Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia

Monita Fiori de Abreu Tarazi

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

Piracicaba
2010

Monita Fiori de Abreu Tarazi
Engenheira Agrônoma

Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia

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

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

Piracicaba
2010

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

Tarazi, Monita Fiori de Abreu
Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia / Monita Fiori de Abreu Tarazi. - - Piracicaba, 2010.
137 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Abacaxi 2. Antibióticos 3. Bactérias 4. Cultura de tecidos vegetais 5. Fisiologia vegetal 6. Micropropagação vegetal 7. Microrganismos endofiticos I. Título

CDD 634.774
T178c

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

Dedico à todos que me incentivaram com seus exemplos de vida e amor,

à todos que acreditam em mim,

aos meus pais, à minha irmã,

em especial, ao meu marido Roberto Tarazi

AGRADECIMENTOS

Ao orientador e amigo, Prof. Dr. Marcílio de Almeida por me receber de braços abertos; pela sabedoria e ponderação a cada decisão; por ter contribuído de forma tão afetuosa na minha formação acadêmica, profissional e pessoal; por ter me orientado em cada momento de dúvida ou incerteza, me tranqüilizando e incentivando para que eu pudesse cumprir as minhas metas acadêmicas e pessoais. Reconheço que você confiou a mim parte de seu sonhos.

Á Prof. Dr. Siu Mui Tsai pela orientação e grande amizade; por abrir as portas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA para mim e para o Roberto; por compartilhar sua experiência de vida conosco; por saber conciliar orientação, atenção e carinho; por incentivar sempre o meu crescimento pessoal e profissional e por me fazer sentir em casa ao seu lado.

Á Dr. Cristina Vieira de Almeida por me mostrar o mundo dos microrganismos endofíticos com o ponto de vista mais entusiasmado de todos; pela grande amizade; pelos ensinamentos que foram muito além da academia; por ser sempre tão atenciosa e solícita; pelo otimismo que representou a principal marca da minha trajetória ao seu lado, mas principalmente por ter acreditado em mim desde o início.

Ao meu marido, Roberto Tarazi pelos inúmeros momentos de paciência ao meu lado, por me incentivar com o olhar mais amoroso e com as palavras mais tranqüilizadoras do mundo; por me ajudar na redação e discussões desta tese; por me ajudar a reerguer depois de alguns tropeços e vibrar ao meu lado diante dos meus saltos mais altos; pelas maravilhosas refeições que celebram os momentos doces e minimizam os amargos; por ser meu companheiro amado.

Aos amigos da equipe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA pela companhia e, especialmente, por me ensinarem muitas das técnicas apresentadas nesta tese, vocês foram o principal motivo para que eu seguisse a minha rotina tão feliz – Acácio, Ademir, Aline, Amanda, Bianca, Bianca “manauara”, Caio, Camila, Chiquinho, Dani, Elias, Enéas, Ezio, Fabi, Fabio, Fernanda, Lilian, Lucas, Ludmila, Lucy, Maju, Mari, Mariana, Marquinhos, Marcon, Medau, Milena, Othon, Renata, Rodrigo e Wagner.

À equipe do Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva da ESALQ que me fizeram sentir acolhida, bem quista em todos os dias de trabalho; pelo apoio e principalmente por

estarem sempre disponíveis para me ajudar – Cássia, Érika, Gabi, Gilvano, Heron, Katherine, Kátia, Laura, Malu, Marcela, Maysa, Natália e Thais.

Ao Dr. Maurício José Serpa Barros de Moura pelas sugestões e ajuda nas análises estatísticas que abrilhantaram esta tese.

Ao Dr. Fernando Dini Andreote pela paciência a cada dúvida minha e pelas relevantes contribuições durante todo o projeto de pesquisa.

Aos amigos do coração que me aconselharam, compartilharam minhas alegrias e me apoiaram nos momentos mais difíceis – Amancio e Tais, Bia e Flávio, Camilla e Felipe, Luciano e Carla, Fernanda e Beloca, Rosane e Celso, famílias Hardt de Carvalho, Schivinsky, Zago da Silva, Rosa Leite, Martins Gomes, Lopes Borges, S P Souza, Medina Dutra, Fiori, Abreu, Patitucci e Tarazi.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela bolsa de doutorado e financiamento do projeto (Proc. 2007/06731-6).

"Ali onde eu chorei, qualquer um chorava. Dar a volta por cima que eu dei, quero ver quem dava."
(Paulo Emílio Vanzolini é professor, zoólogo, compositor brasileiro e um dos idealizadores da FAPESP)

"Esqueça os tempos de aflição, mas nunca esqueça o que eles lhe ensinaram."
(Herbert Spencer Gasser foi pesquisador das células nervosas, Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1944)

"Não desista. Vá em frente. Sempre há uma chance de você tropeçar em algo maravilhoso. Nunca ouvi falar em ninguém que tivesse tropeçado em algo enquanto estava sentado."
(Charles Franklin Kettering foi inventor e filósofo, criador da DELCO e outras 140 patentes)

SUMÁRIO

RESUMO **9**
ABSTRACT **11**
LISTA DE FIGURAS **13**
LISTA DE TABELAS **17**
1 INTRODUÇÃO **19**
2 OBJETIVOS **23**
2.1 Objetivo geral 23
2.2 Objetivos específicos 23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **25**
3.1 Cultura de tecidos vegetais 25
3.2 Bactérias endofíticas 27
3.3 Bactérias endofíticas no desenvolvimento vegetal 29
3.4 Bactérias endofíticas na micropropagação 30
3.5 O efeito de antibióticos sobre bactérias 32
3.6 O uso de antibióticos nas plantas 36
3.7 O estudo de comunidades bacterianas endofíticas 39
3.7.1 Métodos dependentes de cultivo 40
3.7.2 Métodos independentes de cultivo 41
3.7.2.1 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) 42
3.7.2.2 Análise automatizada do espaço intergênico ribossomal (ARISA) 44
3.7.2.3 Microscopia 44
4 MATERIAL E MÉTODOS **47**
4.1 Material vegetal e cultivo *in vitro* 48
4.2 Métodos dependentes de cultivo 49
4.2.1 Isolamento de bactérias endofíticas 49
4.3 Métodos independentes de cultivo 52
4.3.1 Extração do DNA genômico total das microplantas 52
4.3.2 Avaliação da comunidade bacteriana endofítica em raízes, folhas jovens e adultas 53
4.3.2.1 PCR-DGGE 53
4.3.2.2 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) 54
4.3.2.3 Clonagem e sequenciamento de bandas de DGGE 55

4.3.3 Avaliação da comunidade bacteriana endofítica em microplantas sob diferentes períodos de cultivo 57
4.3.3.1 PCR-DGGE 58
4.3.3.2 PCR-ARISA 58
4.3.3.3 Análise automatizada do espaço intergênico ribossomal (ARISA) 58
4.3.4 Antibioticoterapia 59
4.3.4.1 Análises morfofisiológicas 60
4.3.4.1.1 Análises estatísticas 60
4.3.4.1.2 Análises anatômicas 62
4.3.4.2 PCR-DGGE 63
4.3.4.3 Clonagem e sequenciamento de bandas de DGGE 63
4.3.4.4 Análise ultraestrutural 64
5 RESULTADOS 65
5.1 Métodos dependentes de cultivo 66
5.1.1 Isolamento de bactérias endofíticas 66
5.2 Métodos independentes de cultivo 67
5.2.1 Avaliação da comunidade bacteriana endofítica em raízes, folhas jovens e adultas 67
5.2.2 Avaliação da comunidade bacteriana endofítica em microplantas sob diferentes períodos de cultivo 70
5.2.3 Antibioticoterapia 73
6 DISCUSSÃO 87
7 CONCLUSÕES 101
REFERÊNCIAS 103

RESUMO

Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia

O cultivo *in vitro* de plantas possibilita o controle de fatores ambientais e nutricionais, facilitando o estudo da interação planta-bactéria e a interpretação de eventuais alterações morfofisiológicas nas microplantas, decorrentes dessa interação. Entretanto, a presença de bactérias endofíticas na micropropagação é quase sempre caracterizada como contaminação microbiana prejudicial, sendo prontamente eliminada com o uso de quimioterápicos. Essa abordagem desconsidera os efeitos benéficos que bactérias endofíticas podem trazer ao desenvolvimento vegetal, aniquilando a possibilidade de se explorar esse potencial no ambiente *in vitro*. Em geral, devido a sua baixa culturabilidade, as comunidades bacterianas endofíticas requerem o uso de técnicas independentes de cultivo para seu estudo. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal comprovar a presença de uma comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. IAC Gomo-de-mel consideradas axênicas e os efeitos dessa comunidade na morfofisiologia vegetal após antibioticoterapia. Para tanto, técnicas de PCR-DGGE, PCR-ARISA, clonagem, sequenciamento, análises estruturais e ultraestruturais foram utilizadas. Os resultados evidenciaram que existe uma comunidade bacteriana endofítica composta por membros de α, β, γ-proteobactérias, actinobactérias e cianobactérias, que coloniza as microplantas. Os resultados convergentes de PCR-DGGE e PCR-ARISA mostraram que essa comunidade apresentou alteração na sua estrutura e diversidade de acordo com seu nicho de colonização e com o período de cultivo da planta hospedeira, sem renovação de meio de cultura. A ação da antibioticoterapia influenciou a estrutura da comunidade bacteriana, promovendo impactos diferenciados em cada grupo bacteriano avaliado. A antibioticoterapia não promoveu a total eliminação das bactérias endofíticas. Contudo, os tratamentos ocasionaram alterações na comunidade bacteriana, resultando na redução do crescimento de raízes e outras alterações histológicas no sistema radicular das microplantas. As análises ultraestruturais comprovaram a presença de bactérias endofíticas colonizando intracelularmente o mesofilo foliar e o córtex de raízes, mesmo após a antibioticoterapia. Dessa forma, conclui-se que em microplantas de abacaxizeiro assintomáticas existe uma comunidade bacteriana endofítica intracelular, rompendo o principal paradigma da cultura de tecidos vegetais, no qual microplantas são obrigatoriamente axênicas.

Palavras-chave: Bactérias; Endófitos; *Ananas*; Micropropagação; Antibióticos; Axênicas.

ABSTRACT

Bacterial endophyte community in pineapple microplants: structure, diversity and its influence on morphophysiology after antibiotic therapy

The *in vitro* culture of plants by the control of environmental and nutritional factors, allows the study of the plant-bacteria interaction and the interpretation of possible morphophysiological changes in the microplants, from such interaction. However, the presence of endophytic bacteria in micropropagation is often characterized as harmful microbial contamination, which is promptly eliminated by the use of chemotherapeutics. This approach does not take into account the beneficial effects that endophytic bacteria can bring to the plant development, and annihilates the possibility of exploiting this potential in the *in vitro* environment. In general, due to its low culturability, endophytic bacterial communities require the use of culture-independent techniques for their study. In this context, this work aimed to prove the presence of bacterial endophytes in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. IAC Gomo-de-mel microplants considered axenics, and the effects of these in plant morphophysiology after antibiotictherapy. For this, PCR-DGGE, ARISA-PCR, cloning, sequencing, structural and ultrastructural analysis were used. The results showed that there is an endophytic bacterial community, composed of members of α, β, γ-proteobacteria, actinobacteria and cyanobacteria, which colonizes the microplants. The converging results of PCR-DGGE and ARISA-PCR showed that this community changed in its structure and diversity according to its niche of colonization and the period of cultivation of the host plant, without renewal of culture medium. The action of antibiotics influenced the bacterial community structure, promoting differential impacts on each bacterial group evaluated. Antibiotictherapy did not promote the total elimination of endophytic bacteria. However, the treatments caused changes in bacterial community, resulting in reduced growth of roots and other histological changes in the root system of the microplants. The ultrastructural analysis confirmed the presence of endophytic bacteria colonizing the intracellularly the leaf mesophyll and the cortex of roots, even after antibiotictherapy. Thus, it is concluded that in asymptomatic pineapple microplants there is an intracellular endophytic bacterial community, breaking the main paradigm of plant tissue culture, in which axenic microplants are mandatory.

Keywords: Bacteria; Endophytes; *Ananas*; Micropropagation; Antibiotics; Axenic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modo de ação da maioria dos antibióticos em bactérias. THF: tetraidrofolato; DHF: dihidrofolato; PABA: ácido para-amino-benzóico. (Adaptado de MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1996).....34

Figura 2 – Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho. Linhas contínuas = objetivos ou métodos de análises dos resultados. Linhas pontilhadas = procedimentos intermediários 47

Figura 3 – Microplantas de abacaxizeiros cv. IAC Gomo-de-mel com um mês (a), três meses (b) e sete meses (c) de cultivo 48

Figura 4 – Placas de Petri para isolamento de bactérias endofíticas de microplantas assintomáticas de abacaxizeiros. Fragmentos de sistema radicular em meio LB (a) e fragmentos de parte aérea em meio TSB (b) incubados em estufa bacteriológica...50

Figura 5 – Microplanta de abacaxizeiro (a) e desenho esquemático dos ápices caulinares e as folhas originadas a partir deles (b). Linhas vermelhas horizontais indicam o posicionamento dos nós 53

Figura 6 – Microplantas de abacaxizeiros com uma semana (S1) (a), quatro meses (M4) (b) e oito meses (M8) (c) de cultivo 57

Figura 7 – Diagrama explicativo com os principais resultados obtidos e temas abordados na discussão deste trabalho 65

Figura 8 – Fragmentos de raízes provenientes de microplantas assintomáticas de abacaxizeiros, inoculados em meio de cultura LB, no primeiro dia de incubação (a) e encobertos por colônias bacterianas após duas semanas de incubação (b). Detalhe das colônias (c) 66

Figura 9 – Resultado da amplificação do gene 16S rRNA a partir do DNA total de amostras de raízes, folhas jovens e adultas provenientes de microplantas assintomáticas de abacaxizeiros. Perfil eletroforético em gel de agarose. LM – *Low Mass DNA Ladder*; CN – controle negativo; CP – controle positivo.....67

Figura 10 - Agrupamento hierárquico dos perfis de DGGE da comunidade bacteriana total (a), actinobactérias (c), α-proteobactérias (e) e β-proteobactérias (g) realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson. Os valores nos ramos indicam a correlação cofenética do agrupamento das amostras. Os diagramas de Venn (b, d, f e h) mostram a riqueza de bandas detectadas pelos perfis de DGGE de amostras de raízes, folhas jovens e folhas adultas de microplantas de abacaxizeiro. As setas correspondem à identificação das bandas excisadas do gel 69

Figura 11 - Agrupamento hierárquico (a) da comunidade bacteriana total, realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson, análise dos componentes principais (b) e diagrama de Venn (c) baseados nos perfis de bandas de DGGE. Eletroferogramas das comunidades bacterianas (d), análise dos componentes principais (e) e diagrama de Venn (f) e baseados nas análises de ARISA em amostras de microplantas de abacaxizeiro com uma semana (S1), quatro meses (M4) e oito meses (M8) de cultivo. Os números de 1 a 12 indicam as replicatas..... 72

Figura 12 – Fotomicrografias de secções transversais de lâminas foliares de microplantas 10 dias após a antibioticoterapia. Sem corantes (branco) do tratamento I (a), Sem corantes (branco) do tratamento II (b), Lugol (cor preta: amido) no tratamento II (c), Lugol (cor preta: amido) no tratamento III (d), Sudan Black B (cor preta-azulada: lipídeos totais) no tratamento I (e), Sudan Black B (cor preta-azulada: lipídeos totais) no tratamento IV (f), Cloreto férrico no tratamento I (g) e Cloreto férrico no tratamento IV (h). EP = epiderme; Hip = hipodermeFV = feixe vascular; Mes = mesofilo; Clp = cloroplastos; A = amido 77

Figura 13 – Fotomicrografias de secções transversais de raízes de microplantas de abacaxizeiro coradas com azul de astra e fucsina, 30 dias após a antibioticoterapia. Tratamento I (a, b, c), II (d, e, f), III (g, h, i), IV (j, k, l), V (m, n, o). Aer = aerênquima; CC = cilindro central; En = endoderme; Ep = epiderme; Esc = esclerênquima; Pe = periciclo; Pl = pêlo radicular; Pr = parênquima 79

Figura 14 – Aspecto geral do sistema radicular de microplantas de abacaxizeiro 30 dias após antibioticoterapia (tratamentos I, II, III, IV e V). A área retangular destaca a diferença morfológica entre as raízes de microplantas do tratamento V quando comparadas ao tratamento I.....80

Figura 15 - Análise dos componentes principais (PCA) baseada nos perfis de bandas de DGGE de actinobactérias, cianobactérias, α-proteobactérias, β-proteobactérias e γ-proteobactérias das amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. Os números de 1 a 9 indicam as replicatas.....81

Figura 16 - Análise dos componentes principais (PCA) (a, c) e agrupamento hierárquico (b, d) dos perfis de DGGE de actinobactérias (Act) e cianobactérias (Cya), realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson. Os valores nos ramos indicam a correlação cofenética do agrupamento das amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. Os números de 1 a 9 indicam as replicatas 82

Figura 17 - Análise dos componentes principais (PCA) (a, c, e) e agrupamento hierárquico (b, d, f) dos perfis de DGGE de α-proteobactérias (Alfa), β-proteobactérias (Beta) e γ-proteobactérias (Gama), realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson. Os valores nos ramos indicam a correlação cofenética do agrupamento das amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. Os números de 1 a 9 indicam as replicatas.....83

Figura 18 - Agrupamento hierárquico dos perfis de DGGE da comunidade bacteriana total, realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson. Os valores nos ramos indicam a correlação cofenética do agrupamento das amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. As setas correspondem à identificação das bandas excisadas do gel 84

Figura 19 - Agrupamento filogenético mostrando a relação entre alguns isolados bacterianos e bandas excisadas de DGGE de amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. O alinhamento das seqüências e a filogenia foram realizados com base na seqüência parcial obtida das bandas, as quais foram

comparadas com seqüências do *Ribossomal Database Project II* (RDP II). A escala apresentada indica a divergência entre as seqüências 85

Figura 20 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura de secções transversais de lâminas foliares e de raízes de microplantas de abacaxizeiro consideradas axênicas. Bactérias (setas vermelhas) colonizando internamente células do mesofilo foliar (a) e células da bainha do feixe vascular do mesofilo (b); com destaque para o aglomerado de bactérias em células do mesofilo (c); célula adjacente ao cilindro vascular de raiz (d); destaque de bactérias em células do córtex de raiz (e) e (f). Seta preta evidencia a formação de biofilme intracelularmente 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - *Primers* utilizados nas reações de PCR-DGGE, programas no termociclador e variações no preparo das reações 56

Tabela 2 - *Primers* utilizados nas reações de PCR-ARISA, programas no termociclador e reações 58

Tabela 3 – Análise de variância (ANOVA) para os efeitos da antibioticoterapia e período de cultivo na morfogênese vegetal *in vitro* avaliada através das medidas de comprimento da maior raiz, número de folhas e comprimento da maior lâmina foliar de microplantas de abacaxizeiro. 74

Tabela 4 - Efeito da antibioticoterapia na morfogênese vegetal *in vitro* avaliada através das medidas de comprimento da maior raiz, número de folhas e comprimento da maior lâmina foliar de microplantas de abacaxizeiro.....74

Tabela 5 – Análise para os efeitos da antibioticoterapia na morfogênese vegetal *in vitro* pelo método de Diferenças das Diferenças a partir das medidas de comprimento da maior raiz, número de folhas e comprimento da maior lâmina foliar de microplantas de abacaxizeiro. 75

Tabela 6 – Análise de regressão para os efeitos da antibioticoterapia na morfogênese vegetal *in vitro* pelo método de Diferenças das Diferenças a partir das medidas de comprimento da maior raiz, número de folhas e comprimento da maior lâmina foliar de microplantas de abacaxizeiro. 75

1 INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de plantas, ou cultura de tecidos vegetais, abrange variadas técnicas de biotecnologia vegetal, dentre as quais destaca-se a micropropagação, que é uma excelente alternativa para a obtenção de mudas de inúmeras culturas, dentre elas a do abacaxizeiro (TEIXEIRA et al., 2001; FIROOZABADY; GUTTERSON, 2003). A cultura de tecidos vegetais é utilizada como base para o estabelecimento de propagação clonal rápida; na limpeza clonal via cultura de meristemas; como ferramenta para acelerar as técnicas de melhoramento genético, além de auxiliar estrategicamente estudos sobre a interação planta-microrganismo (DUVAL; CALDAS; RESENDE, 1998; FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998).

A interação entre plantas e bactérias tem sido bastante explorada tanto no aspecto da patogenicidade, quanto em relação ao mutualismo ou simbiose de bactérias endofíticas. As bactérias endofíticas são aquelas que habitam o interior de um vegetal em ao menos um período de seu ciclo de vida (CARROLL, 1986; PETRINI, 1991), colonizando os tecidos e ocupando os espaços intra e intercelulares, sendo encontradas em todos os órgãos, sem causar danos ao hospedeiro ou desenvolver estruturas externas visíveis (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO; ARAÚJO, 2003; HALLMANN et al., 1997; STROBEL, 2003). Em uma relação mutualística as bactérias endofíticas são capazes de interagir no metabolismo e fisiologia vegetal de maneira a favorecer o desenvolvimento da planta hospedeira, principalmente pela produção de reguladores de crescimento (RYAN et al., 2008; SCHULZ; BOYLE, 2005; TSAVKELOVA et al., 2006).

O controle das condições ambientais e nutricionais na micropropagação facilita a interpretação de possíveis alterações morfofisiológicas, nas microplantas, decorrentes da interação com bactérias endofíticas. Neste contexto, vários estudos investigaram os benefícios da inoculação artificial de bactérias endofíticas ou “biotização” em microplantas, demonstrando o potencial benéfico dessa interação (CANUTO et al., 2003; GOVINDARAJAN et al., 2006; SCHERLING et al., 2009; WEBER et al., 2003). Entretanto, diante do conceito chave de assepsia no ambiente *in vitr*o, são raros os estudos que abordam as bactérias endofíticas, na cultura de tecidos, como microrganismo verdadeiramente endofíticos e que podem trazer benefícios à planta.

As microplantas cultivadas sem a evidência de contaminação microbiana epifiticamente ou no meio de cultura, são consideradas axênicas. Ou seja, plantas livres de qualquer organismo vivo, seja esse externo ou endofítico. Sendo assim, a detecção de bactérias na micropropagação faz com que essas sejam automaticamente consideradas contaminantes prejudiciais e diferentes abordagens são prontamente utilizadas para a sua remoção ou eliminação (ODUTAYO et al., 2007; REED; TANPRASERT, 1995). Dentre as abordagens de descontaminação destaca-se o uso de antibioticoterapia, na qual as microplantas ou explantes são imersos em soluções de antibióticos, ou esses são adicionados ao meio de cultura (CASSELLS, 1991; LEIFERT; RITCHIE; WAITES, 1991). Além dos esperados efeitos bactericidas ou bacteriostáticos nas bactérias contaminantes, a antibioticoterapia traz riscos de fitotoxicidade e ainda o pouco mencionado, efeito sob a comunidade bacteriana endofítica natural, endógena da microplanta. Os possíveis danos às plantas são identificados por alterações morfológicas, mas em relação a comunidade bacteriana endofítica, pela sua característica críptica, pouco se conhece.

As técnicas tradicionais utilizadas para avaliar a comunidade endofítica de plantas são deficientes quanto aos microrganismos que não se adaptam facilmente às condições de culturabilidade normalmente testadas (ANDREOTE, 2007). Sendo assim, técnicas independentes de cultivo baseadas na análise do gene 16S rRNA para bactérias constituem excelentes alternativas para o estudo de estrutura e diversidade de comunidades bacterianas endofíticas, sem a necessidade de isolamento. A aplicação de técnicas de microscopia eletrônica de varredura, aliada às técnicas de PCR-DGGE e PCR-ARISA permitem uma complementação nos estudos dessas comunidades e a identificação e caracterização de bactérias endofíticas, superando às limitações devidas a baixa culturabilidade.

Neste contexto, carecem estudos que sejam capazes de consolidar uma abordagem interdisciplinar sobre a comunidade bacteriana endofítica em microplantas consideradas axênicas; trazendo informações que contribuam para o melhor entendimento dessa interação, focando na capacidade dessas bactérias em promover alterações positivas nas plantas, nos efeitos da antibioticoterapia em bactérias endofíticas e nas respostas desses efeitos na morfofisiologia vegetal.

Sendo assim, procurou-se investigar as seguintes hipóteses:

1) As microplantas de abacaxizeiros mesmo sendo consideradas axênicas, apresentam uma comunidade endofítica composta por bactérias fastidiosas ou não-cultiváveis, portanto técnicas independentes de cultivo devem ser necessariamente aplicadas para seu estudo;

2) Tendo em vista que as microplantas são mantidas sob condições assépticas, sem sinal de contaminação microbiana e que ainda assim persistem bactérias com colonização restrita aos tecidos internos e independente do período de cultivo da planta hospedeira, essa comunidade endofítica é pouco diversa, entretanto, dispersa de maneira diferenciada por todos os órgãos das microplantas, quebrando o paradigma da existência de plantas verdadeiramente axênicas na cultura de tecidos vegetais;

3) O uso de diferentes combinações de antibióticos, com mecanismos e espectros de ação distintos, adicionados ao meio de cultura das microplantas, resulta na alteração da estrutura e diversidade da comunidade bacteriana endofítica, que por sua vez é capaz de influenciar o desenvolvimento das plantas hospedeiras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comprovar a presença de bactérias endofíticas em microplantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. IAC Gomo-de-mel consideradas axênicas e investigar a possível influência dessas na morfofisiologia vegetal após antibioticoterapia.

2.2 Objetivos específicos

a) Por meio de técnicas dependentes e independentes de cultivo, avaliar a presença de bactérias endofíticas em microplantas assintomáticas, evidenciando que podem existir plantas descontaminadas, porém não axênicas, no cultivo *in vitro* que atendam as exigências fitossanitárias;

b) Verificar possíveis alterações na estrutura da comunidade bacteriana endofítica em diferentes órgãos de microplantas e em microplantas cultivadas sob diferentes períodos, usando os métodos de PCR-DGGE e PCR-ARISA;

c) Avaliar o efeito da antibioticoterapia na diversidade e estrutura da comunidade bacteriana endofítica em microplantas, por meio de PCR-DGGE e sequenciamento de bandas, e possíveis alterações morfofisiológicas em microplantas pela ação dos antibióticos nessas comunidades.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais, ou cultura *in vitro* de plantas pressupõe o cultivo de plantas ou partes de plantas (explantes) em meio de cultura apropriado e livre de contaminantes, sob condições de temperatura, umidade, fotoperíodo e irradiância controlados, em sala de crescimento, sob condições assépticas (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). A cultura *in vitro* engloba um conjunto de técnicas constituindo uma parte fundamental da biotecnologia vegetal. Suas aplicações têm-se mostrado de enorme importância prática na propagação de espécies de interesse comercial, também conhecida por micropropagação, funcionando como alternativa à propagação vegetativa tradicional (KERBAUY, 1997; MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994). Na micropropagação o objetivo é obter em larga escala e em um curto período de tempo, plantas livres de patógenos e idênticas à original, ou seja, realizar de maneira asséptica uma clonagem vegetal, a qual é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter novos indivíduos, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral comum (TORRES et al., 2000).

A cultura de tecidos vegetais é utilizada como base para o estabelecimento de propagação clonal rápida; na limpeza clonal via cultura de meristemas; na hibridação somática por meio da fusão de protoplastos; na conservação de recursos genéticos *in vitro*, estabelecendo-se os bancos de germoplasma; na síntese de metabólicos secundários a partir de suspensões celulares; na produção de sementes sintéticas, dentre outras aplicações (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). De maneira geral a cultura *in vitro* tem sido considerada uma ferramenta quase indispensável para acelerar as técnicas de melhoramento genético convencional, além de auxiliar estrategicamente estudos sobre a interação planta-microrganismo (DUVAL; CALDAS; RESENDE, 1998; FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998). Entretanto, para o sucesso do cultivo *in vitro* é preciso ter conhecimento da biologia vegetal no que se concerne aos aspectos anatômicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos. E ao mesmo tempo, por outro lado, podem-se aprofundar os conhecimentos sobre esses mesmos aspectos, a partir do seu estudo em microplantas. Isso porque, as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células *in vitro*, sendo que alguns processos, podem ser inativados e

controlados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

Para compreensão dos fenômenos que ocorrem nas diversas técnicas de cultivo *in vitro*, é preciso o esclarecimento sobre dois conceitos centrais: totipotência e morfogênese. As plantas, devido a sua natureza séssil e à necessidade de superar extremas condições ambientais e de predação, desenvolveram uma grande habilidade de adaptação em seus processos de crescimento e desenvolvimento. Essa plasticidade permite que as plantas alterem seu metabolismo moldando-o de maneira mais adequada ao ambiente. No que se refere aos processos de regeneração *in vitro*, esse potencial adaptativo se reflete na capacidade de iniciar a divisão celular a partir de praticamente qualquer tecido da planta e regenerar órgãos perdidos ou subtraídos, respondendo metabolicamente diferente a cada estímulo (SLATER; SCOTT; FOWLER, 2003). Por sua vez, as vias de regeneração são fundamentadas na capacidade das células vegetais em proliferarem e organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas (KERBAUY, 1997; MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994). Essa capacidade é denominada totipotência e considera que as células vegetais manifestam, em momentos diferentes e sob estímulo apropriado, a potencialidade de iniciar novo indivíduo multicelular (TORRES et al., 2000).

