture***, Dordrecht, v.20, p.41-46, 1990.

ROTUNDO, C.C. **Efeitos de Concentrações de Nitrato de amônio na Multiplicação e no enraizamento *in vitro* de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell e *Eucalyptus citriodora* Hook.** 1993. 74p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba - São Paulo, 1993.

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

SANWAL, B.D. Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. ***Phytopathology***, Berlin, v.25, p.334-384, 1956.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. - **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1974. 56p.

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

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.) **Interação Planta-Patógeno – fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. de. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Educs, 2002. 433p.

SILVA, M.E. **Comunidades fúngicas endofítica, epifítica e rizosférica em diferentes ecossistemas**. 2006. 97p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, 2006.

SILVA, M.C.P. **Interação entre *Methylobacterium extorquens* e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)** 2008. 81p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2008.

SILVA, J.A.T.; NHUT, D.T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). ***Scientia Horticulturae***, Amsterdam, v.97, p.397–410, 2003.

SOBRAL, J.K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófito-plantas**. 2003. 189p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2003.

SPINOSA H.S. Antibióticos: tetraciclina e cloranfenicol. In: IBID. (Ed.), **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1996. p.368-371.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, p.535-544, 2003.

TAMBARUSSI, E.V. **Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera*** 2009. 123p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3th ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

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**, Oxon, v.40, p.603-607, 2004.

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

THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.124, p.469-474, 2010.

TOLEDO, C.P. **Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar** 2011. 73p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2011.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 5. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu Rio, 2008. 780p.

TRAVERS, A.A.; BURGESS, R.R. Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. **Nature**, London, v.222, p.537-540, 1969.

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**, Moscou, v.42, p.229-235, 2006.

VIANNA, G.R.; COUTO, F.A.A.; OLIVEIRA, A.B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, Campinas v.56, n.2, p.249-254, 1997.

VITAL, B.R.; DELLA LUCIA, R.M. Propriedades físicas e mecânicas da madeira de eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.12, n.141, p.71-74, 1986.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. 258p.

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

WEBER K.P.; MITZEL M.R.; SLAWSON R.M.; LEGGE R.L. Effect of ciprofloxacin on microbiological development in wetland mesocosms. **Water Research**, London, v.45, n.10, p.3185-3196, 2011.

WIECHETECK, M.S.S. **Micropropagação de *Eucalyptus viminalis* Lahil L a partir de Material Juvenil**. 1990. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Paraná, 1990.

WINNAAR, W. Clonal propagation of papaya *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.12, p.305-310, 1988.

WRIGHT, C.; GINGOLD, E.; VENITT, S.; CROFTON-SLEIGH, C. Mutagenic activity of Kathon, and industrial biocide and cosmetics preservative containing 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, London, v.119, p.35-43, 1983.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.105, p.149-158, 2011.

YOUNG, P.M.; HUTCHINS, A.S.; CANFIELD, M.L. Use of Antibiotics to Control Bacteria in Shoot Cultures of Woody Plants. **Plant Science Letters**, Limerick, v.34, p.203-209, 1984.

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

ZANUNCIO, J.C.; MEZZOMO, J.A.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, A.C. Influence of strips of native vegetation on Lepidoptera associated with *Eucalyptus cloeziana* in Brazil. **Forest Ecology and Management**, Wageningen, v.108, n.1, p.85-90, 1998.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, New York, v.45, p.529-564, 2005.