A morfogênese vegetal é a integração entre os processos de crescimento (mudanças quantitativas) e diferenciação (alterações qualitativas), mediada por divisão e especialização celular, conduzindo a uma estrutura organizada e característica (HANDRO; FLOH, 1990). A morfogênese é o resultado de um complexo controle hormonal múltiplo, espacial e temporal, através da regulação e expressão de sistemas gênicos múltiplos. Na planta intacta é mediada pela ação correlativa dos meristemas e de seus produtos. Na cultura de tecidos vegetais, ao se romper as correlações endógenas os tecidos ficam sujeitos às condições exógenas, representadas no caso pelos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura (GUERRA; NODARI, 2006), ou ainda por aqueles produzidos pela ação de bactérias endofíticas. A cultura de tecidos vegetais permite a realização de diversos estudos sobre alterações morfofisiológicas das plantas (HAZARIKA, 2006) fazendo com que seja possível uma melhor compreensão desses fenômenos.

3.2 Bactérias endofíticas

Uma extensa variedade de definições já foi utilizada para o termo endófito e considerações sobre cada definição podem levar a diferentes interpretações. Nesta tese será considerado que microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de um vegetal em ao menos um período de seu ciclo de vida (CARROLL, 1986; PETRINI, 1991), e que podem ser isolados de um tecido vegetal desinfestado superficialmente ou extraídos de partes internas de tecidos vegetais (HALLMANN et al., 1997). São aqueles microrganismos que colonizam os tecidos internos de plantas (STROBEL, 2003), ocupando os espaços intra e intercelulares, sendo encontrados, de modo geral, em todos os órgãos, sem causar danos ao hospedeiro ou desenvolver estruturas externas visíveis (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO; ARAÚJO, 2003; HALLMANN et al., 1997). Distinguem-se dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais (AZEVEDO, 1998). Entretanto, ainda assim, a distinção entre microrganismos endofíticos, epifíticos e patogênicos é difícil, pois um microrganismo endofítico pode tornar-se um patógeno conforme as condições de ambiente; e um microrganismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por um determinado período, causando ou não danos à mesma (AZEVEDO, 1998). Alguns autores consideram que na maioria dos casos as relações entre os endofíticos e as plantas hospedeiras são simbióticas e provavelmente, mutualísticas (GUO et al., 2008).

O modo de dispersão das bactérias pode ser via sementes, propagação vegetativa, vento, implementos agrícolas ou insetos (BALDANI, 1997). Em geral, as bactérias endofíticas penetram no tecido da planta, primariamente, através da zona radicular, pelo fato das raízes apresentarem ferimentos durante a emergência de raízes secundárias laterais (JACOBS; BUGBEE; GABRIELSON, 1985). Entretanto, aberturas naturais como estômatos, hidatódios, lenticelas, ferimentos causados por insetos ou demais injúrias mecânicas também constituem outra possibilidade de entrada (HUANG, 1986; QUADT-HALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997; KOBAYASHI; PALUMBO, 2000). Ocorre também a entrada de forma ativa por meio da degradação enzimática da parede celular da planta pela liberação bacteriana de enzimas hidrolíticas como celulases e pectinases (HALLMANN, et al., 1997). Uma vez dentro da planta os endófitos podem permanecer próximos ao local de entrada ou disseminarem-se de forma sistêmica dentro das células, nos espaços intercelulares ou no sistema vascular (HALLMANN et

al. 1997; ZINNIEL et al., 2002). Em geral, tem-se que as bactérias endofíticas colonizam os espaços intercelulares (REINHOLD; HUREK, 1988). Entretanto, com o passar do tempo, novos estudos têm demonstrado a colonização intracelular em arroz (SENTHILKUMAR et al., 2009; YOU; ZHOU, 1989), batata (FROMMEL et al., 1991), trigo (GANTAR et al., 1991), gramíneas (HUREK et al., 1994), cana-de-açúcar (JAMES; OLIVARES, 1998), algodão (QUADT-HALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997), pinus (PIRTILLÄ et al., 2000), pupunheira (ALMEIDA et al., 2009). Então, atualmente pode-se dizer que a colonização endofítica pode ser intracelular e limitada ao interior de algumas células, intercelular localizada e intra e intercelular, ao mesmo tempo, de maneira sistêmica (STONE et al.; 2000).

Vários fatores podem afetar a colonização e promover flutuações populacionais de bactérias endofíticas; desde a densidade de inóculo, condições ambientais, locais de origem e genótipo da planta hospedeira (ARAÚJO et al., 2002; PILLAY; NOWAK, 1997; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Diversos estudos já mostraram que existem diferenças nas populações naturais de bactérias endofíticas encontradas entre as espécies vegetais e entre partes da planta dentro de cada espécie (ADAMS; KLOEPPER, 2002; HALLMANN et al., 1997; McINROY; KLOEPPER, 1995). Adams e Kloepper (2002) relataram efeitos genéticos e morfofisiológicos que contribuíram para diferenças significativas na colonização de bactérias endofíticas entre cultivares de arroz. Andreote et al. (2008) também notaram alterações na comunidade endofítica composta por α, β-proteobctérias e actinobactérias durante o desenvolvimento inicial de plantas de tabaco. A constatação de bactérias endofíticas em tecidos de plantas saudáveis também tem sido relatada frequentemente para muitas espécies cultivadas, e em diferentes estágios de crescimento (BACON; HINTON, 2006; McINROY; KLOEPPER, 1995; MISAGHI; DONNDELINGER, 1990; PALUS et al., 1996; STURZ, 1995), sendo que os grupos mais comumente relatados incluem as α, β, γ-proteobactérias, firmicutes e actinobactérias, destacando-se os gêneros *Azospirillum, Gluconacetobacter, Methylobacterium, Herbaspirillum, Burkholderia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Pantoea, Pseudomonas, Serratia, Stenotrophomonas, Bacillus, Paenibacillus, Arthrobacter, Curtobacterium, Microbacterium, Streptomyces* (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

3.3 Bactérias endofíticas no desenvolvimento vegetal

As bactérias endofíticas estão protegidas pela planta hospedeira dos estresses ambientais e da competição microbiana, e parecem ser onipresentes nos tecidos vegetais, tendo sido isoladas de flores, frutos, folhas, caules, raízes, e sementes de várias espécies vegetais (McINROY; KLOEPPER, 1995; KOBAYASHI; PALUMBO, 2000). As bactérias endofíticas podem formar diferentes associações com a planta hospedeira, incluindo simbiose, mutualismo, comensalismo e trofobiose (RYAN et al., 2008); recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira e produzem compostos químicos como enzimas, alcalóides e antibióticos, entre outros, que em certas condições de estresse, causadas por restrição hídrica ou presença de patógenos passam a ser produzidos em maior intensidade beneficiando a planta hospedeira (SCHULZ; BOYLE, 2005; SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000). As comunidades bacterianas endofíticas, em associação com diferentes tecidos vegetais, podem atuar em processos essenciais para o desenvolvimento vegetal, como por exemplo, no auxílio para a obtenção de nutrientes (fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico) (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; RODRIGUES; FRAGA, 1999; TEIXEIRA et al., 2007), promovendo o crescimento vegetal por meio de produção de fitormônios (STURZ et al., 1997; WELBAUM et al., 2004), ou até mesmo atuando contra patógenos, seja por antibiose direta (BROADBENT et al., 1971; STURZ et al., 1999) ou pela indução de resistência sistêmica vegetal (MEGURO et al., 2004), aumentando a tolerância a seca (NOWAK; ASIEDU; LAZAROVITS, 1995; SILVA et al., 2009) e até à restrição nutricional (CHANWAY, 1998).

Para alguns pesquisadores o papel mais importante das bactérias endofíticas sobre a fisiologia da planta hospedeira é que essas podem desempenhar relevante função para a sanidade vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, além de promover resistência ao estresse, elicitar resistência a insetos, nematóides e até proteger a planta contra herbívoros (CARROLL, 1988; HALLMANN; SIKORA, 1996; AZEVEDO et al., 2000; STURZ; NOWAK, 2000). Outros estudos também têm focado no uso de bactérias endofíticas como agentes de controle biológico de pragas e doenças (BACKMAN; SIKORA, 2008; BACON; HINTON, 2002; COMPANT et al., 2005b); como bioherbicidas e na biorremediação de solos contaminados com poluentes (AZEVEDO, 1998; SAMANTA et al., 2002; MOORE et al., 2006; NAKATANI et al., 2008). Mas, o enfoque mais estudado na interação entre bactérias endofíticas

e plantas é a promoção do crescimento vegetal que se dá principalmente pela produção de fitormônios como as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (TSAVKELOVA et al., 2006). A produção desses fitormônios já foi relatada em bactérias como *Acetobacter, Alcaligenes, Azospirillum, Bacillus, Enterobacter, Erwinia, Gluconoacetobacter, Herbaspirillum, Pantoea e Pseudomonas, Stenotrophomonas* (BOTTINI; CASSÁN; PICCOLI, 2004; CERIGIOLI, 2005; HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; PATTEN; GLICK, 2002; ZAKRAHOVA, 1999). Com destaque para a produção do ácido indol acético (AIA), que é a principal auxina de ocorrência natural nos vegetais superiores, mas também é sintetizada por bactérias endofíticas resultando em efeitos fisiológicos na planta, pela promoção do crescimento de caules e coleóptilos, desenvolvimento de frutos, indução a diferenciação vascular, e principalmente, na formação de raízes laterais e adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2004), contribuindo para o aumento da capacidade de obtenção de água e nutrientes, aumentando as chances de melhor desenvolvimento e sobrevivência das plantas.

3.4 Bactérias endofíticas na micropropagação

Na avaliação do comportamento de microrganismos endofíticos, Serafini et al. (2002) destacam a importância da técnica de cultura *in vitro*, no estudo da relação entre esses microrganismos e a planta micropropagada. O estudo dessa interação, diante do controle das condições ambientais e do conhecimento exato da composição do meio de cultura é extremamente facilitado (ALMEIDA et al., 2005). Almeida et al. (2009) revelaram a presença de bactérias endofíticas colonizando internamente os tecidos de microplantas de pupunheira, e técnicas de PCR-DGGE e sequenciamento permitiram a identificação de três diferentes filogrupos, revelando alta similaridade com *Moraxella* sp., *Brevibacillus* sp. (γ-proteobactérias) e cianobactéria não-cultivável. Também com o auxílio de técnicas dependentes e independentes de cultivo, na cultura de tecidos de falsa-acácia foram identificadas bactérias dos gêneros *Acidovorax, Dyella, Microbacterium* e *Sphingomonas* (BOINE; NAUJOKS; STAUBER, 2008); de menta, *Agrobacterium, Xanthomonas, Pseudomonas* e *Micrococcus* (BUCKLEY; DeWILDE; REED, 1995), de morangueiro, *Bacillus* e *Sphingopyxis* (DIAS et al., 2009); de damasqueiro, *Bacillus, Sphingomonas* e *Micrococcus* (MARINO; ALTAN; BIAVATI, 1996); de pessegueiro, *Sphingomonas* e *Bacillus* (MARINO et al., 2009); de ginseng siberiano no qual foram

identificadas várias bactérias cultiváveis e não-cultiváveis pertencentes aos grupos das firmicutes e γ-proteobactérias (MÜLLER; DORING, 2009); de crisântemo, *Curtobacterium* (PANICKER et al., 2007); de pinus, *Methylobacterium* e *Pseudomonas* (PIRTILLÄ et al., 2000); de bananeira, *Bacillus, Brevibacillus, Paenibacillus, Virgibacillus, Staphylococcus, Cellulomonas, Micrococcus, Corynebacterium, Kocuria, Paracoccus, Pseudomonas* e *Acinetobacter* (THOMAS; SOLY, 2009); de meloeiro, *Bacillus, Pseudomonas* e *Aeromonas* (THOMAS, 2004a); de videira, *Bacillus* (THOMAS, 2004b); de mamoeiro, *Pantoea, Enterobacter, Brevundimona, Sphingomonas, Methylobacterium, Agrobacterium, Microbacterium* e *Bacillus* (THOMAS et al., 2007); dentre outras.

Tendo em vista toda a diversidade de bactérias endofíticas isoladas de microplantas ou plantas do ambiente *ex vitro*, vários estudos já propuseram-se a investigar benefícios da inoculação artificial dessas bactérias ou "biotização" acreditando no potencial de indução de alterações no metabolismo e desenvolvimento vegetal. E as principais respostas desses estudos foram a promoção de crescimento *in vitro* e a indução de resistência às microplantas (NOWAK, 1998). Neste sentido, diante da inoculação artificial de bactérias endofíticas em microplantas de cana-de-açúcar, Canuto et al. (2003) verificaram que bactérias do gênero *Gluconacetobacter, Herbaspirillum, Azospirillum* e *Burkholderia* promoveram maior acúmulo de massa seca total das plantas, e Govindarajan et al. (2006) com inoculação de *Burkholderia vietnamiensis* também verificaram aumento de biomassa quando as microplantas foram levadas ao campo. Ainda em microplantas de cana-de-açúcar, Mirza et al. (2001) relataram um incremento no peso de raízes e parte aérea após a inoculação com bactérias dos gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella*, previamente isolados de planta cultivados no ambiente *ex vitro*. Em microplantas de louro-americano foi realizada a inoculação com *Streptomyces*, a qual resultou na promoção de resistência à mancha causada pelo fungo *Pestalotiopsis sydowiana*. Enquanto que Dias et al. (2009) verificaram que bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Sphingopyxis* isolados da própria cultura de meristemas de morangueiro eram capazes de produzir AIA e solubilizar fosfato. Scherling et al. (2009) após a inoculação de isolados de *Paenibacillus* sp. em microplantas de álamo **v**erificaram alteração nos padrões de fixação de nitrogênio, sugerindo uma interação mutualística entre a bactéria e a microplanta. Em relação ao metabolismo de nitrogênio, calos de arroz inoculados com *Azorhizobium caulinodans* mostraram aumentos significativos no conteúdo de proteínas totais, nitrogênio e atividade da nitrogenase (SENTHILKUMAR et al., 2008). Especialmente em

abacaxizeiros, a inoculação de *Asaia bogorensis e Burkholderia cepacia* resultou na promoção do crescimento das microplantas (WEBER et al., 2003a).

Mesmo diante de respostas tão contundentes em relação aos benefícios da interação microplanta-bactéria, e apesar de muitos estudos relatarem a presença constante de bactérias endofíticas no cultivo *in vitro*, na maioria das vezes as relaciona como patógenos latentes, inativos ou emergentes (ODUTAYO et al., 2007; REED; TANPRASERT, 1995). Portanto, qualquer vislumbre da presença de bactérias endofíticas é prontamente abordado como contaminação microbiológica, que deve ser prevenida, reduzida ou eliminada o quanto antes. Uma vez que um dos principais objetivos da técnica de micropropagação é, justamente obter plantas assépticas, os microrganismos passaram a ser sinônimos de contaminação prejudicial (LEIFERT; WAITES; NICHOLAS, 1989; LEIFERT; CAMOTTA; WAITES, 1992; REED; TANPRASERT, 1995). A associação natural de bactérias endofíticas e microplantas pode ser mais freqüente do que se é relatado, e pode estar relacionada à características morfofisiológicas e outros fatores do metabolismo vegetal realçados *in vitro*, mas faltam estudos para avaliar de maneira profunda essa associação, pois quase sempre que esta é notada sem que haja uma inoculação intencional, acaba sendo aniquilada ou, ao menos, alterada pelo uso de antibioticoterapia.

3.5 O efeito de antibióticos sobre bactérias

Os antibióticos na sua definição clássica são substâncias produzidas por microrganismos que inibem ou matam outros microrganismos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1996). O termo antibiótico tem sido utilizado de modo mais restrito para indicar substâncias que atingem bactérias, embora possa ser utilizado em sentido mais amplo. São tidos como agentes quimioterápicos “seletivamente” tóxicos para bactéria matando-as (bactericida) ou inibindo seu crescimento (bacteriostático). Por definição, esses compostos devem atuar em estruturas encontradas em bactérias, mas não no hospedeiro, sendo que sua concentração inibitória mínima (CIM) refere-se à menor concentração de um antibiótico que pára o crescimento visível de uma bactéria (FOX, 2006). A literatura registra milhares de antibióticos, dos quais muitos são de origem microbiana. Contudo, apenas algumas dezenas encontram emprego na medicina. Embora os antibióticos, em sua maioria, sejam produzidos por microrganismos, alguns resultam de

modificação química de antibióticos conhecidos ou de metabólitos microbianos: por exemplo, penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas, tetraciclinas e rifamicinas modificadas, clindamicina e troleandomicina são apenas alguns. Há também antibióticos obtidos inteiramente por síntese, como é o caso de cloranfenicol (HARAGUCHI, 2000). Independente do seu modo de síntese, para a maioria dos antibióticos já existem relatos de resistência bacteriana. Mecanismos de resistência à antibióticos podem ser divididos de maneira generalista em duas grandes classes: (a) aqueles que alteram algum componente celular fazendo com que o antibiótico não consiga atingir ou não interaja normalmente com seu sítio alvo e (b) aqueles que levam a modificações químicas e subsequentemente, á inativação do antibiótico. A geração desses dois tipos de resistência em bactérias é controlada por fatores ambientais. Resistência do tipo *a* que tem origem numa alteração mutacional de um componente celular são mais comuns em experimentos laboratoriais, enquanto que em casos clínicos são mais raras. Já, as resistências do tipo *b* geralmente são encontradas apenas em casos clínicos, estando normalmente associadas a um elemento extracromossômico ou plasmidial (BENVENISTE; DAVIES, 1973).

Os antibióticos são geralmente agrupados de acordo com sua origem, biossíntese, espectro de ação, estrutura química ou mecanismo de ação (Figura 1). Sendo que em bactérias, os mais importantes alvos da ação de antibióticos são: parede celular, membrana citoplasmática, e os processos de biossíntese de proteínas e ácidos nucléicos (DE GAUDIO, 2006; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1996). Entretanto, nenhuma delas é plenamente satisfatória, e por razões didáticas os antibióticos de interesse clínico podem ser classificados nas seguintes classes: penicilinas; cefalosporinas; monobactamas; anfenicóis; tetraciclinas; polipeptídios; poliênicos; macrolídios; aminoglicosídeos; ansamicinas; antraciclinas; lincomicinas; nucleosídios; glutarimidas; poliéter ionóforos e outros (HARAGUCHI, 2000). Nesta tese terão destaque os grupos de penicilinas, tetraciclinas, aminoglicosídeos e quinolonas.

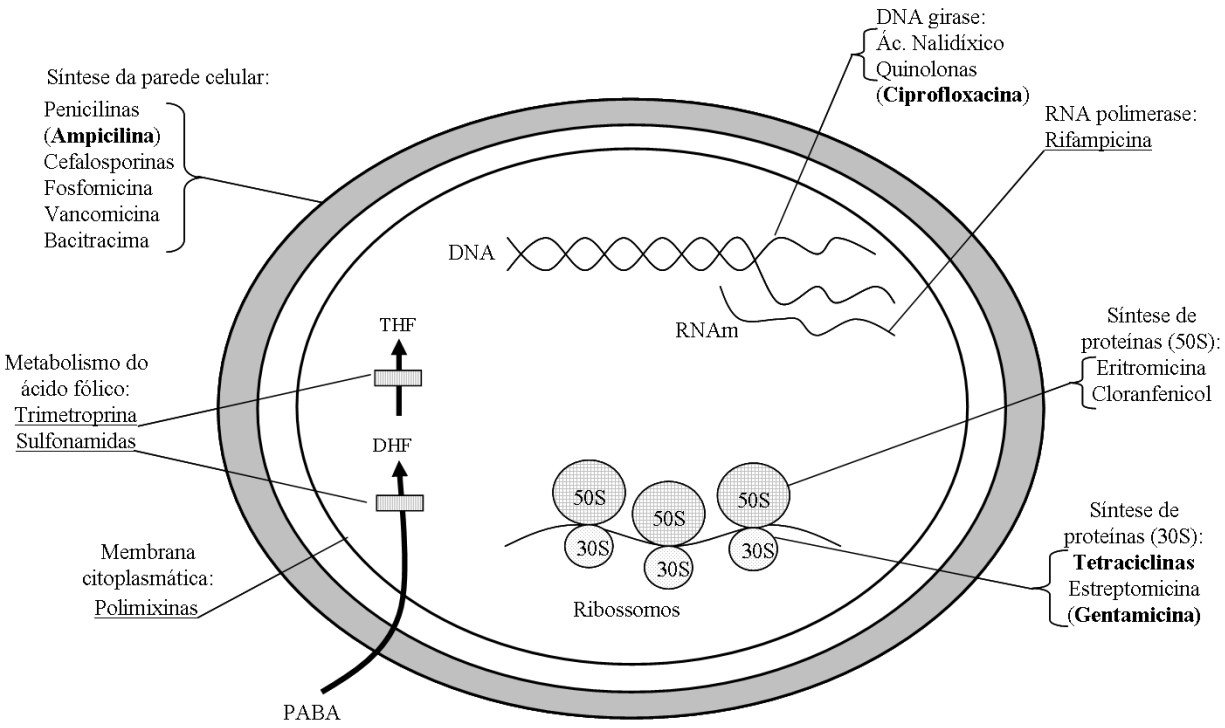

Figura 1 – Modo de ação da maioria dos antibióticos em bactérias. THF: tetraidrofolato; DHF: dihidrofolato; PABA: ácido para-amino-benzóico. (Adaptado de MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1996)

As penicilinas constituem um dos grupos mais importantes de antibióticos, originalmente produzidos pelo fungo do gênero *Penicillium*, mas hoje em dia já existe um grande número de derivados naturais e semi-sintéticos. Todas as penicilinas têm a mesma estrutura básica: ácido 6-aminopenicilânico, que tem um anel tiazolidinico e um anel β-lactâmico fusionado. O núcleo das penicilinas é o principal requisito estrutural para sua atividade biológica. Todos os antibióticos β-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) interferem na parede celular bacteriana. O anel β-lactâmico interage com proteínas denominadas PBPs (*penicillin binding protein*), inibindo a enzima envolvida na transpeptidação, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptidoglicano, polissacarídeo da parede celular bacteriana (LACAZ, 1975). Com isso, há o impedimento da formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes de peptidoglicano, ocasionando uma perda na rigidez da parede celular (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1996). Como o meio interior à parede é hiperosmótico, sem uma parede rígida ocorre afluxo de água do exterior acarretando a lise bacteriana. Outro mecanismo de ação das penicilinas

é a ativação de enzimas autolíticas na parede celular, tendo com resultado também a lise celular bacteriana (FOX, 2006). Muitas penicilinas exibem pouca atividade contra bactérias Gram-negativas, uma vez que não penetram a membrana externa. Entretanto, outras penicilinas, como as cefalosporinas, cefotaxima e ampicilina são ativas também contra bactérias Gram-negativas e apresentam maior estabilidade à hidrólise por β-lactamases, que representam o principal mecanismo de resistência de bactérias às penicilinas uma vez que são enzima que clivam o anel β-lactâmico, inativando o antibiótico (LACAZ, 1975).

A tetraciclina, o protótipo desta família de antibióticos, foi obtida por hidrólise da 7-clortetraciclina. Posteriormente surgiram novas tetraciclinas e todas se caracterizam por apresentar o esqueleto do octaidronaftaceno, sistema formado por quatro anéis condensados, e pelo seu amplo espectro de ação, e eficaz contra muitas espécies de bactérias, tanto Gram-negativas quanto positivas, e até contra alguns protozoários. As tetraciclinas são bacteriostáticos que atuam por inibição da síntese de proteínas. Ligam-se à subunidade ribossomal 30S (sítio A), bloqueando a união de tRNA (RNA de transferência) ao complexo ribossômico de mRNA (RNA mensageiro) (LACAZ, 1975). Essa ligação reversível ocorre nos microrganismos sensíveis, ocasionando a inibição da síntese de proteínas. Há algumas estirpes resistentes por um de dois mecanismos, que adquirem através de genes em plasmídeos de outras bactérias. Um desses genes codifica uma proteína que ativamente expulsa a tetraciclina da célula. O outro codifica uma proteína que se liga ao ribossomo não permitindo a ação das tetraciclinas (STANFORD, 1995).

Aminoglicosídeos compõe um grupo de fármacos compostos por um grupo amino e um grupo glicosídeo. Os antibióticos dessa classe são bactericidas, inibidores de síntese protéica das bactérias sensíveis, maioria das bactérias aeróbias Gram-negativas e algumas Gram-positivas. Os aminoglicosídeos (canamicina, gentamicina, estreptomicina, neomicina), de maneira similar ao que ocorre na ação de tetraciclinas, inibem a síntese de proteínas nas bactérias, ao ligarem-se à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a leitura correta do RNA mensageiro e, consequentemente, síntese da proteína correspondente. Essa ação é irreversível, impedindo a iniciação da síntese protéica e ainda reduzem a síntese já iniciada (FOX, 2006). A resistência de algumas estirpes é devida à existência de enzimas que inativam o antibiótico. Existem mais de nove tipos de enzimas não relacionadas, que acetilam, fosforilam ou adelinam os aminoglicosídeos. Os genes que codificam essas enzimas são espalhados de bactérias resistentes para bactérias ainda susceptíveis através da recombinação sexual bacteriana, com troca de

plasmídeos ou *transposons* de DNA. Pode haver sinergismo entre aminoglicosídeos e β-lactâmicos, uma vez que esses últimos inibem a síntese de parede celular, aumentando a permeabilidade das bactérias e facilitando a entrada dos aminoglicosídeos (LACAZ, 1975).

As quinolonas e fluoroquinolonas são grupos relacionados de antibióticos, derivados do ácido nalidíxico, efetivos contra bactérias Gram-negativas e positivas. As quinolonas, antibióticos bactericidas, agem sobre a subunidade A da enzima bacteriana DNA-girase (DNA topoisomerase II), importante na desnovelação do DNA na divisão celular da bactéria. As quinolonas 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; produção de exonucleases; degradação cromossomial, por fim prejudicando a duplicação do DNA, fazendo com que a bactéria cesse sua multiplicação (FOX, 2006). A ciprofloxacina, que é uma fluoroquinolona sintética com amplo espectro, ficou conhecida internacionalmente devido às encomendas realizadas pelo governo dos EUA após o surto de terrorismo biológico em 2001 e 2002, em que antrax de alta virulência foi enviado em pó dentro de correspondência endereçada a políticos e figuras públicas (SOUZA et al., 2004). Há resistência às quinolonas de alguns Gram-positivos, nomeadamente *Streptococcus*, além de estirpes resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ESPINOLA et al., 1994).

3.6 O uso de antibióticos nas plantas

Devido a grande importância de uso de antibióticos no combate de doenças no homem, juntamente com fatores econômicos relacionados à indústria farmacêutica, pesquisadores foram dissuadidos a explorarem de uso desses agentes contra doenças de plantas (ANDERSON; GOTTLIEB, 1952). Desde a década de 50 até hoje existem tentativas de aproveitar todo potencial bactericida ou bacteristático dos antibióticos, mesmo que em ações localizadas, para tentar minimizar prejuízos causados pela fitopatogenicidade de algumas bactérias em culturas de importância agronômica (DEKKER, 1963).

Uma vez que prevenir ou evitar a contaminação microbiana na micropropagação é tido como ponto crítico para o sucesso da técnica (REED; TANPRASERT, 1995), e tendo em vista que a detecção de bactérias endofíticas é difícil, pois permanecem “encobertas” internamente nos

tecidos vegetais, o uso de antibioticoterapia tornou-se muito popular como alternativa de eliminação de “contaminantes” do ambiente *in vitro* (CASSELLS, 1991; LEIFERT; RITCHIE; WAITES, 1991; LEIFERT; WAITES; NICHOLAS, 1989; LEIFERT; CAMOTTA; WAITES, 1992). Os antibióticos considerados ideais para esta finalidade são os solúveis em água, estáveis, não afetados pelo meio de cultura e pelo pH, que não ocasionam efeitos colaterais, de amplo espectro, bactericidas, passíveis de combinação, não indutores de resistência e que não apresentam toxidade ao homem (FALKINER, 1988; 1990). A combinação de antibióticos é sugerida para promoção de efeitos sinergéticos, mas para tanto são necessários estudos prévios para evitar o antagonismo, além disso, dependendo da concentração utilizada, a combinação de antibióticos pode levar à fitotoxicidade, e por outro lado, o uso individualizado de antibióticos repetidas vezes ainda pode induzir mais facilmente à mecanismos de resistência (BUCKLEY; DeWILDE; REED, 1995; LEIFERT; CAMOTTA; WAITES,1992; REED; TANPRASERT, 1995).

A fitotoxicidade causada pelo uso de antibióticos em plantas pode resultar, dentre outros efeitos, na inibição do potencial germinativo e redução no crescimento da plântula, inibição da produção de pigmentos resultando em clorose (BRIAN, 1957), promoção de mortes de frutos e vegetação de modo geral (CID; ZIMMERMANN, 2006). Visando evitar esses efeitos negativos do uso da antibioticoterapia na cultura de tecidos vegetais, Tanprasert e Reed (1997) testaram “concentrações bactericidas mínimas” para servirem como recomendação, tendo como base a cultura do morangueiro e tiveram sucesso na eliminação, ao menos visual de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas corrugata* diante do uso combinado de gentamicina, estreptomicina e timetina na concentração de 50 $mg.L^{-1}$. Ainda assim, relatos de fitotoxicidade no cultivo *in vitro* são comuns. Biasi (1995) testando o efeito do ácido nalidíxico, do cloranfenicol e da estreptomicina sobre a cultura *in vitro* do abacateiro 'Ouro Verde' constatou que a formação de calos foi reduzida à metade e restringiu-se o comprimento das brotações, fazendo com que a recomendação do uso desses antibióticos fosse restrita em casos de extrema necessidade, dependendo da suscetibilidade do microrganismo contaminante e da concentração necessária para seu controle. Na cultura de calos de cenoura, o uso de antibióticos (carbecilina, vancomicina) reduziu a taxa de crescimento pela metade (CHANG; SCHMIDT, 1991); em amoreira o uso de canamicina (50 $mg.L^{-1}$) inibiu completamente a organogênese *in vitro* (FIOLA et al., 1990), em batata o uso de antibióticos previamente selecionados em razão da ação bactericida sobre

contaminantes da cultura, revelou que o aumento das concentrações de cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina no meio de cultura apresentou efeitos fitotóxicos severos sobre o crescimento e taxa de multiplicação do material vegetal (PEREIRA, FORTES, 2003). Mais severo foi o efeito em videira com o uso de higromicina, que foi letal às microplantas (PÉROS; TORREGROSA; BERGER, 1998). Enquanto que na cultura *in vitro* de trigo, o uso de carbecilina e cefatoximida promoveu aceleração da oxidação de calos e inibição da regeneração (YU; WEI, 2008). Paradoxalmente, alguns efeitos benéficos do uso de antibióticos na cultura *in vitro* também foram relatados. Na embriogênese somática de calos de chá-verde (*Camellia sinensis*) houve um aumento da taxa de diferenciação em até 43% diante do uso de higromicina (AOSHIMA, 2005). No cultivo de protoplastos de maracujazeiro, o uso de cefotaxima foi relacionado ao aumento da eficiência de plaqueamento de protoplastos isolados de mesofilo foliar (OTONI et al., 1995).

Apesar de estudos terem comprovado a capacidade cumulativa de antibióticos em tecidos vegetais com potencial prejudicial à microbiota do solo (DANIELS, 1982; KUMAR et al., 2005; McINROY et al., 1996) e na alimentação animal e humana (McMANUS et al., 2002; PEDROSO et al., 2005) ainda hoje, na micropropagação a utilização de antibióticos é bastante freqüente, tendo sido recomendada no momento inicial de descontaminação superficial ou com adição ao meio de cultura (ANDRADE et al., 2008). Recomendações como esta constam para a cultivo *in vitro* da mangueira (ANDRADE et al., 2008), nogueira (MEYNIER; ARNOULD, 1989); avelã (REED et al., 1998), menta (BUCKLEY; DeWILDE; REED, 1995), ginseng (TENG; NICHOLSON, 1997), girassol (TASKI-AJDUKOVIA;VASIC, 2005) e gerânio (WOJTANIA; PULAWSKA; GABRYSZEWSKA, 2005). Mesmo assim, algumas vezes nem mesmo o uso prolongado ou por curtos períodos mas sob elevadas concentrações de antibióticos conseguem eliminar bactérias. Donato et al. (2005) testaram o uso de amoxicilina e cefatoxima sódica durante 30 dias ou em elevadas concentrações (300, 600 e 1000 $mg.L^{-1}$) e ainda assim, não tiveram sucesso na eliminação de bactérias (*Acetobacter diazotrophicus*) no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar. Fato similar ocorreu com o cultivo *in vitro* de pimenteira, teixo e ginseng indiano, em que foram utilizados 12 antibióticos em diferentes concentrações, sem sucesso na eliminação do que os autores chamaram de endófitos “constantes” (KULKARNI et al., 2007).

Antibióticos têm sido amplamente utilizados no controle de contaminação na cultura de tecidos vegetais por cerca de 60 anos e por um período de tempo semelhante no tratamento tópico

de doenças bacterianas de frutíferas (KATZNELSON; SUTTON, 1951; McMANUS et al., 2002). Desde a década de 80 já surgem debates para um uso mais restrito e controlado de antibióticos em plantas, visando justamente evitar a contaminação do solo, a indução de resistência e eliminação indiscriminada de bactérias endofíticas (FALKINER; 1998). Cada vez mais duas questões relevantes devem ser levantas quanto ao uso de antibioticoterapia na cultura de tecidos vegetais: o remanescente e cada vez mais grave, potencial de indução à resistência bactericida em experimentos não relacionados á saúde humana e, não menos importante, a real necessidade de se tentar evitar a associação bactéria-microplanta, uma vez que vários efeitos benéficos podem ser explorados a partir dessa associação. Agrava tal desconfiança, o fato que em agricultura, a quantidade de antibióticos ou quimioterápicos usados esta sendo maior que no campo da saúde humana (AMABILE-CUEVAS, 2003) e além disso, uma dosagem não exata de antibióticos pode provocar fitotoxicidade e tremendas perdas econômicas (CID; ZIMMERMANN, 2006).

3.7 O estudo de comunidades bacterianas endofíticas

Os métodos para analisar a diversidade microbiana e a função da comunidade podem ser divididos em métodos dependentes e independentes de cultivo (JUCK et al., 2000), sendo que ambos devem incluir técnicas de caracterização genética (Van HAMME; SINGH; WARD, 2003). Em métodos dependentes de cultivo, bactérias são isoladas de amostras ambientais e cultivadas em meio de cultura. Porém, nesse tipo de análise, ocorre um processo seletivo no qual bactérias que não possuem a capacidade de se desenvolver nas condições aplicadas no isolamento, como meio de cultura, temperatura e atmosfera de incubação ficam excluídas das análises (BAKONYI et al., 2003). Particularmente, no caso do estudo de bactérias endofíticas mesmo diante uma colonização ativa de vários tecidos vegetais, resultando numa associação complexa, duradoura, generalizada, a característica assintomática ainda prevalece na planta hospedeira (BACON; HINTON, 2006), impedindo desta forma se conhecer sobre sintomas e/ou aspectos morfológicos de colônias no habitat natural.

Sendo assim, para se avaliar comunidades microbianas tidas como não cultiváveis ou fastidiosas, uma alternativa é o uso de técnicas moleculares baseadas na extração direta de amostras ambientais. Por esta razão, a mais de uma década métodos dependentes de cultivo têm sido substituídos por técnicas de biologia molecular capazes de permitir o acesso à comunidade

bacteriana em seu habitat natural, como a análise do gene de 16S rRNA (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Nesse caso o principal benefício das análises moleculares é a possibilidade de estudar comunidades microbianas sem a necessidade do cultivo prévio, enquanto as análises usando incubação no laboratório (microbiologia clássica) são indiretas e produzem mudanças artificiais na estrutura e na atividade metabólica da comunidade bacteriana. Além disso, métodos moleculares diretos preservam o 'status' metabólico *in situ* e a composição da comunidade microbiana (ALVAREZ, 2007).

3.7.1 Métodos dependentes de cultivo

Os métodos tradicionais, dependentes de cultivo, são os mais comuns e estão baseados nas diferenças morfológicas, metabólicas e fisiológicas dos microrganismos. Isto inclui o isolamento, cultivo e identificação em meio de cultura. A identificação microbiológica tradicional inclui a avaliação de características macroscópicas (temperatura ótima de crescimento, morfologia das colônias) e microscópicas (tamanho, formato, padrões de agregação celular, mobilidade, presença ou ausência de flagelos, coloração Gram) para descrição de características culturais e morfologia celular (HOLT, 1994). A técnica de coloração Gram permite distinguir os dois principais grupos de bactérias por microscopia de luz. As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede espessa, homogênea, geralmente não estratificada e predominantemente constituída por peptidoglicano. Deste modo, o precipitado insolúvel que se forma por ação do mordente (solução de iodo), fica retido no interior da célula pela camada espessa de peptidoglicano, logo, estas células não são descoradas permanecendo com a coloração conferida pelo corante primário (violeta de cristal - púrpura). Já, as bactérias Gram-negativas apresentam uma parede estratificada constituída por uma membrana externa e por uma camada mais interna que contém peptidoglicano e que é mais fina que a das Gram-positivas. Deste modo, o precipitado insolúvel, que se forma por ação do mordente, é removido (membrana externa é parcial ou totalmente solubilizada pelo agente descolorante – álcool, acetona ou ambos), e as células ficam descoloradas, coradas de vermelho pelo contrastante (safranina ou fucsina básica) (PELCZAR; CHANE; KRIEG, 1997). O uso da identificação por coloração Gram é muito importante para associar a resistência ou susceptibilidade de bactérias pela ação de antibióticos (CID; ZIMMERMANN, 2006).

As provas bioquímicas também constituem relevantes técnicas para estudos de bactérias cultiváveis. As bactérias realizam variadas atividades bioquímicas utilizando nutrientes obtidos a partir do ambiente que as rodeia. Essa reações bioquímicas são catalisadas por enzimas que têm a capacidade de degradação de carboidratos, lipídios, proteínas e aminoácidos. Existem técnicas nas quais é possível verificar a atividade de algumas dessas enzimas, uma vez que a metabolização destas moléculas orgânicas origina produtos finais que podem ser detectados em laboratório (BLAZEVIC; EDERER, 1975). As principais e mais utilizadas provas bioquímicas são as de utilização de fontes de carbono e de nitrogênio. Outros métodos também são utilizados para identificação rápida e diferenciação de bactérias cultiváveis, sendo que um dos mais promissores e confiáveis métodos consiste na análise de diferenças qualitativas e quantitativas da composição de ácidos graxos da parede da célula bacteriana (NDOWORA et al., 1996). A análise do perfil dos ácidos graxos da parede celular (*fatty acids extraction method* – FAME) para identificação tem sido utilizada extensivamente para caracterizar comunidades bacterianas de solos (RITCHIE et al., 2000) e especialmente para identificação de bactérias endofíticas: para análise da diversidade taxonômica de *Pseudomonas* de raízes de canola em campo (MISKO; GERMIDA, 2002); bactérias isoladas de sementes e folhas de beterraba (THOMPSON et al., 1993); de bactérias endofíticas de algodão e milho (McINROY; KLOEPPER, 1995); *Acetobacter diazotrophicus* endofítica de colmo de cana-de-açúcar (DONG et al.,1997); de isolados de raízes de milho (CERIGIOLI, 2005); para seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos (SHIOMI; MELO; MINHONI, 2008); além de um estudo especificamente com bactérias endofíticas de morangueiro micropropagado (DIAS et al., 2009).

3.7.2 Métodos independentes de cultivo

Análises por meio de técnicas independentes de cultivo têm permitido o estudo ampliado sobre a diversidade microbiana existente em amostras ambientais, que antes estavam restritas a avaliação dependente de cultivo e identificação morfológica (HUGHES et al., 2001). O uso de técnicas moleculares baseadas na análise do gene 16S rRNA para bactérias tem permitido grandes avanços no estudo de comunidades bacterianas, excluindo os problemas e limitações devidos a baixa culturabilidade (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; ANDREOTE, 2007). Além disso a biologia molecular também pode ser utilizada de maneira complementar ao

isolamento, permitido o desenvolvimento de pesquisas com menor custo e tempo, e com maior capacidade de produção de dados (ARMOUGOM; RAOULT, 2009; MENDES, 2009; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). Os ácidos ribonucléicos ribossomais (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade microbiana. Seus genes, os rDNAs são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula com o maior grau de conservação existente (REIS JUNIOR et al., 2002). Uma das vantagens de se usar informações sobre as seqüências de rRNA é a sua disponibilização em bases de dados de livre acesso, tais como *Genbank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), *RDP* (http://rdp.cme.msu.edu/html) e *Greengenes* (http://greengenes.lbl.gov), permitindo a comparação de novas seqüências obtidas com as seqüências presentes nessas bases.

A estrutura e a diversidade de comunidades bacterianas podem ser avaliadas pela variabilidade das seqüências do gene 16S para bactérias após sua amplificação em reações em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* –PCR), aliadas a 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*") (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; MUYZER et al., 1995; MUYZER; SMALLA, 1998; OROS-SICHLER, 2007; ØVREAS, 2000; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000).

3.7.2.1 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE consiste na separação de 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 é resultado da composição de nucleotídeos dos mesmos e seu teor G+C (LAMBAIS et al., 2005). A técnica de DGGE não é suficiente para determinar e identificar diretamente as espécies ou grupos taxonômicos em uma amostra (JOYNT et al.,

2006), para tanto é necessário fazer a excisão da banda do gel e sequenciá-la (LAMBAIS et al., 2005).

A técnica de DGGE têm sido usado na comparação e descrição de comunidades endofíticas de diferentes amostras ambientais (RANJARD; POLY; NAZARET; 2000), além de permitir a inferir a afiliação filogenética dos membros dessas comunidades, testar a pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de bactérias a partir de amostras ambientais, e estudar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema (HEUER et al., 1997; MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993; NAVARRETE, 2009; NOGUEIRA et al., 2006). Principalmente no que se refere às comunidades bacterianas associadas à plantas o DGGE já foi utilizado para estudar a comunidade bacteriana em citros (ANDREOTE et al., 2006; ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2006); comparar a comunidade bacteriana do rizoplano e rizosfera de plantas de eucalipto transgênicas (ANDREOTE et al., 2009a; 2009b); e soja transgênica (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005); bactérias endofíticas em folhas senescentes de ácer e carvalho (DAS; ROYER; LEFF, 2007); bactérias endofíticas em batatas (GARBEVA et al., 2001; SESSITSCH et al., 2002); em brássicas acumuladoras de níquel (IDRIS et al., 2004); em pinus (IZUMI et al., 2007); em espécies de árvores decíduas e coníferas (IZUMI et al., 2008); em raízes de milho (SEGHERS et al., 2004); em *Azolla microphylla* (SI-PING et al., 2008), em arroz (SUN et al., 2008) e até em microplantas de pupunheira (ALMEIDA et al., 2009).

Vale salientar que o uso de DGGE para acessar comunidades bacterianas associadas a plantas merece uma atenção especial. Deve-se levar em consideração que devido a origem procariótica dos cloroplastos, esse possuem exemplares do gene 16S rRNA remanescentes, que podem concorrer com a amplificação do DNA bacteriano. Visando eliminar essa competição 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). O *primer* 799f vem sendo utilizado com freqüência, tendo sido relatado em vários estudos recentes em comunidades bacterianas endofíticas (IDRIS et al., 2004; MÜLLER; DÖRING, 2009; SUN et al., 2008; ULRICH; ULRICH; EWALD, 2008).

3.7.2.2 Análise automatizada do espaço intergênico ribossomal (ARISA)

A ARISA, desenvolvida por Fisher e Tripplett (1999) é uma técnica baseada no polimorfismo do comprimento do espaço intergênico ribossomal 16S–23S rRNA; consiste no uso de *primer* fluorescente na amplificação por PCR do espaço intergênico entre a menor e a maior subunidade do gene rRNA (16S-23S em procarioto). Esta região pode codificar vários tRNAs dependendo da espécie e apresenta heterogeneidade em termos do comprimento e da composição da sequência (GONZÁLEZ et al. 2003; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). Os produtos de PCR são analisados por meio de um sistema de eletroforese capilar automatizado, em que picos correspondem a fragmentos de DNA detectados por um sistema fluorescente a laser (CARDINALE et al., 2004). A técnica de ARISA distingue as populações microbianas e permite uma análise sensível das comunidades com um nível relativamente elevado de resolução taxonômica e reprodutibilidade (CARDINALE et al., 2004, FISHER; TRIPLETT, 1999). Fisher e Triplett (1999) sugerem que esta técnica é rápida e efetiva para a análise de comunidades, podendo ser empregada juntamente com outros métodos mais acurados (clonagem e sequenciamento) quando for necessária uma resolução espacial e temporal refinada (NAVARRETE, 2009). Devido à alta resolução e sensibilidade da técnica, o número de unidades taxonômicas operacionais (UTO’s) é maior do que a técnica de RISA, o que permite uma robusta comparação entre perfis de comunidades (MENDES, 2009).

A natureza automatizada do método tem possibilitado análises rápidas de um grande número de amostras. Ainda são poucos os estudos com ARISA que investigaram as comunidades bacterianas endofíticas, mas a técnica já evidenciou diferenças entre a comunidade bacteriana presente em plantas de milho com diferentes idades (BRUSETTI et al., 2004), bem como permitiu o estudo de populações de *Methylobacterium* spp. da filosfera de poáceas (KNIEF et al., 2008).

3.7.2.3 Microscopia

Técnicas de microscopia, aliadas a biologia molecular trazem grandes progressos ao estudos de comunidades bacterianas. São vários os métodos utilizados para avaliar a ocorrência e localização de bactérias endofíticas no interior de tecidos vegetais e incluem microscopia de luz,

eletrônica de transmissão, de varredura, microscopia confocal de varredura a laser , possibilitando melhor compreensão dos processos penetração ou adesão, colonização do hospedeiro e as alterações mutuamente induzidas (OLIVARES et al., 1996; RUPPEL et al., 1992; WHITE Jr.; MORGAN-JONES; MORROW, 1993).

As vias de infecção e interação de bactérias endofíticas na planta hospedeira podem ser estudadas por meio da transformação de bactérias com o gene *gfp* (*green fluorescent protein*) que codifica uma proteína de cor verde florescente (GFP), encontrada na água-viva (*Aequorea victoria*) e de outros cnidários como *Renilla reniformis* e *Obelia* sp. (GOROKHOVATSKY et al., 2004). A GFP é utilizada também para o monitoramento de expressão de genes e localização de proteínas e estudos de interação bactéria-hospedeiro (GAGE; BOBO; LONG, 1996).

A microscopia eletrônica de varredura convencional (MEV) permite a visualização das interfaces entre as superfícies das bactérias e hospedeiros, e tem sido satisfatoriamente usada para detectar endófitos em várias plantas. Andreote et al. (2006) associaram a técnica de PCR-DGGE à MEV para investigar a interação entre *Methylobacterium mesophilicum e Xylella fastidiosa* em citros; assim como Si-Ping et al. (2008) ao analisar a diversidade bacteriana endofítica em *Azolla microphylla* e Almeida et al (2009) que estudaram a presença de bactérias endossimbiontes em microplantas de pupunheira. Anteriormente, a colonização de endofíticos estreptomicetos provenientes de dentro do córtex de raízes de tomateiro já havia sido observada por MEV (SARDI et al., 1992) e também com o auxílio de MEV, Christiansen-Weniger (1998) verificou o estabelecimento da colonização de bactérias diazotróficas em milho, arroz e trigo. Franke-Whittle et al (2005) investigaram a habilidade de *Gluconacetobacter sacchari* viver como um endófito em cana-de-açúcar, e mais recentemente, Mattos et al. (2008) demonstraram essa mesma habilidade, só que desta vez de *Burkholderia kururiensis* em plantas de arroz. A técnica de MEV também possibilitou o estudo de *Herbaspirillum hiltneri* sp. como um isolado endofítico de raízes de trigo (ROTHBALLER et al., 2006) e auxiliou o estudo da interação entre plantas de milho e bactérias (SOUZA et al., 2004). E Minamiyama et al. (2003) demonstraram por MEV *Streptomyces galbus* penetrando em folhas de *seedligns* da cultura de tecidos de rododendro através do estômato, e Suzuki et al. (2005) utilizaram MEV para mostrar a colonização também de *S. galbus* nos espaços intercelulares de folhas de tomateiro após sua entrada pelo estômato.

Demais técnicas também colaboram com estudos monitoramento mais eficiente da trajetória da bactéria durante a evolução da colonização da planta, permitindo a localização do agregado bacteriano, ou ainda permitem o estudo de compostos produzidos pelas bactérias "*in situ",* como por exemplo, enzimas e polissacarídeos (ALVES, 2003). A microscopia eletrônica de transmissão (MET), por sua vez, é utilizada para observação de estruturas intracelulares ou que demandem grande resolução (YARA, 2006). Por essas características a MET é utilizada no estudo de bactérias endossimbiontes, pois permite a visualização intracelular da bactérias com detalhes, caso a colonização ocorra em vacúolos (CHU et al., 2004), no citoplasma (VAN KIRK; HAYES; HEINZEN, 2000), mitocôndrias (BENINATI et al., 2004), ou mesmo no núcleo das células (ALVERCA et al., 2002). E desde a década de 90 até hoje são freqüentes os relatos do uso de MET especificamente para bactérias endofíticas, com destaque para o estudo de James e Olivares (1998), Franke-Whittle et al. (2005) em cana-de-açúcar; Ruppel et al. (1992) e Liu et al. (2009) em trigo; Reinhold-Hurek e Hurek (1998) em gramíneas; Van Oevelen et al. (2002) em *Psychotria*; Wuelff, van Vuurdes e Hockenhull (2003) em brássicas; Suzuki et al (2005) em rododendro; Si-Ping et al. (2008) em *Azolla microphylla*; Mattos et al. (2008) em arroz e Almeida et al (2009) em pupunheira.

Além dessas técnicas, a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) associada a microscopia confocal varredura a laser (MCVL) também são excelentes ferramentas para o estudo da interação de bactérias endofíticas e seus hospedeiros, sem a necessidade de inoculação prévia, pois oferecem a possibilidade de detecção de bactérias-alvo a partir de sondas de oligonucleotídeos marcadas, construídas especificamente com base na informação da seqüência do gene 16S rRNA do organismo em estudo, mesmo sendo esse caracterizado como fastidioso ou "não-cultivável" (ASSMUS et al., 1995; AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Uma representação explicativa das etapas do trabalho pode ser visualizada na Figura 2.

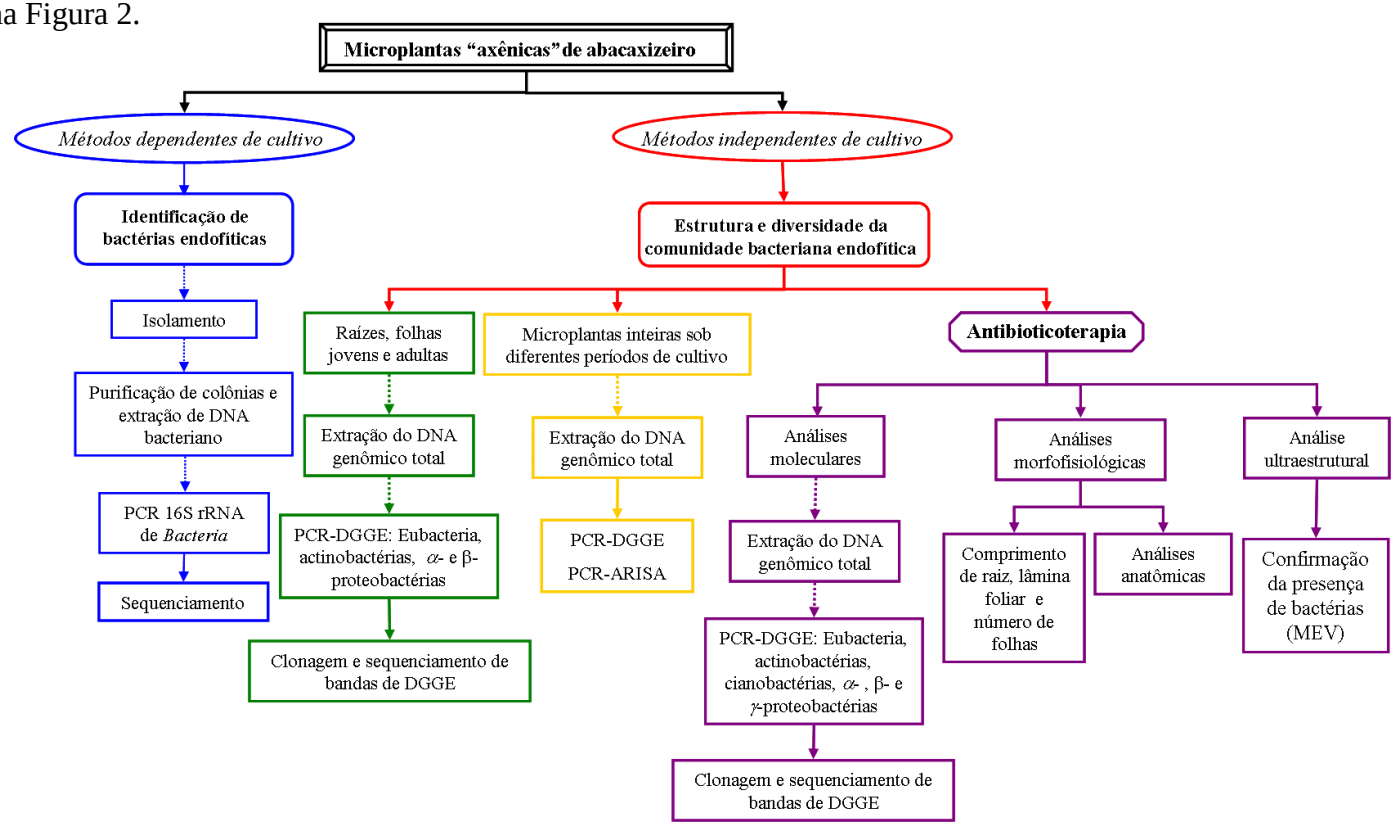

Figura 2 – Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho. Linhas contínuas = objetivos ou métodos de análises dos resultados. Linhas pontilhadas = procedimentos intermediários

4.1 Material vegetal e cultivo *in vitro*

Microplantas de abacaxizeiros (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. IAC Gomo-de-mel, originalmente derivadas de cultura de meristemas foram cultivadas em meio com a metade da concentração de sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em pH 5,8. As microplantas foram cultivadas em tubo de ensaio (25 x 150 mm) (Figura 3) contendo 15 mL de meio de cultura e acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C e irradiância de 42 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$, respectivamente), em fotoperíodo de 16 horas. Os subcultivos foram realizados a cada 40 dias.

Figura 3 – Microplantas de abacaxizeiros cv. IAC Gomo-de-mel com um mês (a), três meses (b) e sete meses (c) de cultivo

4.2 Métodos dependentes de cultivo

4.2.1 Isolamento de bactérias endofíticas

Para o isolamento de bactérias endofíticas amostras de parte aérea e sistema radicular de microplantas assintomáticas de abacaxizeiros cv. IAC Gomo-de-mel foram desinfestadas superficialmente (ARAÚJO et al., 2002) e depois fragmentadas com auxílio de bisturi, ou trituradas com auxílio de pistilo e almofariz autoclavados, sob condições assépticas. A trituração deu-se em 5 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) (8 $g.L^{-1}$ de NaCl; 0,2 $g.L^{-1}$ de KCl; 1,44 $g.L^{-1}$ de Na_2HPO_4; 0,24 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4), em pH 7,4. Alíquotas dos tecidos triturados foram diluídas (10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}) ou não diluídas, e posteriormente plaqueadas em oito meios de cultura: LB (*Difco™ Luria Broth Base, Miller*), TSA (*Tryptic Soy Agar*, Difco), TSB (*Bacto™ Tryptic Soy Broth*, Difco), BSM 523 (*Bacteria Screening Medium 523*, Sigma), AIAG (*Actinomycete Isolation Agar Glicerol*, Difco), NA (*Nutrient Agar*, Difco) e R2A Agar (Difco), e BG-11 (ALLEN, 1968), preparados sob forma líquida (tubos de ensaio, meios LB e BG-11) ou geleificada com ágar (6 $g.L^{-1}$) (placas de Petri, todos os meios, com exceção do BG-11). O mesmo procedimento foi conduzido com amostras dos tecidos fragmentados (Figura 4).

Para cada unidade experimental foram inoculados 100 µL de solução de tecido triturado, ou cinco fragmentos de tecido vegetal em cada tubo de ensaio e em cada placa de Petri (ambos com 10 mL de meio de cultura). Foram realizadas quatro repetições, totalizando 64 unidades experimentais em tubos de ensaio [parte aérea e sistema radicular (2) x concentrações da solução de tecido triturado (4) x meios de cultura (2) x repetições (4)] e 56 unidades experimentais em placas [parte aérea e sistema radicular (2) x meios de cultura (7) x repetições (4)] que foram incubadas a 28 °C, em estufa bacteriológica. O desenvolvimento de colônias foi avaliado semanalmente, durante seis meses, considerando-se a possibilidade de haver endófitos fastidiosos. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso.

Outro isolamento foi realizado a partir do “meio folha-ágar” (FA), sendo que para cada 100 mL de meio foram utilizados 200 mg de folha de abacaxizeiro, 3 g de sacarose, 0,7 g de ágar. Foram utilizadas apenas amostras de parte aérea trituradas e fragmentadas, incubadas em placas de Petri, totalizando 20 unidades experimentais {[tecido fragmentado (1) + concentrações da solução de tecido triturado (4)] x repetições (4)}.

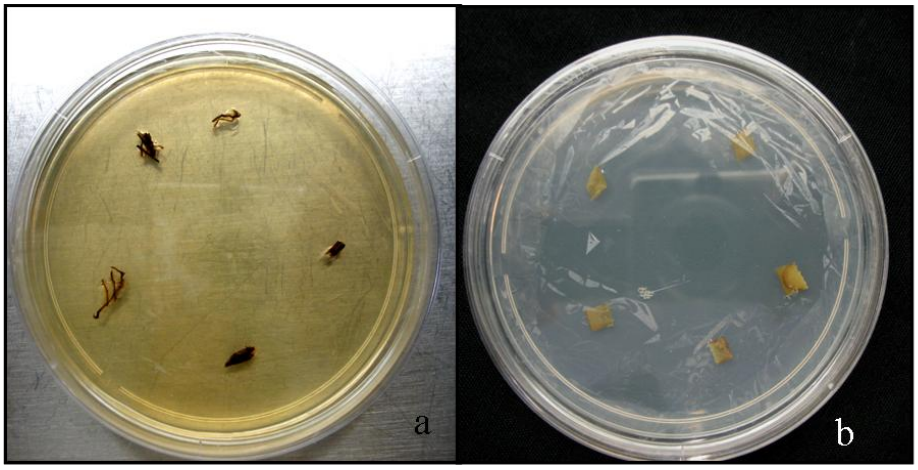

Figura 4 – Placas de Petri para isolamento de bactérias endofíticas de microplantas assintomáticas de abacaxizeiros. Fragmentos de sistema radicular em meio LB (a) e fragmentos de parte aérea em meio TSB (b) incubados em estufa bacteriológica

As colônias obtidas foram subcultivadas no mesmo meio de cultura em que se originaram e purificadas pelo método de estrias. Amostras das colônias purificadas foram armazenadas em solução de glicerol 20% em congelador a -80 °C, porém anteriormente foram submetidas à extração de DNA com a utilização do *Kit Power Soil DNA Extraction* (Mo Bio Laboratories). O DNA extraído foi utilizado para reação de amplificação (PCR) do gene 16S rRNA de *Bacteria* com os *primers* fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e rD1 (5'AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'), descritos por Weisburg et al. (1991).

A reação de PCR foi feita em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10x, 0,1 mM de cada dNTP (0,25 µL), 1,5 mM de $MgCl_2$ (0,75 µL), 5 pmol de cada *primer* (1 µL), 1 U de *Platinum*® *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen) (0,2 µL), 1 µL da amostra de DNA (~20 ng) e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, para um volume final de 25 µL. A PCR foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s, extensão final a 72 °C por 10 min. Ao final do programa as amostras permaneceram no termociclador a 4 °C. Para cada amostra, uma alíquota de 5 µL do produto da PCR foi avaliada em comparação com os marcadores *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen) e *100 pb* (Invitrogen), após corrida eletroforética a 90 V por 30 minutos em gel de agarose 1%, usando tampão TSB (BRODY; KERN, 2004).

Em seguida, os produtos foram purificados com o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences) conforme as instruções do fabricante e quantificados em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific). As amostras purificadas foram submetidas a reações de seqüenciamento utilizando-se, separadamente, 1 µL (5 pmol) de cada um dos *primers* fD1 e rD1 (WEISBURG et al.,1991), 200 ng de DNA, 2 µL de *DYEnamic* (*DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit*, GE Healthcare Life Sciences), 3 µL de tampão de diluição 2,5x (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM $MgCl_2$) e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 10 µL. As reações foram conduzidas nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação a 95 °C por 20 s, anelamento a 55 °C por 15 s, extensão a 60 °C por 60 s. Ao final do programa as amostras permaneceram no termociclador a 4 °C.

Após as reações as amostras foram precipitadas para o sequenciamento conforme instrução do fabricante. Adicionou-se 2 µL de tampão acetato de sódio/EDTA e 60 µL de etanol absoluto. O material foi misturado em agitador automático (*vortex*) e centrifugado 12000 rpm, por 15 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 150 µL de etanol 70%. Foi realizada nova mistura em *vortex* e centrifugação a 12000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi removido e as amostras levadas ao concentrador de DNA (Eppendorf) por 10 min. Depois de secas as amostras foram ressuspensas em 10 µL de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems) e agitadas em *vortex* por 10 min. O sequenciamento foi realizado no sequenciador capilar automático modelo *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

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

4.3 Métodos independentes de cultivo

Visando conhecer a estrutura e a diversidade bacteriana endofítica em microplantas assintomáticas de abacaxizeiros foram utilizados métodos independentes de cultivo, baseados na análise da heterogeneidade de ácidos nucléicos por meio de amplificação por PCR específica para o gene 16S rRNA, seguida pelos métodos de PCR-DGGE e/ou PCR-ARISA.

Para todas as análises independentes de cultivo o procedimento iniciou-se com a desinfestação superficial de microplantas (ARAÚJO et al., 2002). Para confirmar o sucesso do procedimento de desinfestação, fragmentos das microplantas e alíquotas da água esterilizada utilizada para a lavagem final foram plaqueados em meio de cultura TSA (*Tryptic Soy Agar***,** Difco). As placas foram incubadas a 28 °C por sete dias para verificação de um possível crescimento bacteriano. As amostras de plantas que não foram consideradas contaminadas, diante desse teste, foram utilizadas para análises posteriores.

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) e as reações de sequenciamento no sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Após cada PCR realizada, uma alíquota de 5 µL de cada produto foi avaliada em comparação com os marcadores *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen) e *100 pb* (Invitrogen) após corrida eletroforética a 90 V por 30 minutos em gel de agarose 1%, usando tampão TSB (BRODY; KERN, 2004). Quando necessário, as amostras também foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific).

4.3.1 Extração do DNA genômico total das microplantas

A extração do DNA genômico total de microplantas foi realizada segundo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA**,** 1998). Aproximadamente 200 mg de cada amostra foram triturados em N_2 líquido. O tecido triturado foi exposto a 700 µL de tampão de extração (CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM) e incubado por 30 min a 65 °C, seguido por duas extrações: a primeira com 450 µL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) e a segunda com 450 µL de fenol tamponado. Após centrifugação de 5 min a 12000 rpm o DNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol a -20 °C por 30 a 60 min. O precipitado obtido foi novamente centrifugado e posteriormente lavado com etanol 70% e 96%. Após secagem, o DNA foi

ressuspenso em 50 µL de tampão TE (Tris HCl 10mM pH8,0; EDTA 1mM) e tratado com 2 µL de RNAse (10 mg.mL^{-1}) por 30 min a 37 °C. Após a extração, uma alíquota de 5 µL de DNA de cada amostra foi quantificada em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004) e comparado com o padrão *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen). As amostras também foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific).

4.3.2 Avaliação da comunidade bacteriana endofítica em raízes, folhas jovens e adultas

Amostras do DNA genômico total extraído de segmentos de raízes, folhas jovens (diferenciadas a partir do primeiro ao terceiro nó apical) e folhas adultas (diferenciadas a partir do quarto nó apical) (Figura 5) foram utilizadas para a avaliação da comunidade bacteriana endofítica. Foram realizadas quatro repetições de cada órgão, totalizando 12 amostras.

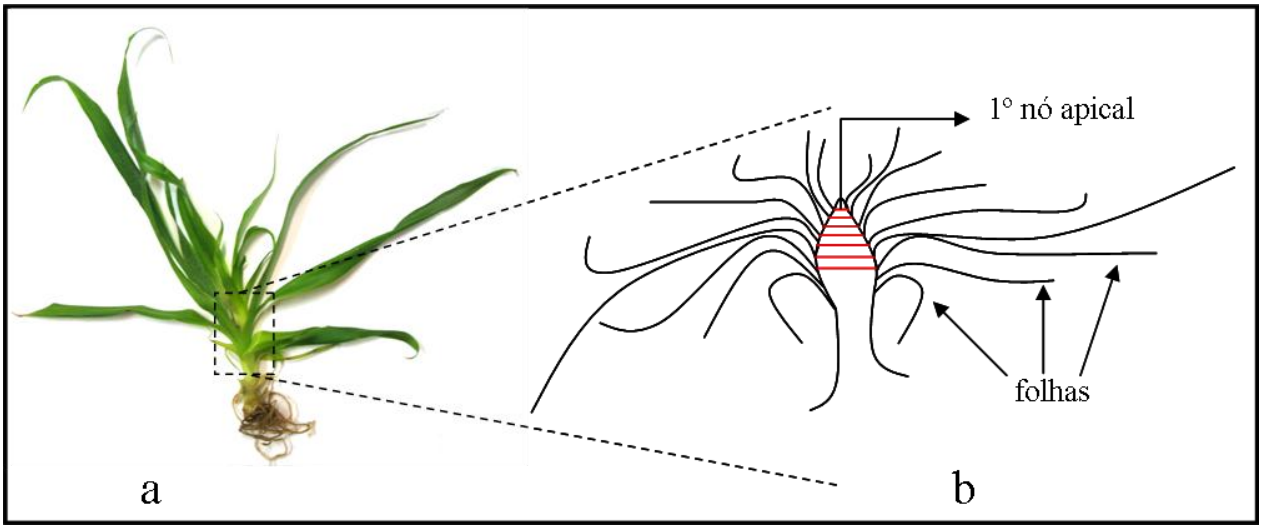

Figura 5 – Microplanta de abacaxizeiro (a) e desenho esquemático dos ápices caulinares e as folhas originadas a partir deles (b). Linhas vermelhas horizontais indicam o posicionamento dos nós

4.3.2.1 PCR-DGGE

Para análise da comunidade bacteriana endofítica total e para evitar a interferência de DNA proveniente de cloroplastos vegetais, a amplificação do gene 16S rRNA foi realizada com os *primers* 799f (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e R1492 (HEUER et al., 1997). Para acessar a comunidade bacteriana total, actinobactérias, α- e β-proteobactérias as reações para cada grupo foram realizadas separadamente e em combinação com o *primer* R1378 (HEUER et al., 1997).

Para α, β-proteobactérias e actinobactérias foram utilizados os *primers* F203α, F948β e F243, respectivamente (GOMES et al., 2001; HEUER et al., 1997). Os produtos amplificados foram utilizados como DNA molde (~20 ng), separadamente, em uma seguinte reação de PCR, com os *primers* F984GC e R1378. Todas as reações mencionadas nesse item estão apresentadas na Tabela 1. As metodologias tiveram como base os trabalhos referenciados nessa mesma tabela, com adaptações quando necessário. Todas as reações de PCR-DGGE foram preparadas para um volume final de 25 µL, usando 2,5 µL de tampão para PCR 10x, 0,2 mM de cada dNTP, 5 pmol de cada *primer*, 1 U de *Platinum® Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), com concentrações variáveis de $MgCl_2$ e presença de formamida deionizada ou albumina sérica bovina (BSA).

4.3.2.2 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

O DGGE foi realizado usando o sistema *phorU2* (Ingeny, Goes, Holanda). O protocolo da técnica de DGGE foi adaptado de Muyzer, de Waal e Uitterlinden (1993). Os produtos amplificados na segunda reação de PCR foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida 6% (p/v) em tampão TAE 0,5x (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,0). Os géis foram preparados com gradiente desnaturante linear 45-65% (onde 100% de desnaturação significa 7 M de uréia e 40% de formamida). Os géis foram submetidos à eletroforese vertical por 4 h a 200 V em temperatura constante de 60 °C. Após a eletroforese os géis foram corados com nitrato de prata 0,2% e fotodocumentados. As imagens dos géis foram normalizadas e os perfis foram analisados utilizando-se a plataforma do *software BioNumerics* versão 5.1 (Applied Maths). A tolerância com respeito ao posicionamento das bandas foi de 1%. A análise de agrupamento hierárquico foi feita usando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) e a correlação foi calculada baseada no coeficiente de correlação de Pearson. Tanto as bandas fortes quanto as fracas foram incluídas na análise, assim, tendo em conta a presença e ausência de faixas em pontos específicos. A matriz considerando presença ou ausência das bandas foi utilizada para análise da riqueza de espécies, que foi expressa como o número total de bandas detectadas nos perfis de DGGE. Diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996) foram elaborados para verificar as intersecções e peculiaridades das bandas obtidas.

4.3.2.3 Clonagem e sequenciamento de bandas de DGGE

A partir dos padrões obtidos, bandas de interesse foram excisadas dos géis de DGGE com auxílio de lâminas de bisturi esterilizadas e eluídas em 10 μL de água ultrapura (Milli-Q) esterilizada. O DNA difundido foi usado como molde em PCR com os *primers* F984 e R1378 (HEUER et al., 1997) (Tabela 1). Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose e quantificados em espectofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific). Em seguida, os produtos foram purificados com o *kit GFX PCR DNA* a*nd Gel Band Purification* (GE GE Healthcare Life Sciences), verificados novamente em gel de agarose 1% e clonados no plasmídeo *pGEM-T Easy Vector* (Promega). Após transformação em células quimiocompententes de *Escherichia coli* (DH-5α), clones foram aleatoriamente selecionados, crescidos em meio *CIRCLEGROW®* (Bio 101) e, posteriormente o DNA plasmidial foi extraído (BIRNBOIM; DOLY, 1979) e utilizado como molde em reações de PCR com os *primers* do vetor M13F (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') e M13R (5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3') da seguinte maneira: 200 ng de DNA plasmidial, 2 μL de *DYEnamic* (GE Healthcare Life Sciences), 1 μL de um dos *primers* a 5 pmol, 3 μL de tampão de diluição 2,5x (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM $MgCl_2$) e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 10 μL. As reações foram nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação a 95 °C por 20 s, anelamento a 55 °C por 15 s, extensão a 60 °C por 60 s. Os produtos resultantes foram precipitados com solução de acetato de sódio/EDTA e etanol absoluto (metodologia do item **4.2.1**) As amostras foram submetidas ao sequenciamento e as seqüências obtidas foram editadas utilizando o pacote de programas Phred/Phrap/Consed (detalhes no item **4.2.1**) e comparadas com seqüências do *Ribossomal Database Project II* (RDP II) versão 10 (http://rdp.cme.msu.edu/) e *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o programa *nucleotide blast* do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

Tabela 1 - *Primers* utilizados nas reações de PCR-DGGE, programas no termociclador e variações no preparo das reações

Primer[*]	Alvo	Seqüência (5' → 3')	Referência	Conjunto de *primers*	Programa termociclador/variações no preparo das reações
799f	16S rRNA cloroplastidial	AACMGGATTAGATACCCKG	CHELIUS; TRIPLETT, 2001	799f/R1492	95 °C 3 min; 35 ciclos: 94 °C 20 s, 54 °C 40 s, 72 °C 40 s; 72 °C 7 min/ 2,5 mM $MgCl_2$, 0,25 µL BSA
R1492	16S rRNA bacteriano	TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	HEUER et al., 1997		
R1378r	16S rRNA bacteriano	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	HEUER et al., 1997	F203/R1378	94 °C 5 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min 3,75 mM $MgCl_2$, , 0,25 µL formamida
F203α	16S de α-proteobactérias	GGATGAGCCCGCGGCCTA	GOMES et al. 2001		
F948β	16S das β-proteobactérias	CGCACAAGCGGTGGATGA	GOMES et al. 2001	F948β/R1378	94 °C 5 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 61 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min/ 3,75 mM $MgCl_2$, 0,25 µL formamida
Gamma395f	16S das γ-proteobactérias	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	MÜHLING et al., 2008	Gamma395f/R1378	96 °C 4 min; 30 ciclos: 96 °C 1 min, 54 °C 1 min, 74 °C 1 min; 74 °C 10 min 2,5 mM $MgCl_2$
F243	16S de actinobactérias	GGATGAGCCCGCGGCCTA	HEUER et al., 1997	F243/R1378	94 °C 4 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min 3,75 mM $MgCl_2$, 0,25 µL formamida
CYA361f	16S de cianobactérias	GGAATTTTCCGCAATGGG	MÜHLING et al., 2008	CYA361/R1378	96 °C 4 min; 30 ciclos: 96 °C 1 min, 59 °C 1 min, 74 °C 1 min; 74 °C 10 min 2,5 mM $MgCl_2$
F984GC	16S rRNA bacteriano	gc.-AACGCGAAGAACCTTAC	HEUER et al., 1997	F984GC /R1378**	94 °C 4 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min 2,5 mM $MgCl_2$, 0,25 µL formamida
gc.		CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGG			

Nota: *f - *forward primer*; r - *reverse primer*; gc. - seqüência rica em G+C inserida na extremidade 5'; ** *Nested*-PCR – utilizou como molde os produtos resultantes da amplificações anteriores.

4.3.3 Avaliação da comunidade bacteriana endofítica em microplantas sob diferentes períodos de cultivo

Visando identificar possíveis alterações na estrutura e diversidade da comunidade bacteriana endofítica de acordo com o desenvolvimento vegetal *in vitro*, sem a renovação do meio de cultura, amostras do DNA genômico total de microplantas com uma semana (S1), quatro meses (M4) e oito meses (M8) de cultivo (Figura 6) foram utilizadas para análises de PCR-DGGE e PCR-ARISA. Foram realizadas quatro repetições de cada período de cultivo, totalizando 12 amostras.

Figura 6 – Microplantas de abacaxizeiros com uma semana (S1) (a), quatro meses (M4) (b) e oito meses (M8) (c) de cultivo

4.3.3.1 PCR-DGGE

Para evitar a interferência de DNA proveniente de cloroplastos vegetais, a reação de PCR do gene 16S rRNA foi realizada com os *primers* 799f (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e R1492 (HEUER et al., 1997) e os produtos amplificados foram utilizados como DNA molde (~20 ng), separadamente, em uma seguinte reação de PCR, com os *primers* F984GC e R1378 (Tabela 1). Todas as reações de PCR-DGGE foram preparadas sob as mesmas condições apresentadas no item **4.3.2.1**, para um volume final de 25 µL. O DGGE foi realizado como descrito no item **4.3.2.2**. Um diagrama de Venn (FAUTH et al., 1996) foi elaborado para verificar as intersecções e peculiaridades das bandas obtidas. A análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) foi realizada usando a plataforma do *software BioNumerics* versão 5.1 (Applied Maths) e os pacotes do *CANOCO for Windows 4.5* (Biometris).

4.3.3.2 PCR-ARISA

As reações de PCR-ARISA foram preparadas nas mesmas condições especificadas para PCR-DGGE (ver detalhes na tabela a seguir, Tabela 2). Os produtos de PCR-ARISA foram purificados utilizando o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences), conforme as instruções do fabricante e analisados em gel de agarose 1% (conforme descrito em **4.2.1**).

Tabela 2 - *Primers* utilizados nas reações de PCR-ARISA, programas no termociclador e reações

*Primer**	Sequência (5' → 3')	Referência	Programa termociclador/variações no preparo das reações
1490-72f-FAM	TGCGGCTGGATCCCCTCCTT	CASAMAYOR et al., 2002	96 °C 3 min; 25 ciclos: 94 °C 1,5 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1,5 min; 72 °C 10 min 5 pmol *primer*, 2 ng/µL de DNA
LSU21-38r	TGCCAAGGCATCCACCGT		

Nota: * FAM - marcação carboxi-terminal (FAM) na extremidade 5'.

4.3.3.3 Análise automatizada do espaço intergênico ribossomal (ARISA)

A discriminação usando ARISA foi feita em sequenciador e para o carregamento das amostras, 1 µL do produto de PCR purificado foi misturado a 8,75 µL de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems) e 0,25 µL do padrão de comprimento *GeneScan ™ 500 ROX* (Applied Biosystems). Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 min e resfriadas a 0 °C por 3 min. A verificação do comprimento dos fragmentos entre a menor e a

maior subunidade do gene 16S rRNA foi feita usando o programa *PeakScanner* versão 1.0 (Applied Biosystems). Foram considerados nas análises estatísticas subseqüentes apenas os tamanhos do espaço intergênico de *Bacteria* com variação de 50 a 500 pb. O tamanho de cada pico foi expresso em um percentual de unidade de fluorescência relativo a cada amostra. Os dados foram analisados com técnicas multivariadas usando os pacotes do *CANOCO for Windows 4.5* (Biometris) e a medida de distância de *Hellinger* (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001). Um diagrama de Venn (FAUTH et al., 1996) foi elaborado para verificar as intersecções e peculiaridades entre os períodos de cultivo, identificando o número de unidade taxonômicas operacionais (UTO's) únicas e compartilhadas entre os grupos de amostras.

4.3.4 Antibioticoterapia

Com a finalidade de verificar possíveis alterações na estrutura da comunidade bacteriana endofítica e na morfofisiologia de microplantas, diante de antibioticoterapia, soluções de antibióticos foram acrescentadas ao meio de cultura líquido, com metade da concentração de sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (meio de cultivo para manutenção das microplantas). Foram utilizados, em combinações, quatro antibióticos: gentamicina (aminoglicosídeo), ampicilina (β-lactâmico), tetraciclina (tetraciclina) e ciprofloxacina (quinolona). Para todos os tratamentos a concentração final de antibióticos foi de 50 $mg.L^{-1}$. Os tratamentos foram: (I) ausência de antibióticos (controle); (II) ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina; (III) gentamicina, ampicilina e tetraciclina; (IV) gentamicina, ampicilina e ciprofloxacina; (V) gentamicina, ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina. Os explantes foram microplantas selecionadas por apresentarem o mesmo período de subcultivo, mesmo número médio de folhas (3 a 4), comprimento médio de raízes (1,0 a 2,5 cm) e comprimento médio de lâmina foliar (2,0 a 3,5 cm).

4.3.4.1 Análises morfofisiológicas

Após a adição das soluções de antibióticos as microplantas foram mantidas nas mesmas condições de cultivo pré-estabelecidas por até 12 semanas. Cada unidade experimental foi constituída por um tubo de ensaio com uma microplanta. Foram realizadas oito repetições, totalizando 40 unidades experimentais [tratamentos (5) x repetições (8)]. Os parâmetros morfofisiológicos avaliados semanalmente o número de folhas, o comprimento da maior raiz e da maior lâmina foliar. Esses dois últimos parâmetros foram restritos a maior unidade tendo em vista a dificuldade avaliação da microplanta dentro do tubo de ensaio.

4.3.4.1.1 Análises estatísticas

O delineamento experimental adotado para a avaliação dos resultados obtidos no item **4.3.4.1** foi completamente casualizado, com fatorial 5x12 (tratamentos com antibióticos x semanas de avaliação do cultivo *in vitro*). Para a análise estatística os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), ao teste SNK (5%) de separação de médias e análise de regressão.

Para estimar o efeito exclusivo dos tratamentos de antibioticoterapia na morfofisologia vegetal *in vitro* foi utilizada a metodologia de Diferenças das Diferenças (*double difference* - DD) para obtenção do coeficiente de impacto (β) (IMBENS; WOOLDRIDGE, 2009). Essa metodologia permite estimar a diferença nas médias causada pelo efeito dos antibióticos (efeito exógeno), sem a intervenção natural do crescimento das microplantas ao longo do tempo (efeito fixo). Esta estimação pode ser realizada uma vez que os parâmetros avaliados (número de folhas, comprimento da maior raiz e da maior lâmina foliar) antes da intervenção (antibioticoterapia), independem do recebimento do tratamento. Ou seja, a premissa imposta pelo modelo é que sem o tratamento todas as microplantas cresceriam igualmente, uma vez que as mesmas são clones e estão em ambiente controlado de cultivo. Neste caso, o efeito do tratamento sobre os tratados (ATT) compõe o efeito médio do tratamento (ATE). Onde ATT é a diferença entre a média na 12ª semana de avaliação e a média na 1ª semana do grupo tratado (T): $ATT = \left(\overline{Y}_{12}^{T} - \overline{Y}_{1}^{T}\right)$. E ATE é a diferença entre a ATT do grupo tratado (T) e a diferença entre a média na 12ª semana de

avaliação e a média na 1ª semana do grupo controle (C): $ATE = \left(\overline{Y}_{12}^{T} - \overline{Y}_{1}^{T}\right) - \left(\overline{Y}_{12}^{C} - \overline{Y}_{1}^{C}\right)$; onde t12 > t1.

Para análise de regressão utilizando o método DD, o efeito parcial de uma variável explicativa binária (T) sobre qualquer variável dependente de interesse (Y) é chamado de efeito marginal do tratamento. Neste trabalho, o tratamento foi a antibioticoterapia e as variáveis dependentes foram o incremento no número de folhas, no comprimento da maior raiz e da maior lâmina foliar. A partir dessas considerações, a observação de resultados em dois momentos do tempo nos permite utilizar a técnica de diferenças das diferenças para identificar o impacto exclusivo da antibioticoterapia no crescimento das microplantas. Cada tratamento é observado em dois períodos *t* = 12 ou *t* = 1 onde, 12 indica o último período de avaliação do tratamento e 1 o primeiro período.

Supondo que Y_i seja modelado pela seguinte equação:

$$Y_{12} - Y_1 = \alpha + \beta T_i + \gamma t_i + \delta\left(T_i \circ t_i\right) + \varepsilon_i \qquad (1)$$

onde *i* = 1,...,N e N é o número de unidades experimentais; T = 0 ou 1, sendo que 0 indica que a microplanta *i* não recebeu o tratamento (grupo controle) e 1 indica que a microplanta recebeu o tratamento (grupo tratado); $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ são coeficientes não conhecidos e ε erro aleatório não observado, dado por $\varepsilon = 1 - R^2$. Os coeficientes podem ser interpretados como: α = termo constante; β = efeito específico do grupo de tratamento (contabiliza diferenças fixas nos tempo entre o grupo de tratamento e controle); γ = tendência temporal comum aos dois grupos; δ = efeito médio do tratamento (ATE).

Podemos dizer que E[$\hat{\delta}$] = δ , ou seja, que a estimativa do efeito de tratamento não será viesada sob as seguintes hipóteses: (a) a forma funcional (equação 1) foi especificada corretamente; (b) os erros aleatórios têm média zero; (c) termos de erro não são correlacionados com as variáveis do modelo. Esta última também é conhecida como hipótese da tendência paralela. Por tal hipótese a variável Y e as características não observáveis devem seguir a mesma tendência no tempo para o grupo de tratamento e controle, garantindo que a diferença entre os dois grupos esteja refletindo somente o efeito marginal do tratamento.

4.3.4.1.2 Análises anatômicas

A técnica de microscopia de luz foi aplicada para verificar possíveis alterações anatômicas e bioquímicas em microplantas submetidas à antibioticoterapia. As análises histológicas e histoquímicas da raízes e as análises histológicas da folha foram realizadas por meio de secções transversais de material fresco, confeccionadas a mão livre com auxilio de lâminas de aço. As amostras da parte aérea foram retiradas da região mediana da lâmina foliar localizada no primeiro nó expandido (do ápice para base) e as amostras do sistema radicular foram retiradas da região mediana-apical de raízes adventícias externas de pelo menos três microplantas da cada tratamento.

As análises histoquímicas foram realizadas 24 h, 48 h, e 10 dias após a adição das soluções de antibióticos, sendo que essa última avaliação coincidiu com o momento de extração do DNA genômico total das microplantas. Foram efetuados testes histoquímicos de colorações específicas segundo o componente celular a ser identificado. Para a identificação de lipídios, foi empregado Sudan Black B (PEARSE, 1968); para amido, reagente de Lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e os compostos fenólicos foram identificados pela solução aquosa de cloreto férrico (JOHHANSEN, 1940). Após a coloração, os materiais foram montados em lâminas semi-permanentes. Para a comparação dos resultados foram utilizados controles. O branco (material sem aplicação de corantes ou reagentes) foi utilizado para determinação de possível pigmentação natural de compostos que poderiam interferir na coloração com os reagentes. Para as análises histológicas, realizadas 10 e 30 dias após a adição das soluções de antibióticos, as secções foram submetidas ao processo de dupla coloração com fucsina básica (0,125%) e azul de astra (1%) (ROESER,1962) para detecção de lignina e celulose, respectivamente, sem o processo de clarificação prévia. As lâminas foram montadas em glicerina 50% e as imagens foram obtidas em microscópio de luz (Zeiss-Jenemed 2) acoplado a um sistema de captura de imagens (Sansung, SDC-313) com as respectivas escalas na mesma proporção.

4.3.4.2 PCR-DGGE

Aos 10 dias de cultivo após a adição das soluções de antibióticos foi feita a coleta de material para a extração de DNA genômico total e, subsequentemente, PCRs do gene 16S rRNA de *Bacteria* (PCR-DGGE). Para análise da comunidade bacteriana endofítica total por PCR-DGGE e para evitar a interferência de DNA proveniente de cloroplastos vegetais, novamente procedeu-se a reação com os *primers* 799f (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e R1492 (HEUER et al., 1997) (Tabela 1). Para essa avaliação, além de serem consideradas as classes de α e β-proteobactérias, e actinobactérias, também foram acessadas a classe de γ-proteobactérias e o grupo de cianobactérias. Para esses últimos, foram realizadas PCRs iniciais com *primers* seletivos: Gamma395f e CYA361f, respectivamente, e combinados com o *primer* R1378 (HEUER et al., 1997; MÜHLING et al., 2008). Os produtos amplificados foram utilizados como DNA molde (~20 ng), separadamente, em uma seguinte reação de PCR, com os *primers* F984GC e R1378 (Tabela 1). Todas as reações de PCR-DGGE foram preparadas sob as mesmas condições apresentadas no item **4.3.2.1** e o DGGE foi realizado como descrito no item **4.3.2.2**.

4.3.4.3 Clonagem e sequenciamento de bandas de DGGE

A partir dos padrões obtidos, algumas bandas de interesse foram excisadas dos géis de DGGE, o DNA difundido foi usado como molde em PCR com os *primers* F984 e R1378 (HEUER et al., 1997) e os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose e quantificados em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific). Em seguida, os produtos foram purificados com o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences), verificados novamente em gel de agarose 1% e clonados no plasmídeo *pGEM-T Easy Vector* (Promega). Após transformação em células quimiocompententes de *Escherichia coli* (DH-10β), clones foram aleatoriamente selecionados, crescidos em meio LB (*Difco™ Luria Broth Base, Miller*). Posteriormente o DNA plasmidial foi extraído, analisado em gel de agarose 1% e utilizado como molde em reações de PCR com os *primers* do vetor M13F (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') e M13R (5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3') (conforme descrito no item **4.3.2.3**). Os produtos resultantes da amplificação foram precipitados com solução de acetato de sódio/EDTA e etanol absoluto (descrição da metodologia no item **4.2.1**). Após a precipitação as amostras foram submetidas ao sequenciamento, utilizando o pacote

de programas Phred/Phrap/Consed (detalhes no item **4.2.1**). As seqüências consenso foram comparadas por similaridade com seqüências de nucleotídeos disponibilizadas no banco de dados do *Ribossomal Database Project II* (RDP II) versão 10 (http://rdp.cme.msu.edu/), alinhadas utilizando o programa *Clustal X2.0* (THOMPSON et al., 1997; LARKIN et al., 2007) e editadas com o programa *CLC Sequence Viewer 6.1* (http://www.clcbio.com). Foram construídos agrupamentos filogenéticos no programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) baseado na estimativa de distância calculada pelo método de *Jukes-Cantor* (JUKES; CANTOR, 1969) a partir de 1000 repetições *bootstrap*.

4.3.4.4 Análise ultraestrutural

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi aplicada para verificar possíveis alterações ultraestruturais em microplantas submetidas à antibioticoterapia. Amostras da região mediana da lâmina foliar do primeiro nó expandido e amostras do sistema radicular da região mediana-apical de raízes adventícias externas foram retirados de microplantas, 10 dias após a adição das soluções de antibióticos. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (1965) modificada (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, $CaCl_2$ 0,001M). Após a fixação as amostras foram lavadas três vezes por 5 min com tampão cacodilato de sódio 0.05M, e deixadas em glicerina 30% (em tampão cacodilato) por 2 h. Em seguida as amostras foram criofraturadas com nitrogênio líquido, desidratadas em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100 %) e pela técnica do ponto crítico de CO_2, em aparelho Balzers CPD 030. As amostras foram aderidas, com fita dupla face de carbono, a um suporte adequado (*stubs)* e submetidas ao recobrimento com ouro-paládio em metalizador BAL-TEC SCD 050 por 3 min. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS, DSM 940 A), utilizando-se 80 μA de amperagem e 15 kV de voltagem no laboratório do Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA/ESALQ/USP).

5 RESULTADOS

Uma representação esquemática com um resumo dos principais resultados obtidos pode ser visualizada na Figura 7.

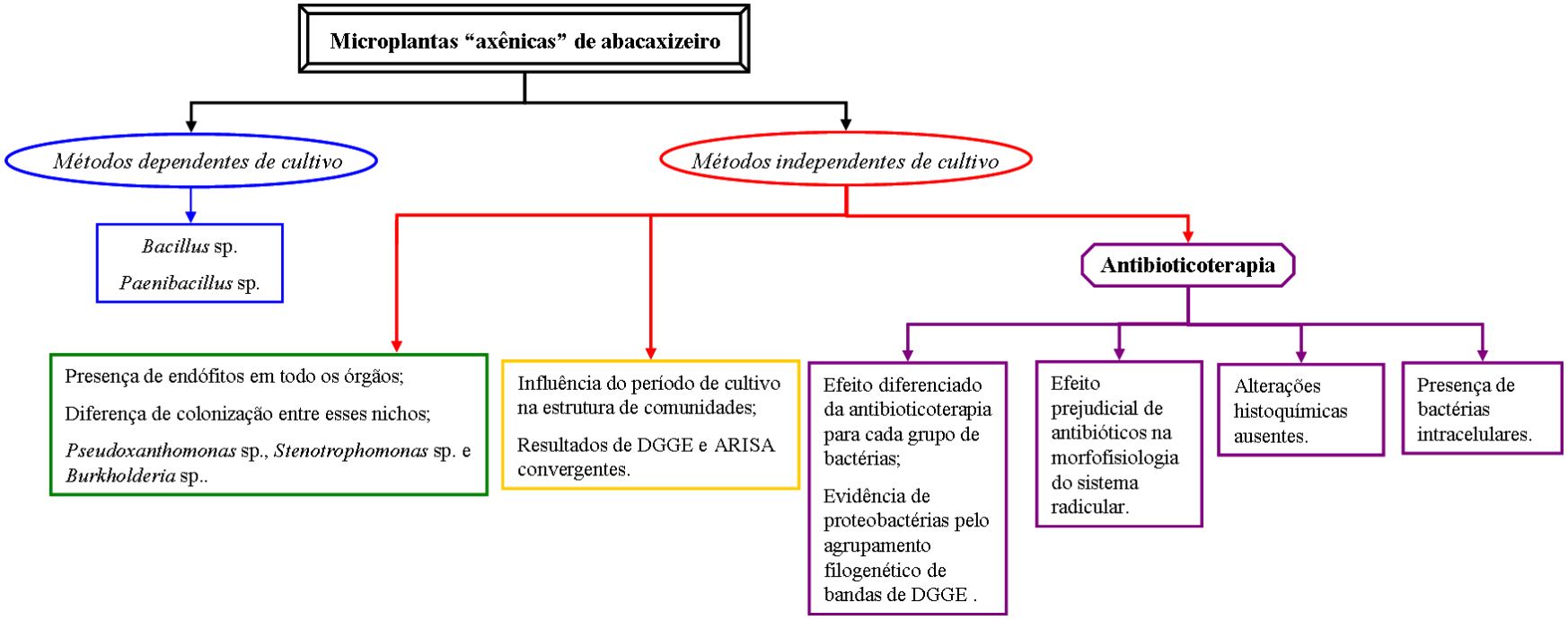

Figura 7 – Diagrama explicativo com os principais resultados obtidos e temas abordados na discussão deste trabalho

5.1 Métodos dependentes de cultivo

5.1.1 Isolamento de bactérias endofíticas

No isolamento de bactérias endofíticas foi possível observar, na segunda semana de avaliações, o crescimento de colônias bacterianas em duas unidades experimentais: a primeira continha tecido radicular fragmentado e inoculado em meio LB, e a outra continha tecido radicular triturado e inoculado em meio TSB (Figura 8). O crescimento dessas colônias foi limitado, ocupando área restrita ao tecido vegetal, e em apenas alguns explantes na placa de Petri. As seqüências de nucleotídeos obtida a partir dessas colônias, provenientes do meio LB e TSB, apresentaram alta similaridade (97 a 100%) com seqüências de *Bacillus pumillus* e *Paenibacillus* sp., respectivamente.

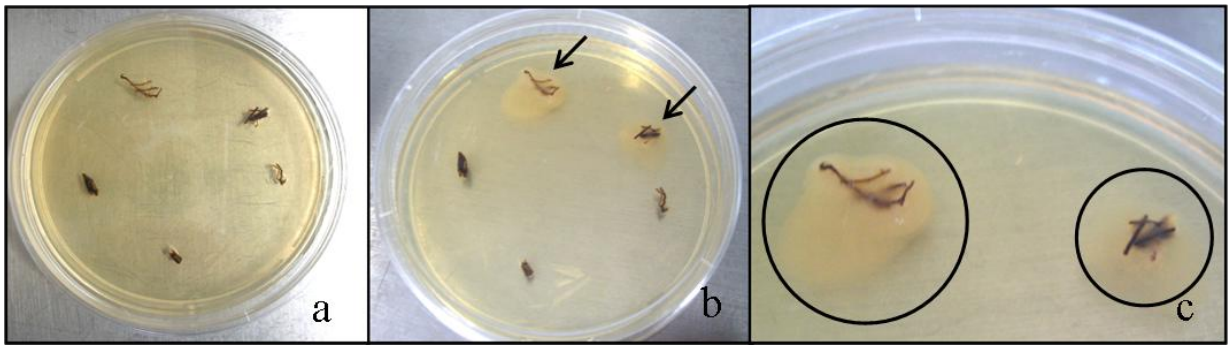

Figura 8 – Fragmentos de raízes provenientes de microplantas assintomáticas de abacaxizeiros, inoculados em meio de cultura LB, no primeiro dia de incubação (a) e encobertos por colônias bacterianas após duas semanas de incubação (b). Detalhe das colônias (c)

5.2 Métodos independentes de cultivo

5.2.1 Avaliação da comunidade bacteriana endofítica em raízes, folhas jovens e adultas

Os dados apresentados neste item foram publicados em Abreu-Tarazi et al. (2010). O DNA extraído em quadruplicata para raízes (R), folhas jovens (FJ) e folhas adultas (FA) apresentou alto rendimento e qualidade, quando comparado ao padrão molecular, permitindo o prosseguimento às análises moleculares previstas. Os produtos amplificados da PCR com os *primers* 799f e R1492 geraram, como esperado, dois fragmentos: um produto de aproximadamente 750 pb (16S rRNA bacteriano) e outro de aproximadamente 1100 pb (16S rRNA cloroplastidial) (Figura 9). Dessa forma, confirmou-se a presença de DNA bacteriano, proveniente da comunidade endofítica.

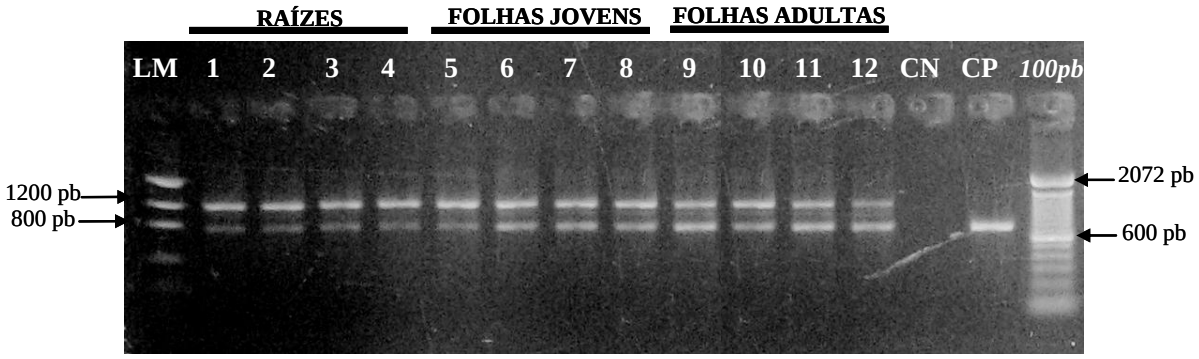

Figura 9 – Resultado da amplificação do gene 16S rRNA a partir do DNA total de amostras de raízes, folhas jovens e adultas provenientes de microplantas assintomáticas de abacaxizeiros. Perfil eletroforético em gel de agarose. LM – *Low Mass DNA Ladder*; CN – controle negativo; CP – controle positivo

A PCR-DGGE revelou que comunidades bacterianas endofíticas colonizam todos os órgãos vegetais analisados (raízes, folhas jovens e folhas adultas). Os agrupamentos hierárquicos gerados a partir dos perfis de DGGE grupo-específico evidenciaram diferenças nas estruturas das comunidades de actinobactérias, α e β-proteobactérias nos diferentes órgãos (Figuras 10a, 10c, 10e e 10g). Os dendrogramas revelaram bandas comuns e específicas em cada grupo de amostras e a especificidade e o compartilhamento dessas bandas (espécies) ficaram evidentes nos diagramas de Venn (Figuras 10b, 10d, 10f e 10h).

Independentemente da comunidade analisada, as inúmeras bandas nos perfis de DGGE exibiram um padrão de composição variável, especialmente em amostras de folhas. A riqueza de

bandas foi sempre superior em amostras de folhas (jovens e adultas), exibindo padrões mais complexos do que em amostras de raízes. A similaridade entre os perfis de DGGE da comunidade bacteriana total, de α-proteobactérias e actinobactérias entre folhas jovens e adultas foi maior que quando comparados aos de raízes (Figuras 10a, 10c e 10e). Apesar dessa similaridade, foram notadas diferenças entre os padrões de folhas jovens e os de folhas adultas. Em relação à comunidade de β-proteobactérias foi evidente uma maior semelhança entre as amostras de raízes e de folhas jovens (Figura 10g).

As análises das seqüências das bandas 1-3 (Figura 10a) foram similares a seqüências de organismos cultiváveis e não cultiváveis. A banda nº1 apresentou maior similaridade a uma γ-proteobactéria não cultivável (*Pseudoxanthomonas* sp.), a banda nº 2 a uma γ-proteobactéria cultivável (*Stenotrophomonas* sp.), e a banda nº 3 a uma β-proteobactéria cultivável (*Burkholderia* sp.). Essas seqüências apresentaram uma similaridade variando de 96 a 100%.

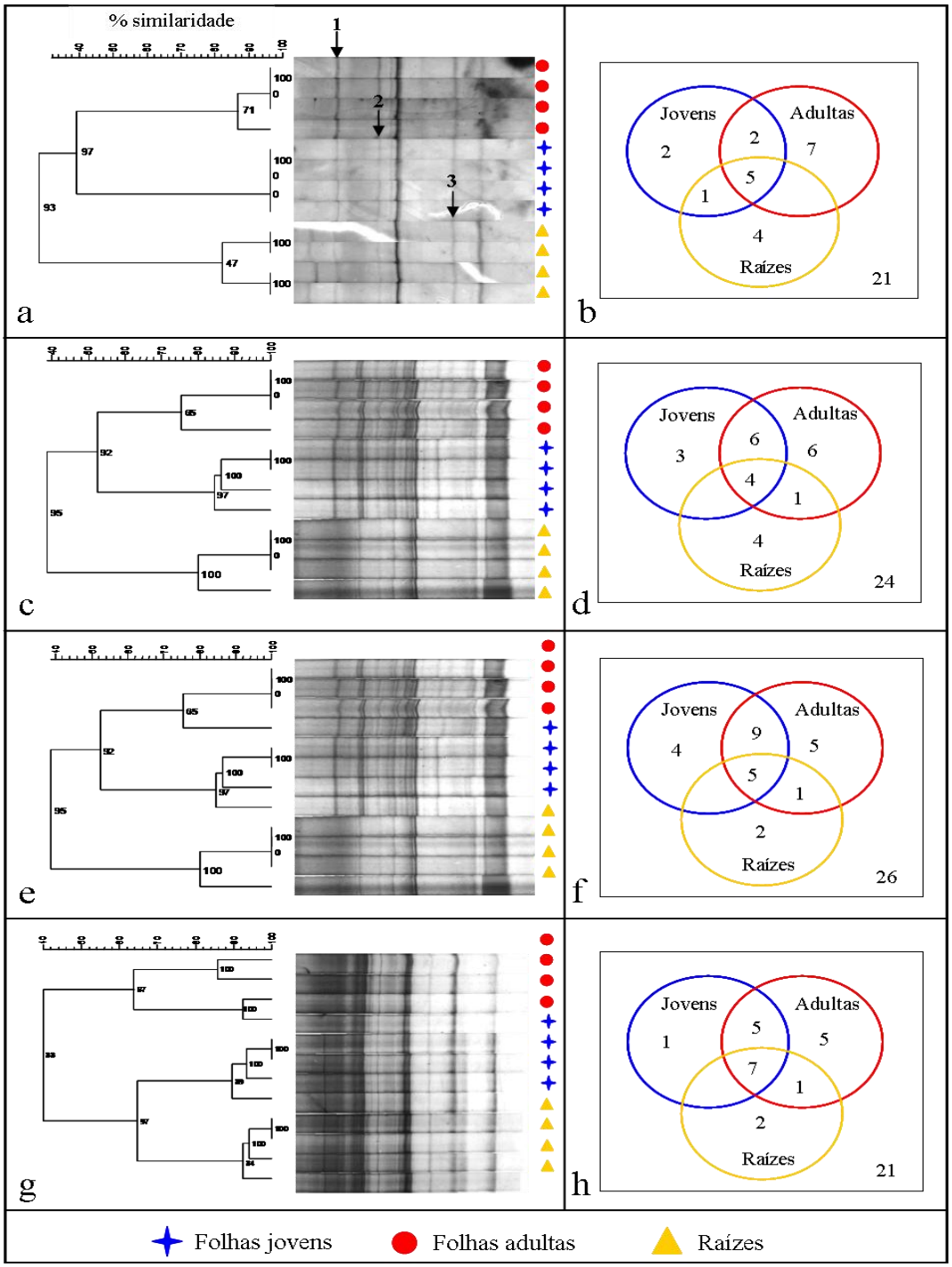

Figura 10 - Agrupamento hierárquico dos perfis de DGGE da comunidade bacteriana total (a), actinobactérias (c), *α*-proteobactérias (e) e *β*-proteobactérias (g) realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson. Os valores nos ramos indicam a correlação cofenética do agrupamento das amostras. Os diagramas de Venn (b, d, f e h) mostram a riqueza de bandas detectadas pelos perfis de DGGE de amostras de raízes, folhas jovens e folhas adultas de microplantas de abacaxizeiro. As setas correspondem à identificação das bandas excisadas do gel

5.2.2 Avaliação da comunidade bacteriana endofítica em microplantas sob diferentes períodos de cultivo

A PCR-DGGE revelou a presença de bactérias endofíticas em todas as microplantas independentemente do período de cultivo, sendo que a partir do agrupamento hierárquico foi possível verificar diferenças nas estruturas das comunidades bacterianas de acordo com esses períodos (Figura 11a). Houve a formação de três agrupamentos principais que separaram cada um dos períodos, sendo que as comunidades presentes nas amostras de microplantas com uma semana (S1) e com quatro meses (M4) de cultivo apresentaram suas estruturas mais similares entre si do que quando comparadas às de microplantas com oito meses (M8) (Figura 11a).

A nítida diferenciação da comunidade bacteriana endofítica em cada período de cultivo também é expressa na PCA, a qual foi realizada com o mesmo conjunto de dados usado na classificação hierárquica (Figura 11b). A PCA permitiu a distribuição dos perfis das comunidades ao longo de eixos de ordenação com base na presença e ausência de bandas detectadas por DGGE, e os valores percentuais associados a cada eixo da ordenação (X, Y) informaram a explicabilidade desses eixos ao longo das mudanças percebidas nas estruturas de comunidades dentro do espaço de ordenação. Conjuntamente, os dois eixos plotados em cada ordenação apresentada explicaram 100% da distribuição dos dados.

O diagrama de Venn evidenciou a especificidade e o compartilhamento de bandas (espécies) de cada grupo de amostras (Figura 11c). Assim como o agrupamento hierárquico, a análise de PCA também exibiu uma clara separação entre cada um dos períodos de cultivo. Entretanto, apenas com o diagrama de Venn foi possível observar de forma nítida um grande número de espécies (27) sendo compartilhadas entre os três períodos. Esse compartilhamento representou mais de 25% de todas as espécies separadas (detectadas) em DGGE. O número de espécies foi maior nos perfis de microplantas S1, seguidos por M4 e M8. Essas últimas, por sua vez, apresentaram apenas duas espécies exclusivas, representando menos de 3% do total. Houve um maior compartilhamento, de 11 espécies entre S1 e M4 (≅15%) e um compartilhamento numericamente igual (6, ≅9%) entre microplantas S1 e as M8 e entre as M4 e M8 (Figura 11c).

Uma análise visual preliminar dos eletroferogramas gerados nas análises de ARISA (Figura 11d) evidenciou uma diferença nas estruturas das comunidades bacterianas entre os diferentes períodos de cultivo *in vitro*, corroborando com os resultados de DGGE. Foi possível

notar a presença de picos que estão presentes no eletroferograma apenas de um grupo de amostras e que não estão presentes em outras, evidenciando UTO's exclusivas em cada período de cultivo. No eletroferograma de amostras de microplantas M8 o número de UTO´s detectadas foi notadamente menor do que para as S1 e M4 (Figura 11d).

De modo geral, a PCA realizada com os dados de ARISA revelou diferenças estruturais na composição de comunidades bacterianas nos diferentes períodos de cultivo *in vitro*, porém quando comparadas àquelas feitas a partir dos dados de DGGE, as amostras foram plotadas de forma mais dispersa, mesmo que ainda tenha sido possível verificar uma maior similaridade entre as amostras de microplantas S1 e M4, formando um agrupamento diferente daquele das amostras de microplantas M8 (Figura 11e).

O diagrama de Venn construído para verificar as intersecções e peculiaridades entre os dados de ARISA, identificou o número de UTO's exclusivas e compartilhadas entre cada grupo de amostras. As amostras que apresentaram maior riqueza de UTO´s foram as de microplantas S1 (67, ≅22%). Mais uma vez, seguindo o padrão de respostas das análises de DGGE, a similaridade entre as amostras de microplantas S1 e M4 prevaleceu quando comparadas as de M8, as quais apresentaram um menor número de UTO´s exclusivas (12, ≅4%) (Figura 11f).

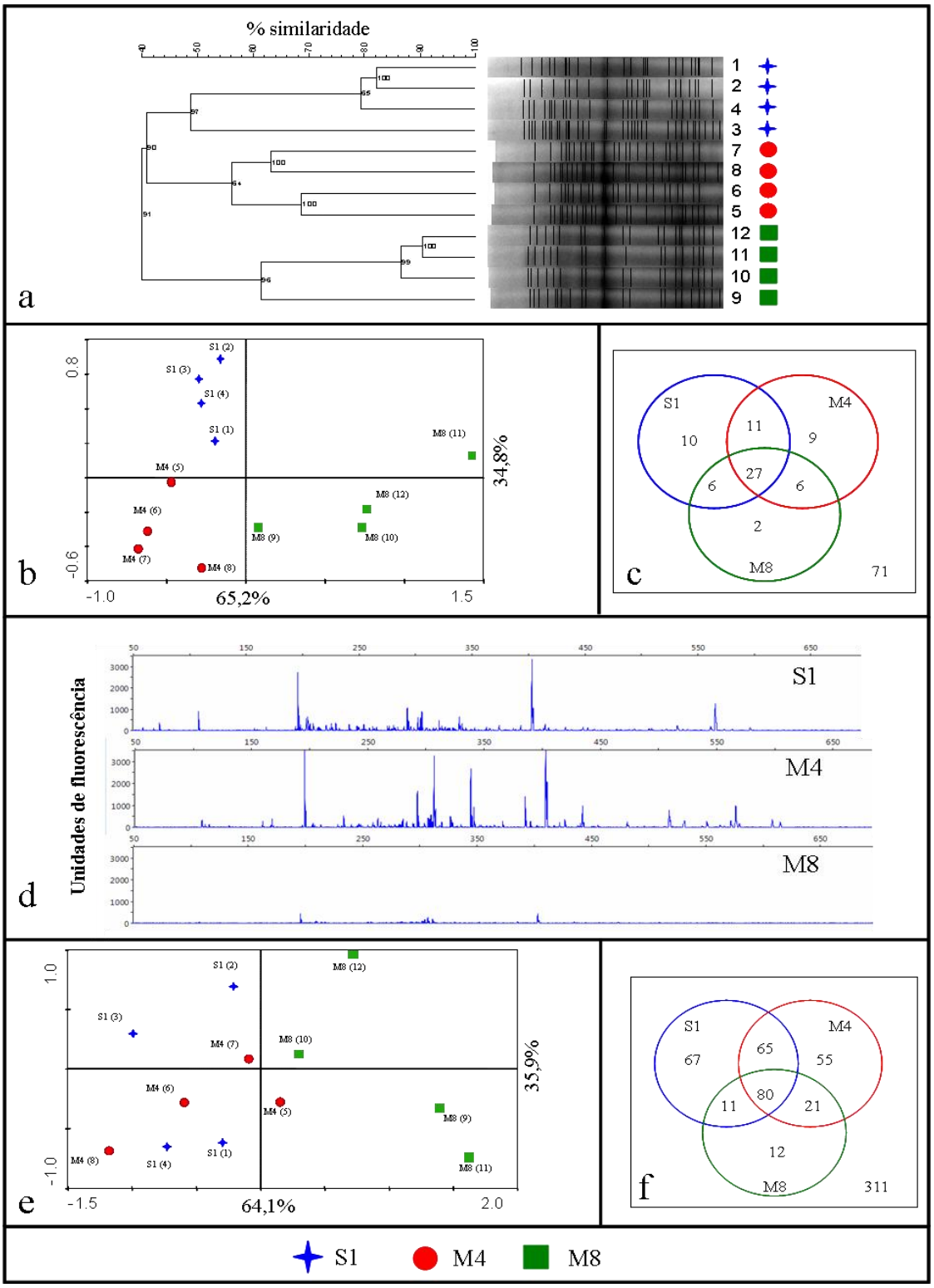

Figura 11 - Agrupamento hierárquico (a) da comunidade bacteriana total, realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson, análise dos componentes principais (b) e diagrama de Venn (c) baseados nos perfis de bandas de DGGE. Eletroferogramas das comunidades bacterianas (d), análise dos componentes principais (e) e diagrama de Venn (f) e baseados nas análises de ARISA em amostras de microplantas de abacaxizeiro com uma semana (S1), quatro meses (M4) e oito meses (M8) de cultivo. Os números de 1 a 12 indicam as replicatas

5.2.3 Antibioticoterapia

A ANOVA dos efeitos da antibioticoterapia e período de cultivo na morfofisiologia foi significativa para os três parâmetros avaliados. Apenas para o parâmetro comprimento de raiz houve interação significativa entre os fatores (antibioticoterapia e período de cultivo) (Tabela 3). Com base no teste de separação de médias o tratamento I (ausência de antibióticos) teve influencia positiva e significativa para o comprimento de raiz. Os tratamentos IV (gentamicina, ampicilina e ciprofloxacina) e V (gentamicina, ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina) foram os que mais afetaram negativamente o crescimento de raízes (Tabela 4). Para o número de folhas o tratamento III (gentamicina, ampicilina e tetraciclina) foi o que apresentou a maior média, porém sem diferença significativa dos tratamentos I e II (ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina). Enquanto que para o comprimento de lâmina foliar o tratamento IV foi o que resultou na maior média, sem diferença significativa dos tratamentos II e IV. O efeito do tratamento III destaca-se por ter apresentado a maior média para o comprimento de lâmina foliar e, opostamente, a menor média para comprimento de raiz e número de folhas (Tabela 4).

As análises pelo método DD indicaram que o ATE apresentou os maiores valores para comprimento da maior raiz, quando comparados com os valores para número de folhas e comprimento da maior lâmina foliar (Tabela 5). Esses valores indicam que a antibioticoterapia influenciou negativamente o crescimento de raízes, dados confirmados pela análise de regressão pelo método DD que revelou que os coeficientes de impacto foram estatisticamente significativos e negativos para esse parâmetro. Por outro lado, os demais parâmetros, não foram significativos apresentando valores de *p* elevados (Tabela 6). Ou seja, a ação dos antibióticos teve efeito prejudicial no crescimento de raízes, independentemente do tratamento e as alterações observadas no número de folhas e no comprimento de lâmina foliar estavam relacionadas com o efeito do tempo de cultivo, e não com o efeito da antibioticoterapia nas microplantas.

Tabela 3 – Análise de variância (ANOVA) para os efeitos da antibioticoterapia e período de cultivo na morfogênese vegetal *in vitro* avaliada por meio das medidas de comprimento de raiz, número de folhas e comprimento de lâmina foliar de microplantas de abacaxizeiro

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	P-valor
		Comprimento de raiz (cm)			
Antibioticoterapia	4,00	246,50	61,63	98,81	0,00
Período de cultivo	11,00	111,30	10,12	16,22	0,00
Interação de Antibioticoterapia por Período de cultivo	44,00	113,90	2,59	4,15	0,00
Erro	420,00	261,96	0,62		
Total	479,00	733,66			
		Número de folhas			
Antibioticoterapia	4,00	74,00	18,60	21,00	0,00
Período de cultivo	11,00	1047,00	95,20	107,20	0,00
Interação de Antibioticoterapia por Período de cultivo	44,00	42,00	0,95	1,10	0,35
Erro	420,00	372,87	0,89		
Total	479,00	1535,87			
		Comprimento de lâmina foliar (cm)			
Antibioticoterapia	4,00	41,00	10,20	10,90	0,00
Período de cultivo	11,00	3006,00	273,20	290,90	0,00
Interação de Antibioticoterapia por Período de cultivo	44,00	35,00	0,80	0,80	0,76
Erro	420,00	394,50	0,94		
Total	479,00	3476,50			

Nota: GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de F da análise da variância; 0,00 = dado numérico igual a zero resultante de arredondamento de um dado numérico originalmente positivo.

Tabela 4 - Efeito da antibioticoterapia na morfogênese vegetal *in vitro* avaliada por meio das medidas de comprimento de raiz, número de folhas e comprimento de lâmina foliar de microplantas de abacaxizeiro

Tratamento	Comprimento de raiz (cm)	Número de folhas	Comprimento de lâmina foliar (cm)
(I) ausência de antibióticos (controle)	3,58 ± 1,83 a*	5,43 ± 1,78 a	6,54 ± 2,99 b
(II) ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina	2,33 ± 0,81 b	5,70 ± 1,68 a	6,98 ± 2,78 a
(III) gentamicina, ampicilina e tetraciclina	2,25 ± 0,78 b	5,61 ± 2,21 a	6,89 ± 2,40 a
(IV) gentamicina, ampicilina e ciprofloxacina	1,54 ± 0,42 c	4,73 ± 1,55 b	7,22 ± 2,82 a
(V) gentamicina, ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina	1,71 ± 0,57 c	4,88 ± 1,46 ab	6,42 ± 2,40 b

Nota: *Os valores representam médias (± desvio padrão) de oito repetições. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de SNK (P = 0,05).

Tabela 5 – Análise para os efeitos da antibioticoterapia na morfofisiologia vegetal *in vitro* pelo método de Diferenças das Diferenças a partir das medidas de comprimento de raiz, número de folhas e comprimento de lâmina foliar de microplantas de abacaxizeiro

Variável dependente	Médias da 1ª semana de avaliações			Médias da 12ª semana de avaliações			ATT	|ATE|
	Tratamentos	Controle	|C-T|	Tratamentos	Controle	|C-T|		
Comprimento de raiz								
II	1,80*	1,19	0,61	2,76	5,36	2,60	0,97	3,21
III	1,78	1,19	0,59	2,61	5,36	2,75	0,84	3,34
IV	1,30	1,19	0,11	1,75	5,36	3,61	0,45	3,73
V	1,35	1,19	0,16	2,00	5,36	3,36	0,65	3,53
Número de folhas								
II	3,75	3,50	0,25	8,25	8,13	0,12	4,50	0,13
III	3,38	3,50	0,12	9,13	8,13	1,00	5,75	1,13
IV	3,25	3,50	0,25	7,13	8,13	1,00	3,88	0,75
V	3,63	3,50	0,13	7,13	8,13	1,00	3,50	1,13
Comprimento delâmina foliar								
II	3,01	3,10	0,09	11,54	11,16	0,38	8,53	0,47
III	3,23	3,10	0,13	10,81	11,16	0,35	7,59	0,47
IV	3,20	3,10	0,10	11,78	11,16	0,62	8,58	0,52
V	2,98	3,10	0,12	10,51	11,16	0,65	7,54	0,52

Nota: *Os valores representam médias de oito repetições; ATT = efeito médio do tratamento para os tratados; |ATE| = módulo do efeito médio do tratamento; |C-T| = módulo da diferença entre a média do grupo tratado e do controle.

Tabela 6 – Análise de regressão para os efeitos da antibioticoterapia na morfofisiologia vegetal *in vitro* pelo método de Diferenças das Diferenças a partir das medidas de comprimento de raiz, número de folhas e comprimento de lâmina foliar de microplantas de abacaxizeiro

Variável dependente	Coeficiente de impacto (β)	R^2	P-valor
Comprimento de raiz			
Tratamento II	-0,81	0,66	0,00
Tratamento III	-0,84	0,70	0,00
Tratamento IV	-0,87	0,76	0,00
Tratamento V	-0,85	0,73	0,00
Número de folhas			
Tratamento II	-0,05	0,00	0,85
Tratamento III	0,37	0,14	0,16
Tratamento IV	-0,24	0,06	0,37
Tratamento V	-0,38	0,15	0,15
Comprimento de lâmina foliar			
Tratamento II	0,15	0,02	0,59
Tratamento III	-0,21	0,04	0,43
Tratamento IV	0,16	0,03	0,55
Tratamento V	-0,17	0,03	0,53

Nota: 0,00 = dado numérico igual a zero resultante de arredondamento de um dado numérico originalmente positivo.

As fotomicrografias da Figura 12 mostram as análises anatômicas do terço mediano de folhas de microplantas de abacaxizeiro cv. IAC Gomo-de-mel realizadas aos 10 dias após a antibioticoterapia, as análises histológicas não evidenciaram diferenças entre os tratamentos, apresentando epiderme uniestratificada com células justapostas em ambas as superfícies (Figuras 12a e 12b), mesofilo foliar homogêneo no eixo central e na região bordo foliar (Figuras 12a e 12b) caracterizado principalmente pela presença de parênquima clorofiliano, com células arredondadas de paredes delgadas, evidenciadas pela coloração verde dos cloroplastos (Figura 12b). Nas análises histoquímicas do mesofilo realizadas 24 h, 48 h e 10 dias após a antibioticoterapia não foram notadas alterações entre os tratamentos, e revelaram a presença de amido e lipídios, com reação positiva para esses dois compostos nos testes de Lugol e Sudan Black B, respectivamente (Figuras 12c, 12d, 12e e 12f). O amido, corado com Lugol, foi observado em amiloplastos, distribuídos por todo o mesofilo foliar (Figuras 12c e 12d). A reação para detecção de lipídios totais evidenciou a presença desses compostos em células parenquimáticas (Figuras 12e e 12f). As análises histoquímicas não detectaram a presença de compostos fenólicos através do cloreto férrico, o qual em reação positiva revelaria a coloração preta (Figuras 12g e 12h).

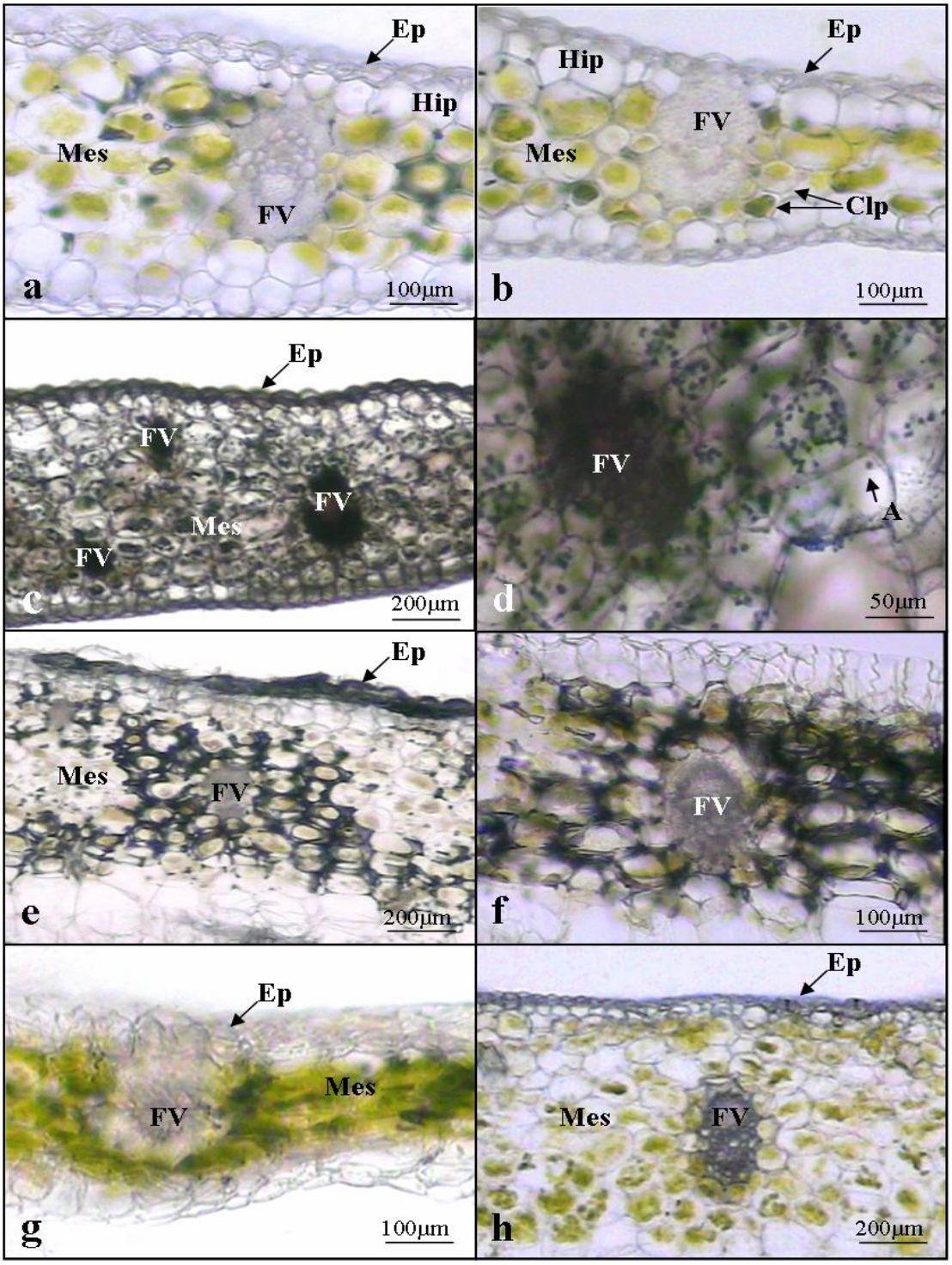

Figura 12 – Fotomicrografias de secções transversais de lâminas foliares de microplantas 10 dias após a antibioticoterapia. Sem corantes (branco) do tratamento I (a), Sem corantes (branco) do tratamento II (b), Lugol (cor preta: amido) no tratamento II (c), Lugol (cor preta: amido) no tratamento III (d), Sudan Black B (cor preta-azulada: lipídeos totais) no tratamento I (e), Sudan Black B (cor preta-azulada: lipídeos totais) no tratamento IV (f), Cloreto férrico no tratamento I (g) e Cloreto férrico no tratamento IV (h). EP = epiderme; Hip = hipodermeFV = feixe vascular; Mes = mesofilo; Clp = cloroplastos; A = amido

O resultados das análises histológicas com raízes de microplantas de abacaxizeiro cv. IAC Gomo-de-mel após 10 dias da antibioticoterapia, da mesma forma que o observado com as folhas, não evidenciaram diferenças entre os tratamentos. As fotomicrografias da Figura 13 mostram as análises anatômicas das raízes dessas microplantas realizadas aos 30 dias após a antibioticoterapia. As imagens do tratamento I (controle) evidenciaram raízes típicas, constituídas de epiderme, córtex e cilindro central (Figuras 13a, 13b e 13c). A epiderme apresentou-se uniestratificada com pêlos radiculares e o córtex com parênquima, esclerênquima, aerênquima e endoderme (Figuras 13a e 13c). O tecido parenquimático apresentou-se compacto, multisseriado, com células de tamanho variado. O anel esclerenquimático possuía de dois a cinco estratos de fibras com paredes celulares espessadas pela deposição de lignina, destacada pela coloração rósea promovida pela ação do corante fucsina (Figura 13c). O aerênquima destacou-se pela presença de grandes espaços intercelulares e, o córtex apresentou-se delimitado internamente por endoderme conspícua, com paredes celulares espessadas por lignina em forma de “U” (Figuras 13b e 13c). O cilindro central constituído por periciclo, sistema vascular e medula. Periciclo uniestratificado com células de paredes delgadas e alongadas longitudinalmente. Sistema vascular poliarco formado por cerca de seis arcos de protoxilema e a região medular formada por células esclereificadas (Figura 13b).

Em relação as imagens dos demais tratamentos destaca-se a total ausência do anel esclerenquimático nos tratamentos II (ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina) e III (gentamicina, ampicilina e tetraciclina) e a redução dos estratos e também da espessura das paredes das células desse mesmo tecido nos tratamentos IV (gentamicina, ampicilina e ciprofloxacina) e V (gentamicina, ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina) (Figuras 13d, 13g, 13j e 13m). Outra grande discrepância foi observada na comparação do diâmetro das raízes, em consequência da redução de estratos do córtex no tratamento V em relação aos demais tratamentos (Figuras 13m, 13n e 13o). Também em relação ao tratamento V foi possível notar o aumento no número de pêlos radiculares (Figura 13m), característica percebida pela diferença no diâmetro a olho nu quando comparadas as raízes dos tratamentos V e I (Figura 14).

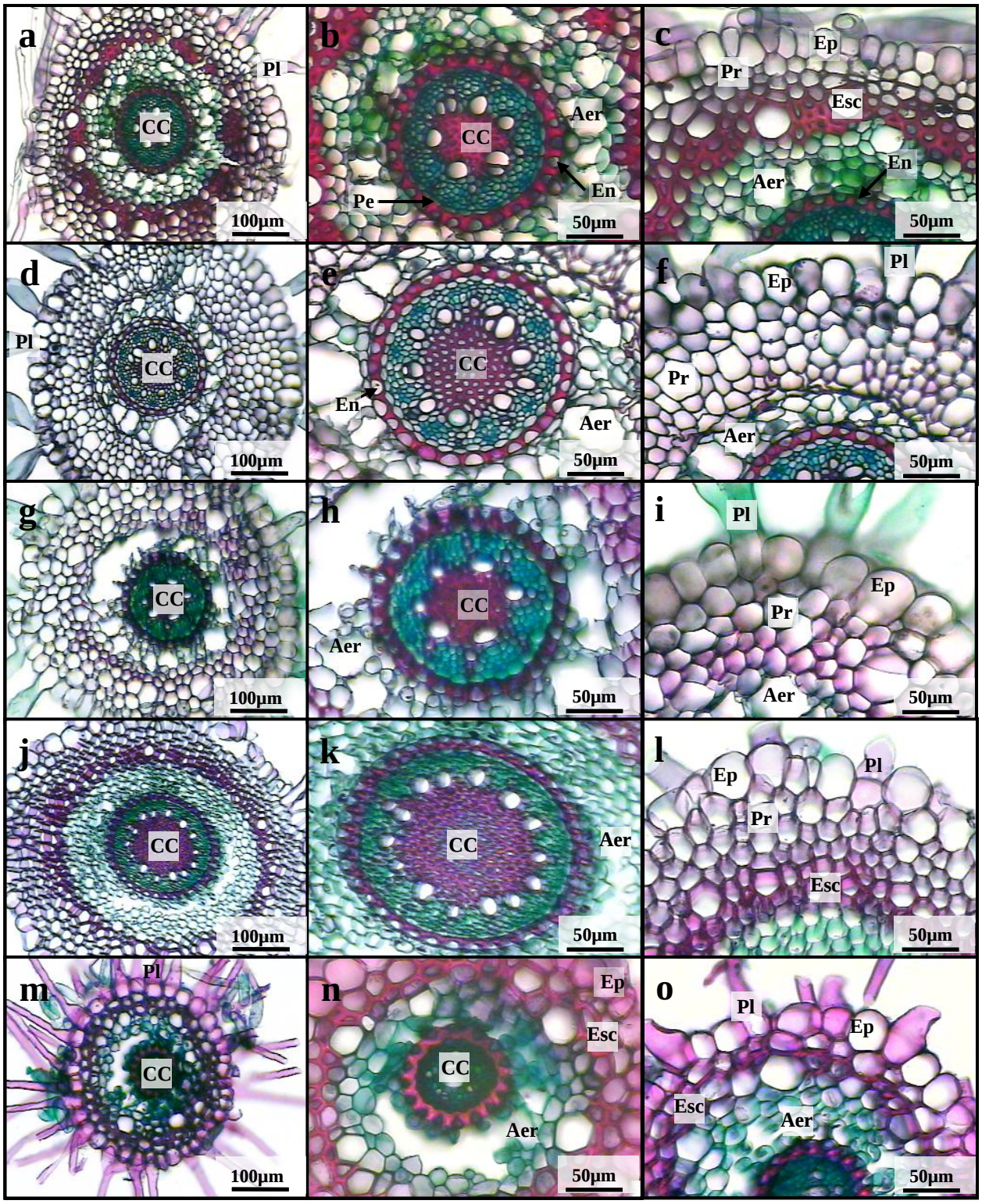

Figura 13 – Fotomicrografias de secções transversais de raízes de microplantas de abacaxizeiro coradas com azul de astra e fucsina, 30 dias após a antibioticoterapia. Tratamento I (a, b, c), II (d, e, f), III (g, h, i), IV (j, k, l), V (m, n, o). Aer = aerênquima; CC = cilindro central; En = endoderme; Ep = epiderme; Esc = esclerênquima; Pe = periciclo; Pl = pêlo radicular; Pr = parênquima

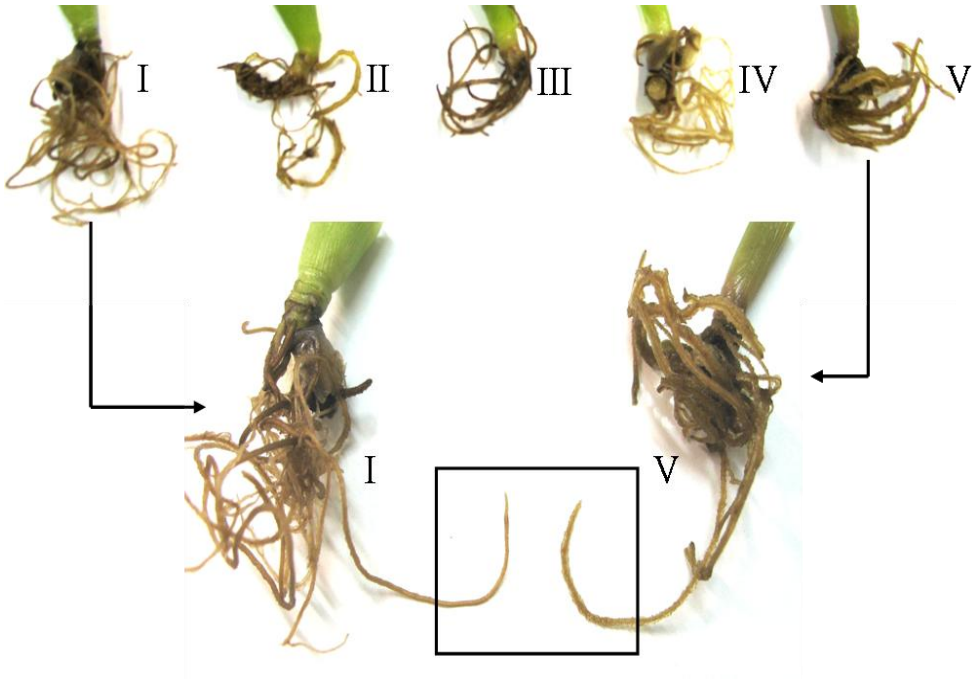

Figura 14 – Aspecto geral do sistema radicular de microplantas de abacaxizeiro 30 dias após antibioticoterapia (tratamentos I, II, III, IV e V). A área retangular destaca a diferença morfológica entre as raízes de microplantas do tratamento V quando comparadas ao tratamento I

A PCA realizada com base nos perfis de bandas de DGGE evidenciou a formação de cinco agrupamentos principais e as amostras dentro de cada agrupamento foram plotadas de forma agregada (Figura 15). A separação pelo efeito da antibioticoterapia ocorreu dentro de cada um desses grupos, destacando a similaridade entre as replicatas. Todavia não foi possível notar um padrão de respostas entre todos os grupos, cada grupo de bactérias revelou uma resposta diferenciada. Houve apenas uma padronização, na qual o tratamento controle (I) sempre apresentou maior similaridade com o tratamento II (Figuras 16 e 17). Nas análises individualizadas de agrupamento hierárquico e PCA para cada grupo de bactérias ficou ainda mais nítida a variação de respostas dos tratamentos. Para actinobactérias, β- e γ-proteobactérias o tratamento III foi o qual formou o agrupamento menos similar, enquanto que para cianobactérias foi o tratamento V e para α-proteobactérias foi o IV (Figuras 16 e 17). As PCAs ratificam essas observações apresentando plotagens de amostras que se agruparam em replicatas e se separaram por tratamentos. Com destaque para a PCA de cianobactérias que apesar de não identificar a similaridade entre os tratamentos I e II como retratado no agrupamento hierárquico, separou

nitidamente os tratamentos com suas replicatas (Figura 16), e para as PCAs de α- e β-proteobactérias nas quais não foi possível distinguir a separação entre os tratamento III, IV e V (Figura 17).

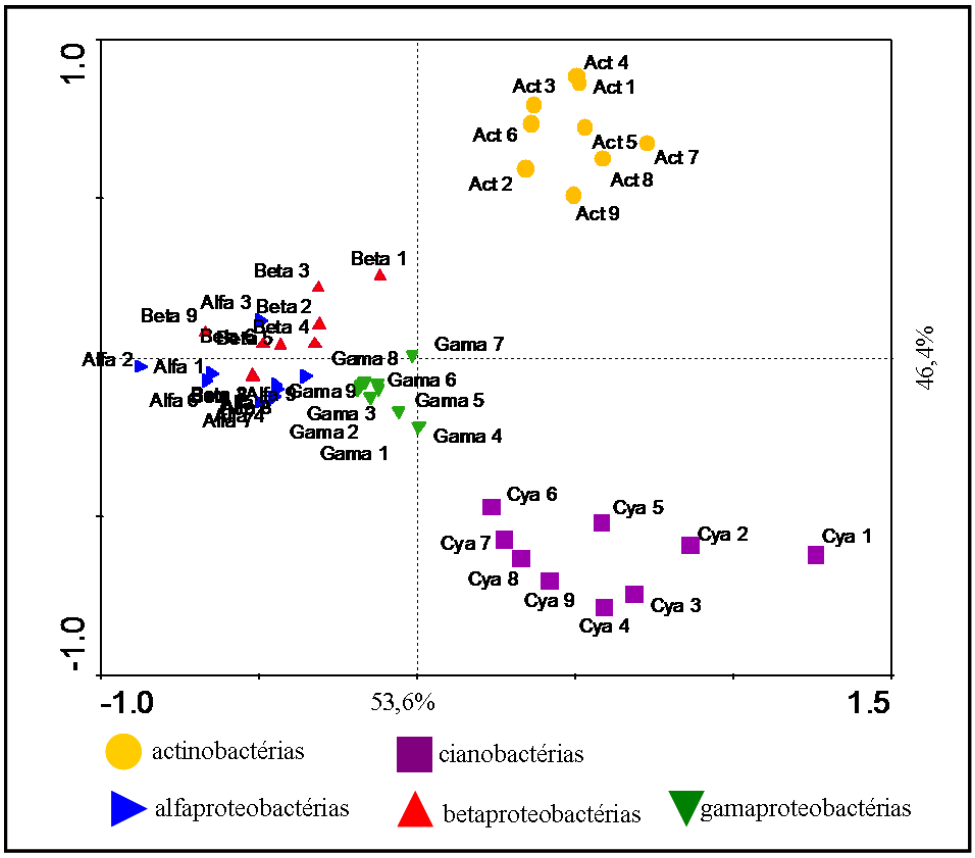

Figura 15 - Análise dos componentes principais (PCA) baseada nos perfis de bandas de DGGE de actinobactérias, cianobactérias, α-proteobactérias, β-proteobactérias e γ-proteobactérias das amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. Os números de 1 a 9 indicam as replicatas

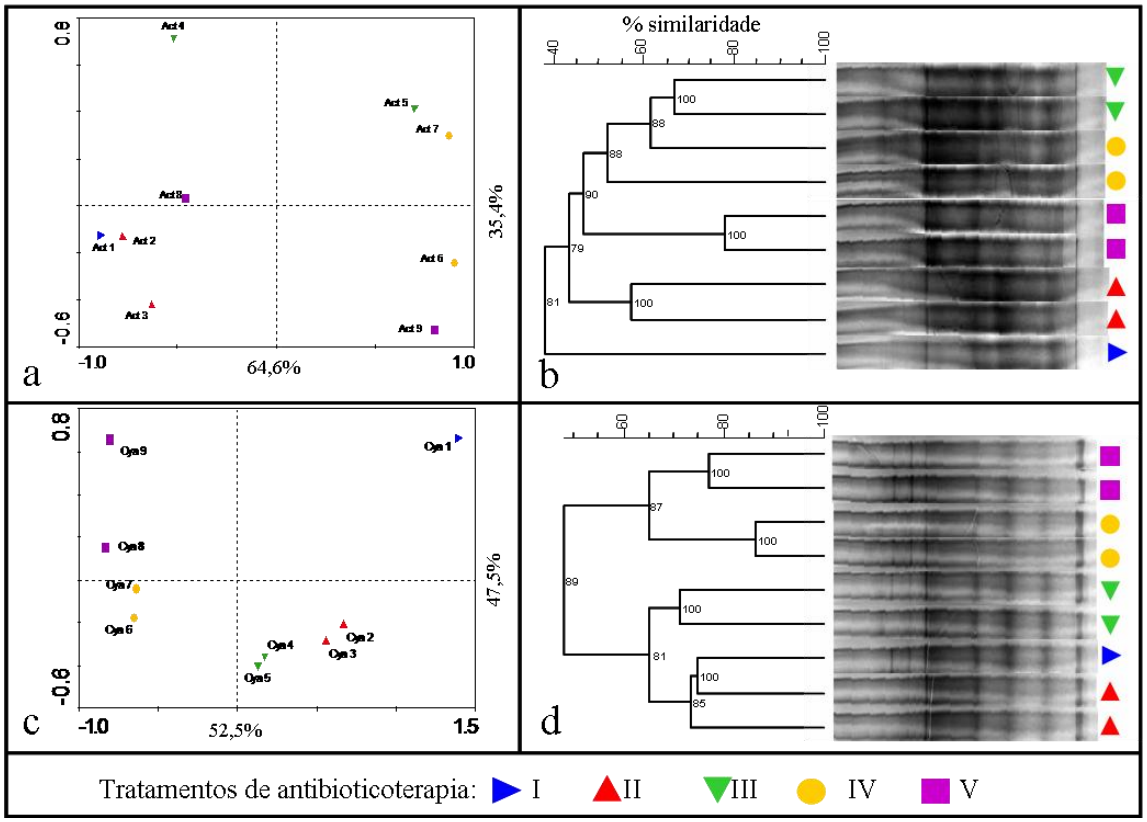

Figura 16 - Análise dos componentes principais (PCA) (a, c) e agrupamento hierárquico (b, d) dos perfis de DGGE de actinobactérias (Act) e cianobactérias (Cya), realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson. Os valores nos ramos indicam a correlação cofenética do agrupamento das amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. Os números de 1 a 9 indicam as replicatas

Quanto à análise baseada no sequenciamento de bandas excisadas de géis de DGGE, foram selecionadas 18 bandas referentes à comunidade bacteriana total visando identificar os filotipos (Figura 18). Foram consideradas seqüências de nucleotídeos obtidas de aproximadamente 12 clones para cada banda excisada. A análise comparativa entre as seqüências obtidas de todos os clones quando comparadas àquelas depositadas no banco de dados *Ribossomal Database Project II* (RDP II) revelou mais de um organismo para cada banda. O organismo de maior ocorrência foi considerado na representação da banda, e apenas a seqüência de um clone (>97% de identidade com a seqüência do organismo de maior ocorrência) foi utilizada na análise de agrupamento filogenético (Figura 19).

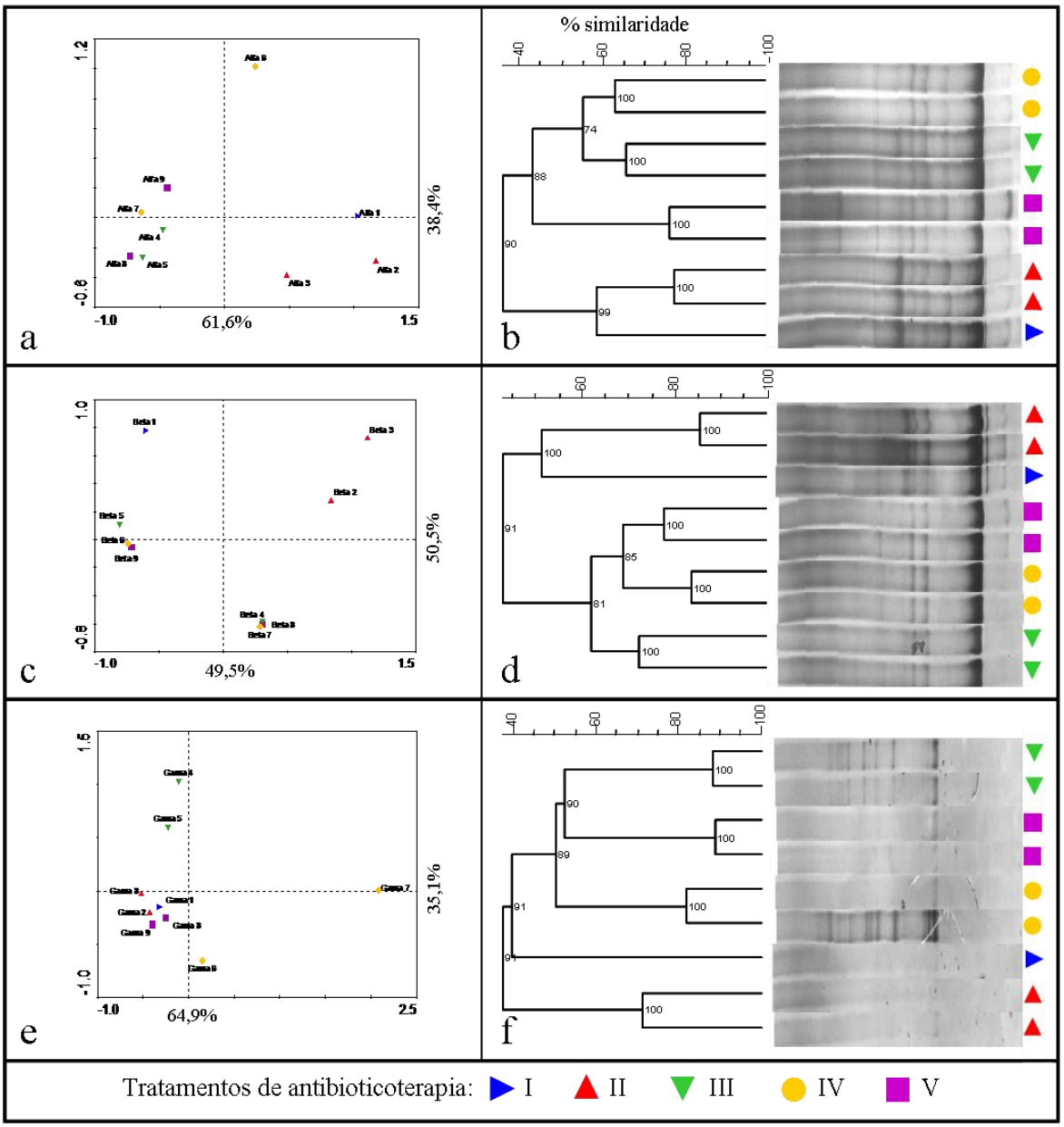

Figura 17 - Análise dos componentes principais (PCA) (a, c, e) e agrupamento hierárquico (b, d, f) dos perfis de DGGE de α-proteobactérias (Alfa), β-proteobactérias (Beta) e γ-proteobactérias (Gama), realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson. Os valores nos ramos indicam a correlação cofenética do agrupamento das amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. Os números de 1 a 9 indicam as replicatas

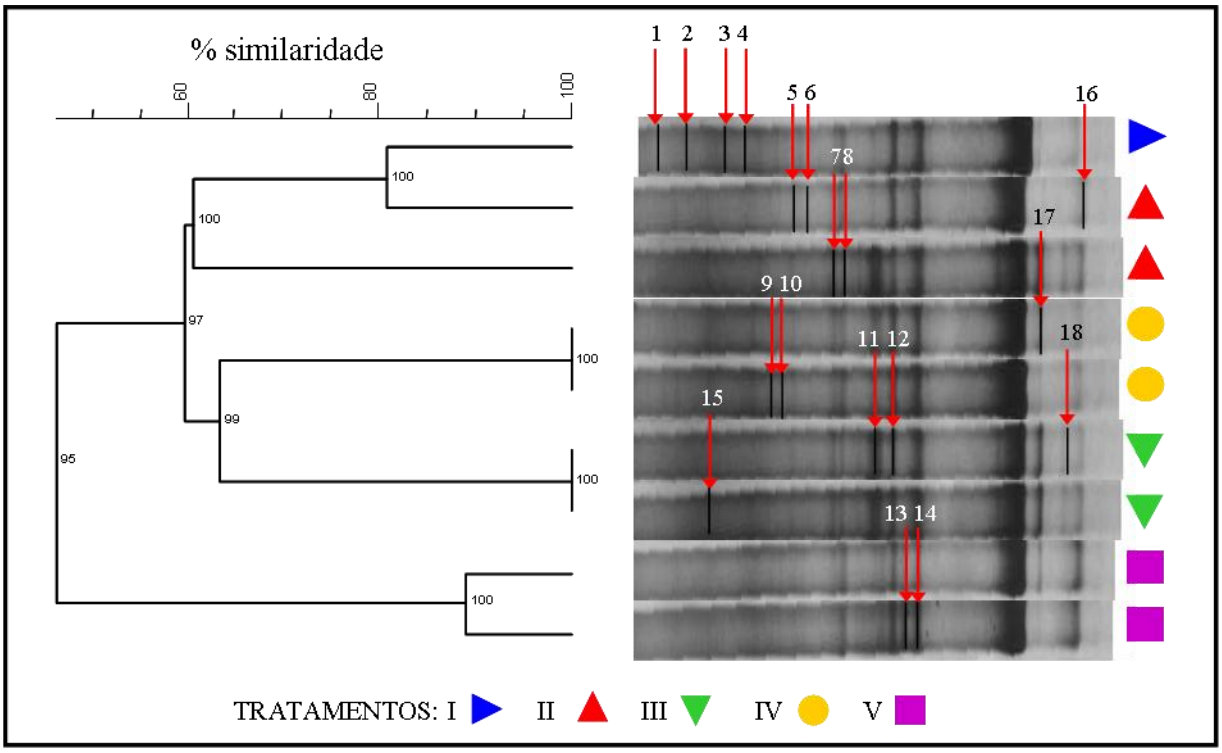

Figura 18 - Agrupamento hierárquico dos perfis de DGGE da comunidade bacteriana total, realizado com o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Pearson. Os valores nos ramos indicam a correlação cofenética do agrupamento das amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. As setas correspondem à identificação das bandas excisadas do gel

Independentemente do posicionamento no gel de DGGE todas as bandas apresentaram similaridade com seqüências de proteobactérias (Figura 19). No agrupamento filogenético a banda 1 mostrou grande similaridade com clones do gênero *Herbaspirilum*, enquanto que as bandas 3 e 4 se apresentaram mais próximas às seqüências de *Burkholderia* e a banda 5 mostrou maior proximidade com o clone de *Massilia*. Por sua vez, as bandas 2, 7, 8 e 10 mostraram proximidade com clones do gênero *Ralstonia*. A banda 6 foi altamente similar com seqüências do gênero *Delftia* e a banda 11 com seqüências de *Hydrogenophaga*. Essas dez bandas formaram um agrupamento diferenciado representando exemplares do grupo das β-proteobactérias. O agrupamento mais próximo foi representado pelas bandas 13 e 15 similares aos clones de *Novosphingobium*, únicos representantes do grupo das α-proteobactérias. Constituindo outro grande agrupamento, a banda 9 se afiliou com clones de *Pseudomonas*, a banda 12 com *Acinetobacter*, as bandas 14 e 17 com *Photorhabdus* e as bandas 16 e 18 com os gêneros *Enterobacter* e *Citrobacter*. Essas seis bandas formaram o agrupamento referente às γ-proteobactérias (Figura 19).

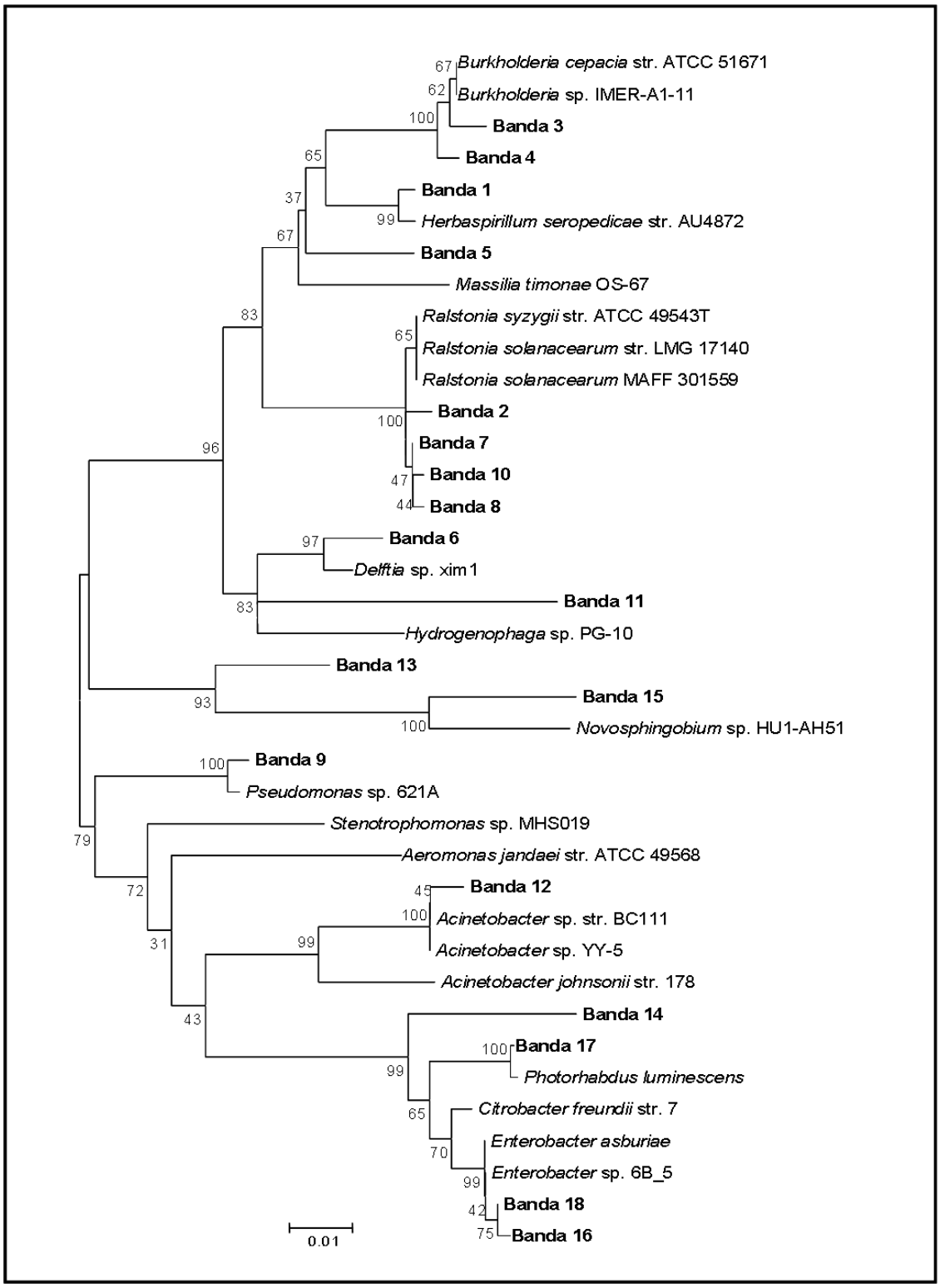

Figura 19 - Agrupamento filogenético mostrando a relação entre alguns isolados bacterianos e bandas excisadas de DGGE de amostras de microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia. O alinhamento das seqüências e a filogenia foram realizados com base na seqüência parcial obtida das bandas, as quais foram comparadas com seqüências do *Ribossomal Database Project II* (RDP II). A escala apresentada indica a divergência entre as seqüências

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitou a observação de regiões colonizadas por bactérias em amostras de lâminas foliares e raízes de microplantas de abacaxizeiro consideradas axênicas (Figura 20). As células bacterianas apresentaram formato de bastonete arredondado e estavam aderidas a superfície interna de células do mesofilo foliar e do córtex de raiz (Figuras 20a, 20e e 20f), de células da bainha do feixe vascular (Figuras 20a e 20b) e de células adjacentes ao feixe vascular em raiz (Figura 20d). A distribuição espacial das bactérias não apresentou padronização, mas foi evidente a existência de biofilme formado por aglomerados bacterianos intracelulares (Figuras 20b, 20c e 20e).

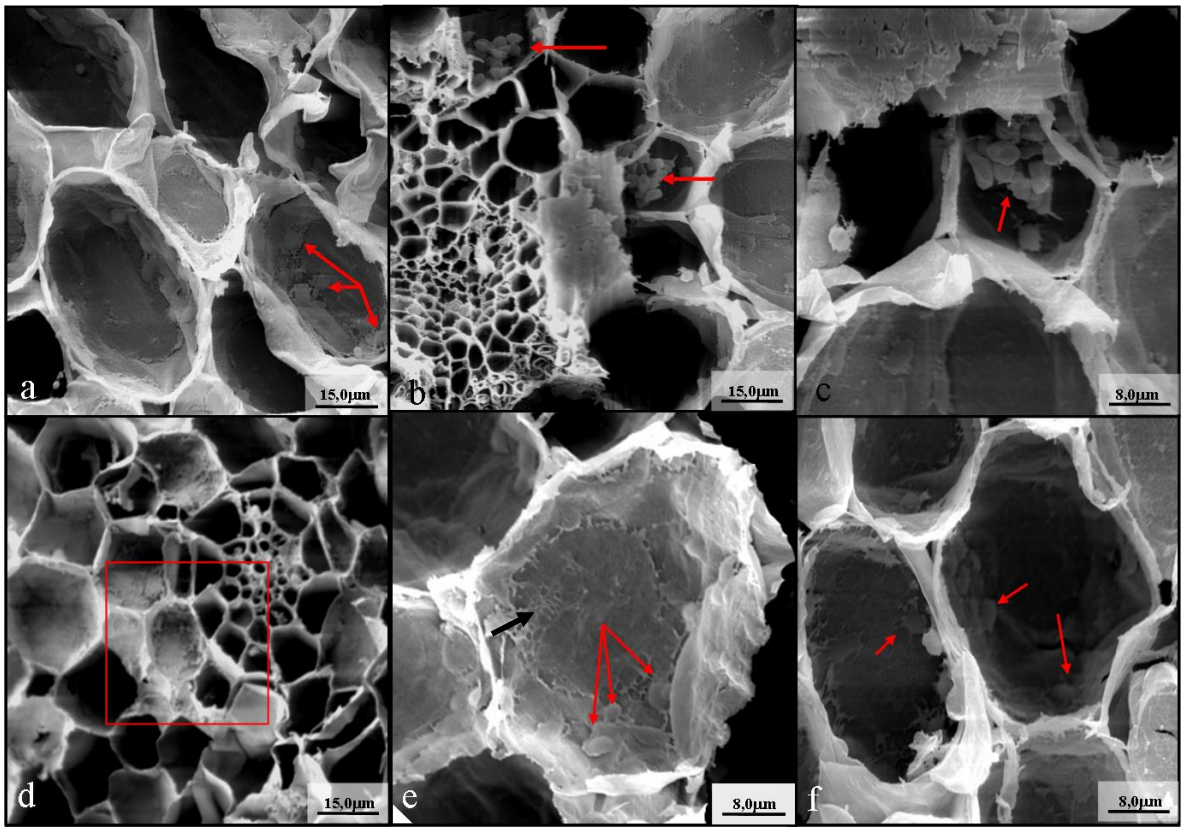

Figura 20 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura de secções transversais de lâminas foliares e de raízes de microplantas de abacaxizeiro consideradas axênicas. Bactérias (setas vermelhas) colonizando internamente células do mesofilo foliar (a) e células da bainha do feixe vascular do mesofilo (b); com destaque para o aglomerado de bactérias em células do mesofilo (c); célula adjacente ao cilindro vascular de raiz (d); destaque de bactérias em células do córtex de raiz (e) e (f). Seta preta evidencia a formação de biofilme intracelularmente

6 DISCUSSÃO

Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, isoladas de tecido radicular de microplantas assintomáticas de abacaxizeiro, são comumente relatadas na literatura como endófitos benéficos, colonizadores de diversas famílias de plantas. Ambos os gêneros são do filo *Firmicutes*, apresentando bactérias Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas. *Bacillus* e *Paenibacillus* são consideradas bactérias promotoras de crescimento e fixadoras de nitrogênio (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000), capazes de induzir resistência sistêmica nos vegetais (JUNG et al., 2006; ONGENA; JACQUES, 2008), com amplo potencial para utilização no controle biológico de fitopatógenos (DONG; ZHANG, 2006). Além disso, são produtoras de antibióticos antifúngicos que demonstraram forte ação inibitória contra fitopatógenos de mandioca, feijão, canola, trigo, dentre outras culturas economicamente importantes (RYAN et al., 2008). Os dois gêneros constituem os endófitos mais abundantes nas coníferas (IZUMI et al., 2008), além de já terem sido isolados de plantas saudáveis e com superfície desinfestadas de várias espécies vegetais incluindo citros (ARAÚJO et al., 2001; LACAVA et al., 2006), feijão (LEE et al., 2005), milho (SOUZA, 2006), algodão (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990), cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2003); soja (BAI et al., 2002), batata (GARBEVA et al., 2003), brássicas (WUELFF; van VUURDES; HOCKENHULL, 2003), café (VEGA et al., 2005), dentre várias outras.

Na cultura de tecidos vegetais já existem relatos de *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp. presentes, de forma persistente e encoberta em plantas mantidas por longos períodos *in vitro*. Thomas (2004a, 2006) conseguiu identificar *Bacillus* spp. provenientes de microplantas de uva e melão, aparentemente axênicas. Enquanto que *Paenibacillus* foi considerado o principal grupo de endofíticos em plantas lenhosas mantidas *in vitro* (ULRICH; STAUBER; EWALD, 2008). Em ambos os estudos, que apontaram a descoberta desses endófitos em microplantas, verificaram-se concomitantemente, a promoção de crescimento de raízes e proliferação de brotos, enfatizando a necessidade de estudos complementares que avaliem a influência morfofisiológica de bactérias endofíticas na cultura de tecidos vegetais, levando em consideração a possível ação de fitormônios (TIMMUSK et al., 1999), antibióticos peptídeos (BEATTY; JENSEN, 2002) e enzimas hidrolíticas (SAKIYAMA et al., 2001), que são produzidos por essas bactérias.

Apesar desses relatos e do potencial benéfico desses endófitos, essas colônias de *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp não puderam ser alvo de demais análises. Isso porque apenas duas, das 120 unidades experimentais, apresentaram essas colônias que podem ter-se originado a partir de suas formas vegetativas esporuladas, altamente resistentes ao calor (FOSCHINO; GALLI; OTTOGALLI, 1990; SCHOCKEN-ITURRINO; NADER FILHO; DIMENSTEIN, 1996), caracterizando algum tipo de contaminação na manipulação do vegetal no momento de incubação nas placas. Por outro lado, a baixa taxa de crescimento de colônias no experimento como um todo não descarta a possibilidade de haverem bactérias endofíticas nos tecidos vegetais em questão. Outras bactérias ou até representantes dos gêneros abordados neste item, podem estar colonizando internamente as microplantas, mas por serem endofíticos (intracelulares) obrigatórios, não se desenvolveram no ambiente externo à célula vegetal.

As plantas vasculares fornecem um nicho ecológico ímpar para diversas comunidades de simbiontes crípticos que frequentemente contribuem com múltiplos benefícios, como o aumento da eficiência fotossintética, nutricional e hídrica, além de tolerância a estresses biótico e abiótico (BARROW et al., 2008). Recentes abordagens sobre a relação de endossimbiose entre plantas e bactérias têm se intensificado desde a *Teoria da Evolução por Endossimbiose* popularizada por Lynn Margulis em 1988 em seu livro intitulado *Symbiotic Planet* (RUTZ; HIRAKAWA, 2008). Atualmente, a compreensão dessa relação vêm sendo aprimorada com estudos bioquímicos e genéticos que desvendam até a reprogramação de células vegetais para acomodar o microrganismo endosimbiôntico (OLDROYD; HARRISON; PASZKOWSKI, 2009).

As características bioquímicas do microambiente gerado intercelularmente pelo organismo hospedeiro são indispensáveis para o estabelecimento dos endossimbiontes (SCHULZ; BOYLE, 2005; SMITH, 1979; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000), que muitas vezes são considerados microrganismos não-cultiváveis. Porém, na realidade, as condições sob as quais as bactérias crescem no seu habitat natural são desconhecidas (MUYZER; SMALLA, 1998) ou de grande dificuldade para mimetização, tornando-as impraticáveis para o cultivo. Técnicas independentes de cultivo, como o PCR-DGGE vêem sendo aplicadas com sucesso para estudos de comunidades bacterianas endofíticas (GARBEVA et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; ABREU-TARAZI et al., 2010), justamente pela dificuldade de se promover o crescimento e desenvolvimento dessas em ambiente diferente daquele em que se originaram e se adaptaram.

Em relação às análises independentes de cultivo, a amplificação de duas bandas distintas resultantes da PCR com os *primers* f799 e 1492R a partir das amostras de raízes, folhas jovens e folhas adultas confirmou a presença de DNA bacteriano em associação com o material vegetal (Figura 9), resultado comprovado pelas análises de PCR-DGGE realizadas com as mesmas amostras (Figura 10). A presença de bandas de DGGE em amostras provenientes de plantas supostamente livres de bactérias, cultivadas em condições assépticas, indica que estes endófitos estavam presentes, "escondidos" nos tecidos vegetais. Muitas comunidades endofíticas são consideradas crípticas já que não produzem sintomas e escapam de detecção pelas técnicas de histoquímica, microscopia, isolamento e demais métodos que envolvem o cultivo (DECKERT; MELVILLE; PETERSON, 2001; PARBERY, 1996). Estudos recentes com plantas *in vitro*, como a equinácea (LATA et al., 2006), ginseng siberiano (MULLER; DÖRING, 2009), pupunheira (ALMEIDA et al., 2009), além de frutíferas como a bananeira (THOMAS et al., 2008) e o mamoeiro (THOMAS et al., 2007), indicam a existência de comunidades bacterianas as quais só puderam ser desvendadas por meio análises independentes de cultivo (análise do gene 16S rRNA de *Bacteria* e PCR-DGGE). Técnicas mais inovadoras de microbiologia molecular e microscopia são requeridas para o estudo dessas comunidades e algumas vezes, dependendo da acuracidade, até mesmo os métodos mais recentes permanecem insuficientes para que se possa apreciar com plenitude o papel sinergético desempenhado por endófitos (BARROW et al., 2008; SCHULZ; BOYLE, 2005).

No que diz respeito a seletividade das bactérias endofíticas detectadas nas amostras de raízes, folhas jovens e folhas adultas, as análises de agrupamentos com base nos perfis DGGE revelou diferenças entre as estruturas das comunidades de actinobactérias, α e β-proteobactérias nos tecidos vegetais estudados (Figuras 10a, 10c, 10e e 10g). Os dendrogramas mostraram a presença de bandas específicas e de bandas comuns em cada grupo de amostras. A especificidade e o compartilhamento dessas bandas, expressas nos diagramas de Venn (Figuras 10b, 10d, 10f e 10h) sugerem que os diferentes grupos bacterianos realizam diferentes colonizações em cada parte das microplantas. Essas diferentes colonizações podem ser atribuídas aos padrões vegetais fisiológicos ou químicos, os quais podem influenciar de forma diferenciada cada tecido, cada órgão, levando a uma seleção diferencial de microrganismos associados a raízes (ANDREOTE et al., 2009b; IZUMI et al., 2008) ou folhas.

Independentemente do grupo de bactérias que foi analisado, os perfis de DGGE revelaram um padrão complexo e de composição variável (Figuras 10a, 10c, 10e e 10g). As semelhanças entre as comunidades endofíticas entre as amostras pode estar relacionada com a ecologia desses grupos de bactérias, que têm uma dinâmica populacional diretamente relacionada com o metabolismo vegetal e também com a disponibilidade de nutrientes que modulam a ocupação de nicho e estrutura das comunidades bacterianas (ANDREOTE et al., 2009a; BATTIN et al., 2007; BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT, 2003; IZUMI et al., 2008). Normalmente, na rizosfera, o carbono orgânico é considerado como a força motriz para a densidade e atividade microbiana (BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT, 2003; FISHER et al., 2000). E uma vez dentro do tecido vegetal, os diferentes mecanismos de distribuição de bactérias podem ser devido a interações com outras bactérias ou devido as diferentes habilidades de cada microrganismo, o que lhes permite explorar diferentes nichos (GARBEVA et al., 2001, LODEWYCKX et al., 2002). No entanto, esta dinâmica da nutrição é alterada no processo de micropropagação. Plantas *in vitro* são cultivadas em meio com grande oferta exógena de fonte de carbono, levando a um metabolismo heterotrófico ou mixotrófico (ESCALONA et al., 2003; HAZARIKA, 2006; POSPÍŠILOVÁ et al., 1987). Entretanto, as raízes de plantas *in vitro* são consideradas não-funcionais e podem deixar de ser importantes órgãos de armazenamento, devido à forte força de dreno exercida pelas folhas, as quais possuem capacidade fotossintética limitada (GROUT, 1988; GROUT; ASHTON, 1978; POSPÍŠILOVÁ et al., 1987).

Em plantas mixotróficas, as folhas jovens ou adultas, não são a principal fonte de energia e de fotoassimilados. Pelo contrário, as folhas *in vitro* podem tornar-se a principal fonte de reserva de carbono devido ao seu comportamento de dreno (GROUT, 1988; GROUT; ASHTON, 1978; SHORT et al., 1984). Desta forma, esta maior reserva de carbono pode suportar um maior grupo de bactérias nestes nichos, resultando em um maior número de bandas no perfil de DGGE. Além disso, folhas adultas, atuando como órgãos dreno, são capazes de promover o tráfico não-específico de moléculas através dos plasmodesmos (BALUSKA et al., 2001; CRAWFORD; ZAMBRYSKI, 2001; ROBERTS et al., 2001), podendo fornecer um ambiente rico em nutrientes para o crescimento de endófitos como o que ocorre nas folhas jovens. Considerando que as relações fonte-dreno no hospedeiro parecem ser um fator determinante no crescimento de endófitos (BETHLENFALVAY, BROWN; PACOVSKY, 1982; COMPANT et al., 2005a), isso justificaria os semelhantes padrões de bandas verificados entre amostras de folhas.

A alta similaridade entre as replicatas de amostras de raízes, folhas jovens e folhas adultas era esperada, considerando-se que as microplantas eram clones cultivados sob as mesmas condições controladas, o que limitou as variações das condições ambientais, as quais são tidas como moduladores da estrutura de comunidades bacterianas (ARAÚJO et al., 2002; BACON; HINTON, 2006; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Sendo assim, as diferenças notadas entre as amostras estiveram restritas ao microclima de cada tubo de ensaio e ao histórico de subcultivos de cada microplanta.

O sequenciamento de bandas (Figura 10a) que resultou na similaridade com seqüências de *Pseudoxanthomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp. e *Burkholderia* sp. está relacionado com outros estudos, nos quais as proteobactérias apresentam-se como um grupo predominante de endófitos, promovendo efeitos benéficos em plantas hospedeiras, tais como a promoção do crescimento, indução de resistência sistêmica e antagonismo a fitopatógenos pela produção de antibióticos (ANDREOTE et al., 2006; 2009b; CHELIUS; TRIPLETT, 2001; COMPANT et al., 2005a; DIAS et al., 2009; HASHIDOKO et al., 1999). A ocorrência de espécies de *Stenotrophomonas* já foi verificada em microplantas de equinácea (LATA et al., 2006), comigo-ninguém-pode (JAN et al., 2004), lavanda-do-mar (LIU; HSU; WU,. 2005) e ginseng siberiano (MULLER; DÖRING, 2009). Ao mesmo tempo estudos com espécies de *Burkholderia* em abacaxizeiro comprovaram a capacidade dessas bactérias em promover o crescimento vegetal durante a fase de aclimatização de microplantas (WEBER et al., 2003a, b) e aumentar a produtividade de frutos (WEBER et al., 2004), indicando que os benefícios causados pela interação entre plantas e as bactérias dos gêneros *Stenotrophomonas* e *Burkholderia* também podem ocorrer nas microplantas de abacaxizeiros, uma vez que ao menos *Burkholderia* spp. já foram isoladas de outros cultivares de abacaxizeiro *in vivo* (WEBER et al., 1999).

Por outro lado, bactérias do gênero *Pseudoxanthomonas* isoladas de solo rizosférico foram identificadas como degradadoras de antraceno (NAKATANI et al., 2008), hidrocarboneto aromático policíclico (HAP) tóxico, mutagênico e carcinogênico que não é degradado pela maioria dos microrganismos do solo (SAMANTA et al., 2002). A presença dessa bactéria em plantas *in vitro* como o abacaxizeiro, pode trazer benefícios não diretamente relacionados ao desenvolvimento vegetal, mas ao uso da cultura *in vitro* para talvez intensificar a população dessas bactérias que então poderiam ser utilizadas como biorremediadoras de solos contaminados por resíduos petroquímicos. Isso porque, uma das técnicas para aumentar a eficiência da

biodegradação microbiana de HAPs é justamente o emprego de plantas que possam estimular a ação dos microrganismos do solo (SUSARLA et al., 2002), ou aumentar a população desses agentes remediadores.

O perfil de bandas de DGGE a partir de amostras de microplantas com uma semana (S1), quatro meses (M4) e oito meses (M8) de cultivo, reafirmou a presença de endófitos provenientes de tecidos vegetais de microplantas consideradas axênicas (Figura 11a), como já evidenciado anteriormente para amostras de raízes, folhas jovens e folhas adultas. Esse perfil indica a existência de uma comunidade endofítica com estrutura variável em cada período de cultivo *in vitro* avaliado, desde a primeira semana (microplantas S1) até oito meses de cultivo (M8). Na análise de agrupamento hierárquico a formação de um agrupamento para cada um dos períodos de cultivo (Figura 11a) revela diferenças entre os perfis de bandas, que podem estar relacionadas às características fisiológicas e/ou químicas que variam ao longo do desenvolvimento das microplantas, alterando as estruturas das comunidades bacterianas endofíticas. Essas características podem envolver desde o fluxo de compostos de carbono e de água até o potencial meristemático das células vegetais.

No que se refere ao fluxo de compostos de carbono, vale lembrar que os processos de heterotrofia ou mixotrofia dos vegetais *in vitro*, bem como a fotossíntese, são amplamente modificados pelo teor de açúcares exógenos disponíveis no meio de cultura (ESCALONA et al., 2003; TICHÁ et al., 1998; VAN LE; SAMSON; DESJARDINS, 2001). A mixotrofia, por exemplo, contribui para a reciclagem dos produtos da respiração celular (VALERO-ARACAMA, 2005) fazendo com que a fotossíntese deixe de ser a principal fonte de carbono. E, a medida que a disponibilidade de açúcares do meio de cultura é reduzida dia após dia, enquanto os tecidos das microplantas utilizam esse carbono para seu crescimento, o metabolismo vegetal tende a ser alterado para suprir essa carência. É importante salientar que as folhas das microplantas em S1 (uma semana) ou M4 (quatro meses de cultivo), quando ainda há disponibilidade de meio de cultura, mesmo já havendo alguma escassez de nutrientes, realizam o papel de órgãos-dreno de carbono. Por outro lado, as folhas das microplantas M8 (oito meses de cultivo) enfrentam a escassez prolongada de carboidratos e alterações de pH (YOSHIHARA; HANYU, 1992). O progresso do crescimento de tecidos vegetais, ao longo do tempo, altera o pH do meio de cultura (SKIRVIN et al.,1986; YOSHIHARA; HANYU, 1992), afetando a absorção e disponibilidade de nutrientes (MINOSHA, 1987) e prejudicando processos organogênicos *in vitro* (LEIFERT;

CAMOTTA; WAITES, 1992; ZHANG; STOLTZ, 1989). Sendo assim, a alteração do metabolismo de carbono pode ter sido um dos fatores que contribuíram para as diferenças nas estruturas das comunidades endofíticas observadas entre os diferentes períodos de cultivo neste trabalho. Destaca-se que os carboidratos do meio de cultura fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento dos tecidos das microplantas (CALDAS, HARIDASAN; FERREIRA, 1998), e vão tornando-s e escassos diante de um longo período de cultivo. Como conseqüência, a ausência de sacarose (principal fonte de carbono exógena) intracelular pode resultar a perda de turgor na célula vegetal, devido ao seu importante potencial de manutenção osmótica (YOON et al., 2009), o que possivelmente prejudicaria o estabelecimento ou manutenção de endófitos em microplantas M8.

Uma vez que o ambiente celular vegetal em M8 provavelmente não apresentava mais as características estáveis de pH, níveis de oxigênio e outros pré-requisitos metabólicos favoráveis e até indispensáveis para a relação endófito-hospedeiro (SCHULZ; BOYLE, 2005; SMITH, 1979; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000), a população bacteriana endofítica tenderia a ser drasticamente diminuída. Essa conseqüência pode ser visualizada na redução do número de espécies ou UTO´s detectados pelas análises de DGGE e ARISA, respectivamente, em amostras de microplantas M8. Por outro lado, era esperado que essas mesmas condições desfavoráveis após oito meses sem qualquer renovação de nutrientes ou água, levasse ao estresse hídrico das microplantas M8, já que com o passar do tempo a água e o meio de cultura são consumidos para os processos metabólicos da microplanta. Esse estresse provocaria vários distúrbios fisiológicos levando a extensivos danos às membranas, desencadeando processos peroxidativos de lipídios, com perda de eletrólitos pela célula (ALONSO; QUEIROZ; MAGALHÃES, 1997; QUEIROZ et al., 1998; QUEIROZ; GARCIA; LEMOS FILHO, 2002) resultando no colapso do metabolismo celular, e consequentemente em fenômenos como a apoptose. Entretanto, vale ressaltar que não foram verificadas características morfofisiológicas comuns ao estresse hídrico, uma vez que a resposta mais proeminente das plantas nessas condições consiste em um acentuado declínio na expansão de área foliar, aceleração da senescência e abscisão das folhas (McCREE; FERNÁNDEZ, 1989; SANTOS; CARLESSO, 1998). Possivelmente, as bactérias endofíticas remanescentes em M8 sejam responsáveis pelo aumento da tolerância ao estresse causado por déficit hídrico na microplanta hospedeira. Diversos estudos baseados na inoculação artificial de bactérias endofíticas constataram os benefícios que essas promovem nas plantas aumentando a

tolerância ao estresse osmótico (CREUS; SUELDO; BARASSI, 1998), à restrição nutricional (CHANWAY, 1998) e, principalmente, à seca (NOWAK; ASIEDU; LAZAROVITS, 1995; SILVA et al., 2009). No que se refere exclusivamente a uma maior resistência a seca, estudos prévios indicam que, ao menos, actinobactérias (HASEGAWA et al., 2006; KUNOH, 2002), bactérias do gênero *Azospirillum* (CREUS; SUELDO; BARASSI, 1998), *Pseudomonas* (SHARMA; NOWAK, 1998), *Bacillus e Enterobacter* (SILVA et al., 2009), dentre outras, têm essa capacidade *in vivo*.

No desenvolvimento vegetal *in vitro* os processos naturais de divisão e diferenciação celular ocorrem regularmente (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008) e a medida que as células vão se distanciando dos ápices radicular e caulinar, as mesmas se tornam cada vez mais diferenciadas, com seu potencial meristemático reduzido (STANGE, 1965). Nesse processo no qual as células passam de competentes para determinadas, suas estruturas internas são significativamente transformadas se adaptando as suas “novas” funções. Alterações como essas ocorrem com o vegetal *in vitro* ao longo do tempo de cultivo. A capacidade de divisão, síntese e aproveitamento de organelas, nutrientes e demais componentes celulares vai se tornando cada vez mais escassa, limitando também a capacidade de sustentar a comunidade bacteriana endofítica intra e intercelular (ZANGARO et al., 2008). A maior quantidade de UTO´s e espécies detectadas nas amostras de microplantas S1 se justifica pela alta atividade metabólica de seus tecidos, intenso tráfico de moléculas e de microrganismos através dos seus plasmodesmos, promovendo um ambiente mais atrativo às comunidade bacterianas endofíticas do que as microplantas em M4 e M8.

Em relação ao uso das análises de DGGE e ARISA pode-se afirmar que ambas serviram ao propósito de revelar características da comunidade bacteriana endofítica. As análises de riqueza dos perfis de DGGE e dos padrões de picos gerados por ARISA (Figuras 11c e 11f) apresentaram resultados convergentes, onde se observou que houve o mesmo padrão de similaridade entre as amostras, sugerindo que independentemente da análise realizada os agrupamentos foram semelhantes. Uma maior riqueza de UTO´s foi detectada com ARISA, se comparado ao número de espécies separadas nos perfis de DGGE. Isso porque, as análises de DGGE de fragmentos de rDNA amplificados por PCR geram *fingerprinting* dos constituintes mais dominantes de populações microbianas mistas (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993), enquanto que as análises de ARISA são capazes de gerar maior variabilidade ao investigar

os organismos ao nível das comunidades (GÜRTLER; STANISICH, 1996). Cabe ainda considerar a sensibilidade da eletroforese capilar automatizada na caracterização da complexidade de comunidades microbianas (NAVARRETE, 2009).

As análises estatísticas do efeito da antibioticoterapia no crescimento de raízes, número de folhas e crescimento de lâminas foliares, mostraram que os tratamentos II (ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina), III (gentamicina, ampicilina e tetraciclina), IV (gentamicina, ampicilina e ciprofloxacina) e V (gentamicina, ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina) alteraram a morfofisiologia dos abacaxizeiros *in vitro* (Tabelas 3, 4, 5 e 6). Em princípio, a ANOVA revelou que todos os tratamentos de antibioticoterapia tiveram influência significativa nas médias dos três parâmetros avaliados (Tabela 3) e a separação das médias dos tratamentos pelo teste SNK (P=0,05) indicou que o tratamento IV propiciou o maior incremento no comprimento de lâmina foliar e, ao mesmo tempo afetou negativamente o número de folhas e o comprimento de raiz (Tabela 4). Este padrão de resposta não foi observado para os demais tratamentos. Contudo, a partir da análise pelo método Diferenças das Diferenças (DD) tornou-se evidente que apenas o parâmetro crescimento de raiz teve correlação significativa com o efeitos da antibioticoterapia, e que demais alterações nos outros dois parâmetros não deveriam ser considerados resultantes da ação dos antibióticos (Tabelas 5 e 6). A análise DD revelou que o efeito significativo dos tratamentos mostrado pela ANOVA esteve possivelmente mascarado pelo crescimento e desenvolvimento natural das microplantas ao longo do tempo de cultivo. Análises como essa têm sido aplicada com sucesso em experimentos agrícolas, incluindo o efeito de pesticidas nas culturas (PEMSL; WAIBEL; GUTIERREZ, 2007), para que na avaliação dos resultados, as médias dos tratamentos fiquem isentas de efeitos temporais permitindo maior credibilidade às interpretações dos efeitos exógenos.

As raízes das microplantas durante todo o período do experimento estiveram imersas nas soluções de antibióticos. Este íntimo e persistente contato das raízes com a solução no meio de cultura, provavelmente favoreceu a absorção dos antibióticos (CROWDY et al., 1956) e sua ação imediata nas células radiculares. Mathias, Alderson e Leakey (1987) sugerem justamente a aplicação de soluções de antibióticos na micropropagação, em meio de cultura líquido porque a maior superfície de contato aumenta a entrada de antibióticos para os tecidos internos. A ação concentrada nas células das raízes pode ter alterado a estrutura e diversidade da comunidade

bacteriana endofítica presente nesse órgão e, consequentemente, alterado fenômenos morfofisiológicos exclusivos do sistema radicular das microplantas.

De maneira oposta, o efeito dos antibióticos pode ter sido minimizado durante o transporte ao longo do corpo vegetal. O transporte de maior escala entre as raízes e as folhas é controlado pelas membranas celulares e a permeabilidade dessas membranas, depende da natureza química do soluto, tendendo a limitar a passagem de moléculas pelas células, demandando transportadores específicos (proteínas de transporte) e/ou gasto de energia (transporte ativo) (TAIZ; ZEIGER, 2004). Sendo assim, é admissível que os antibióticos pouco solúveis ou insolúveis em água (ampicilina e ciprofloxacina) tenham enfrentado limitações para atingir a parte aérea das microplantas, e portanto não tiveram efeito na microbiota endofítica. Em relação aos antibióticos solúveis em água (gentamicina e tetraciclina), seu transporte é principalmente via movimento passivo através das raízes para a parte aérea com o fluxo de transpiração, e a quantidade transportada é linearmente proporcional a quantidade de água transpirada (STOKES, 1954; BRIAN, 1957). Entretanto, o ambiente *in vitro* geralmente deixa a umidade relativa do ar em valores próximos a saturação, por isso supõe-se que devido a irrisória taxa de transpiração das microplantas, os antibióticos tenham se concentrado exclusivamente nas raízes, sem alcançar ou sem causar alterações mensuráveis (por esse experimento) na parte aérea.

Além disso, pode ter havido a formação de biofilme, ou seja “uma comunidade de células bacterianas estruturadas, enclausuradas em uma matriz polimérica auto-produzida e aderidas a uma superfície inerte ou viva”. A associação com a superfície é um meio eficiente de bactérias conseguirem condições mais favoráveis do microambiente intracelular. A inclinação das bactérias se tornarem ligadas a superfícies é tão onipresente em diversos ecossistemas que sugere uma forte vantagem seletiva e de sobrevivência sobre as de vida-livre. E bactérias associadas a um biofilme são mais resistentes a muitas substâncias tais como antibióticos, clorina e detergentes (WATNICK; KOLTER, 2000).

O estímulo à rizogênese e ao crescimento de raízes por bactérias endofíticas é comumente relatado na literatura (DIAS et al., 2009; HAAHTELA et al., 1990; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; LI et al., 2008; THOMAS et al., 2004a). Diversas bactérias associadas às plantas sintetizam hormônios de crescimento idênticos aos encontrados nos vegetais, dentre eles o AIA. Em plantas, o AIA microbiano produzido por bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Alcaligenes*,

Klebsiella, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Herbaspirillum* favorece o crescimento de raízes, e conseqüentemente promove melhor absorção de nutrientes e água pela planta hospedeira (CERIGIOLI, 2005; PATTEN; GLICK, 1996). Ou seja, uma vez que a ação dos antibióticos tenha sido concentrada no sistema radicular, dependendo do potencial bactericida ou bacteriostático dos antibióticos testados, esse estímulo indireto ao crescimento de raízes pode ter sido limitado ou totalmente eliminado.

No que se refere as análises histoquímicas não foram observadas diferenças entre o tratamento controle e os demais tratamentos de antibioticoterapia para nenhum dos testes realizados (Figura 12). Esse resultado corrobora com as observações baseadas nas análises estatísticas dos parâmetros morfofisiológicos, pois foi demonstrado que alterações foram apenas detectadas em nível radicular. E, portanto, nos testes histoquímicos realizados em lâminas foliares, o metabolismo de amido, lipídios e compostos fenólicos também não foram alterados pela antibioticoterapia. Esse metabolismo inalterado pode indicar que não houve fitotoxicidade, o que poderia levar à distúrbios na síntese de proteínas e ácidos nucléicos, interferindo, desta forma, no sistema energético das microplantas (FALKINER, 1990), resultando no acúmulo de amido pela redução significativa das enzimas amilase e invertase responsáveis pela hidrólise e transporte dos carboidratos (SOUZA; BELTRÃO; SANTOS, 2001). O estresse fisiológico e bioquímico gerado por fitotoxicidade poderia, então ocasionar à intensificação da atividade de peroxidases, causando a desintegração de membranas ou potencializando a oxidação de compostos fenólicos nas células vegetais (ASADA, 1992; STRACK, 1997). Todas essas conseqüências puderam ser evitadas uma vez que experimentos pilotos foram conduzidos a fim de determinar as concentrações adequadas, evitando efeitos de fitotoxicidade dos antibióticos, que teriam influência nos parâmetros aqui avaliados.

Nas análises histológicas foram verificadas diferenças exclusivamente nas amostras de raízes. Novamente, vale salientar que não foram verificadas alterações anatômicas em lâminas foliares, pois esta parte do corpo vegetal não foi afetada pela antibioticoterapia, como discutido anteriormente. Contudo, significativas alterações anatômicas entre os tratamentos foram notadas nas amostras de raízes (Figura 13). Descartando-se os efeitos de fitotoxicidade, as alterações observadas provavelmente estejam relacionadas a ação dos antibióticos nas raízes, que por sua vez, podem ter alterado prejudicialmente a comunidade bacteriana que habitava o sistema radicular. A ação dos antibióticos sob as bactérias endofíticas resultou na redução da deposição

de lignina nas células do córtex das raízes (Figura 13). Para todas as microplantas que estiveram submetidas a soluções de antibióticos houve a supressão ou a redução dos estratos do anel esclerenquimático, constituído por células com paredes secundárias espessadas, neste caso com nítida deposição de lignina quando comparadas às microplantas do tratamento I (controle). A diminuição do conteúdo de lignina pode ter sido causada pela ação das próprias bactérias endofíticas remanescentes que em situação de estresse, passaram a agir de maneira patogênica (AZEVEDO, 1998), liberando enzimas para a degradação inicial de moléculas como quitina e lignina (ANTAI; CRAWFORD, 1981; CHAMBERLAIN; CRAWFORD, 1999), na tentativa de buscar outros locais de colonização que não estivessem sob efeito dos antibióticos. Ou, sob outro ponto de vista, a eliminação ou a estagnação metabólica dos endófitos, fez com que deixasse de existir a ativação da resistência sistêmica na planta hospedeira, fenômeno que induz o aumento de deposição de lignina como mecanismo de defesa (BACON; HINTON, 1997), disparado possivelmente pelos sucessivos ferimentos causados pelas repicagens *in vitro*.

O agrupamento hierárquico e a PCA realizadas a partir dos géis de DGGE de actinobactérias, cianobactérias, α-proteobactérias, β-proteobactérias e γ-proteobactérias das amostras de microplantas (Figuras 15 e 16) evidenciaram que cada grupo de bactérias, dependendo de sua filogenia, teve sua estrutura diferentemente alterada pela antibioticoterapia. Ou seja, o fator que promoveu alteração nas estruturas das comunidades foi a resistência de cada grupo bacteriano à ação combinada dos antibióticos em cada tratamento. A resistência ou sensibilidade aos antibióticos varia entre cada espécie bacteriana, pois os mecanismos de resistência são controlados geneticamente (HARRIS et al., 1989), e sua resposta depende também de fatores ambientais (BENVENISTE; DAVIES, 1973). O alto nível de resistência à vários antibióticos também é diretamente proporcional a uma redução na absorção do antibiótico pelos microrganismos (BENVENISTE; DAVIES, 1973), o que pode diminuir consideravelmente em se tratando de endófitos intercelulares.

As combinações de antibióticos utilizadas, em princípio, podem ter promovido um sinergismo nos tratamentos nos quais havia simultaneamente gentamicina e ampicilina (III, IV e V) (JAWETZ et al., 1952). Essa interação positiva teria aumentado o potencial bactericida desses dois antibióticos. Isso ocorreria porque os antibióticos β-lactâmicos (ampicilina) inibem a síntese de parede celular bacteriana, aumentando a permeabilidade aos antibióticos aminoglicosídeos (gentamicina), os quais ligam-se irreversivelmente a subunidade 30S do ribossomo bacteriano

impedindo a síntese de proteínas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1996). Esta pode ter sido uma das razões para que o tratamento I (controle) tenha apresentado sempre maior similaridade com o tratamento II (ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina), sendo esse último menos eficaz quando comparados aos demais tratamentos (Figuras 15 e 16). Em relação aos tratamentos III, IV e V, foi muito difícil verificar qualquer padrão de resposta que explicasse os agrupamentos resultantes das análises de DGGE (Figuras 15 e 16). O esperado era que α, β e γ-proteobactérias e cianobactérias reagissem da mesma forma para todos os tratamentos, pois esses grupos representam bactérias Gram-negativas, o que os tornaria igualmente sensíveis a ação bactericida da gentamicina e da ampicilina, a ação bacteriostática da tetraciclina, e resistência a ciprofloxacina. O contrário era esperado para as actinobactérias, que são classificadas com Gram-positivas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1996). Contudo, a plena atividade de um antibiótico sob um microrganismo interno ao vegetal depende de diversos fatores, dentre eles da absorção pela planta hospedeira e da estabilidade química dentro do tecido vegetal, sendo que evidências da alteração molecular de antibióticos dentro do corpo vegetal já foi constatada em diversos estudos, fazendo com não houvesse a mitigação dos sintomas de patógenos (PRESCOTT; EMERSON; FORD, 1956; SANWAL, 1956), motivo principal do uso de antibióticos em plantas. Crowdy et al. (1955, 1956) mostraram evidências dessas degradações ou alterações moleculares, indicando que ocorre redução da “meia-vida” dos antibióticos, para poucos dias. A concentração de antibióticos recuperada de tecido fresco reduz drasticamente após o sétimo ou décimo quarto dia após a inoculação, sendo que após 28 dias, praticamente sobram apenas resquícios desses compostos nos tecidos vegetais (PHELPS; KUNTZ, 1965). Além disso, não existe real comprovação da efetividade dos antibióticos para eliminar bactérias a não ser que os tecidos vegetais sejam tratados de maneira intensiva durante um longo período (DEBERGH; VANDERSCHAEGHE, 1988), mas isso provavelmente acarretaria na fitotoxicidade do tratamento.

A presença de bactérias endofíticas intracelulares confirmada por MEV (Figura 19) acrescenta evidências, que mesmo as microplantas cultivadas por longos períodos sem qualquer sinal aparente de contaminação, sustenta uma comunidade bacteriana endofítica estável que é inerente ao vegetal. Essa comunidade pode ser ter sido adquirida no processo evolutivo do vegetal, assim como os “bacteriossomos” de pupunheiras tidas como microplantas axênicas (ALMEIDA et al., 2009). E mesmo diante de tratamentos como a antibioticoterapia, não foi

possível desvencilhar esses endófitos das células vegetais, tendo como melhor opção para a micropropagação, ao invés de incessantes tentativas de eliminação dessa comunidade, a busca da compreensão sobre os benefícios que podem haver diante dessa interação.

A associação de técnicas independentes de cultivo permitiu a avaliação e comprovação da presença de uma comunidade bacteriana endofítica, composta por membros de α, β, γ-proteobactérias, actinobactérias e cianobactérias, que coloniza sistemicamente microplantas de abacaxizeiro consideradas axênicas. Essa comunidade tem sua estrutura e diversidade alterada de acordo com o nicho de colonização (órgão vegetal) e com mudanças fisiológicas e bioquímicas sofridas pela planta hospedeira. Mesmo pontuais alterações no ambiente *in vitro* são suficientes para interferir na dinâmica desses endófitos, que parecem contribuir para que microplantas, mesmo diante de carência de água e nutrientes, se mantivessem visualmente resistentes, sem manifestar distúrbios morfológicos característicos de condições de estresse.

A ação da antibioticoterapia, que combinou antibióticos com mecanismos e espectros de ação distintos, resultou em impactos variados, porém significativos na comunidade bacteriana endofítica. Não foi possível promover a total eliminação das bactérias endofíticas, mas provavelmente, como conseqüência, esses impactos na comunidade bacteriana geraram alterações morfofisiológicas nas microplantas, notadas especialmente no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular. Essa relação entre antibioticoterapia, comunidade bacteriana endofítica e microplanta leva a crer que os endófitos, por mais indesejáveis que pareçam quando presentes na micropropagação, ainda que de forma críptica, podem ser benéficos ao desenvolvimento vegetal, interferindo de maneira positiva na morfofisiologia de microplantas, caracterizando uma relação endossimbionte mutualística. Uma vez que, a existência de comunidades bacterianas seja constatada em demais microplantas, essas poderão ser consideradas onipresentes nos tecidos vegetais. Novas abordagens da prática da cultura *in vitro* serão necessárias, ao se admitir que uma comunidade endofítica seja ubíqua e até resistente à ação de antibióticos e o conceito da assepsia na cultura de tecidos vegetais terá que ser reavaliado. Acredita-se que isso não impedirá o sucesso da micropropagação e suas aplicações, como uso do material vegetal *in vitro* como meio seguro de transporte entre barreiras fitossanitárias. Isso porque, grande parte desses endófitos é, provavelmente, condicionada ao meio intracelular vegetal, sem extrapolar sua colonização externamente à planta. Mas, sem dúvida essa associação não poderá permanecer negligenciada.

7 CONCLUSÕES

1) Existe uma comunidade bacteriana endofítica intracelular complexa em microplantas de abacaxizeiro consideradas axênicas.

2) A estrutura de comunidades endofíticas de eubactérias é alterada de acordo com seus nichos de colonização e períodos de cultivo da planta hospedeira.

3) A antibioticoterapia promove alterações nas comunidades de α, β, γ-proteobactérias, actinobactérias e cianobactérias, e na morfofisiologia do sistema radicular de microplantas de abacaxizeiro.

REFERÊNCIAS

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, 2010. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/ll30634513176207/>. Acesso em: 10 jan. 2010.

ADAMS, P.D.; KLOEPPER, J.W. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.240, p.181-189, 2002.

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

ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.; 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, 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.

ALONSO, A.; QUEIROZ, C.S.; MAGALHÃES, A.C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1323, p.75-84, 1997.

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

ALVAREZ, V.M. **Bioprospecção da população bacteriana halotolerante e biodegradadora de óleo presente em solo impactado na região de Panelas, SE**. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, 2007. 96p.

ALVERCA, E.; BIEGALA, I.C.; KENNAWAY, G.M.; LEWIS J.; FRANCA, S. **European Journal of Phycology**, Cambridge, v. 37, p.523-530, 2002.

ALVES, E. ***Xylella fastidiosa* – adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno.** 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

AMABILE-CUEVAS, C.F. New antibiotics and new resistence. **American Scientist**, Durham, v.91, p.138-149, 2003.

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.

ANDRADE, S.R.M.; OLIVEIRA, W.C.; REIS JÚNIOR, F.B.; CHARCHAR, M.J.A.; FALEIRO, F.G.; TEIXEIRA, J.B.; PEIXOTO, J.R. **Controle do crescimento e identificação de microrganismos contaminantes visando à micropropagação de gemas laterais de mangueira.** Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2008. 27p.

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.

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

ANDREOTE F.D.; MENDES, R.; DINI-ANDREOTE, F.; ROSSETTO, P.B.; LABATE, C.A.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.93, p.415–424, 2008.

ANTAI, S.P.; CRAWFORD, D.L. Degradation of softwood, hardwood, and grass lignocelluloses by two *Streptomyces* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.42, p.378–380, 1981.

AOSHIMA, Y. Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v.22, p.277-280, 2005.

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

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.

.

ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **Journal of Computer Science and Systems Biology**, Chicago, v.2, p.69-92, 2009.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. **Physiological Plantarum**, Copenhagen, v.85, p.235-241, 1992.

ASSMUS, B.; HUTZLER, P.; KIRCHHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE, J. R.; HARTMANN, A. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labed, rRNA-targed oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v.61, p.1013-1019, 1995.

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

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

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.

BACKMAN, P.A.; SIKORA, R.A. Endophytes: An emerging tool for biological control. **Biological Control**, Amsterdam, v.46, p.1-3, 2008.

BACON, C.W.; HINTON, D.M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: KNUDSEN, G.R.; MCINERNEY, M.J; STETZENBACH, L.D.; WALTER, M.V. (Ed.). **A manual of environmental microbiology**. Washington: ASM Press, 1997. p.413–421.

BACON, C.W.; HINTON, D.M. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. **Biological Control**, Amsterdam, v.23, p.274–284, 2002.

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

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

BAKONYI T.; DERAKHSHIFAR I.; GRABENSTEINER L.; NOWOTNY N. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus* larvae in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, p.1504-1510, 2003.

BALDANI, J.I., CARUSO, L., BALDANI, V.L.D., GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.911-922, 1997.

BALUSKA, F.; CVRCKOVA, F.; KENDRICK-JONES, J.; VOLKMANN, D. Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? **Plant Physiology**, Rockville, v.126, p.39-46, 2001.

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.

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

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

BEATTY, P.H.; JENSEN, S.E *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, p.159-169, 2002.

BENINATI, T.; LO, N.; SACCHI, L.; GENCHI, C.; NODA, H.; BANDI, C. A novel alpha-proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.2596-2602, 2004.

BENVENISTE, R.; DAVIES, J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v.42, p.471-506, 1973.

BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P.P. **Botanical Microtechnique and Citochemistry**. Iowa: State University Press, 1976. 326p.

BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S.; PACOVSKY, R.S. Relationship between host and endophyte development in mycorrhizal soybean. **New Phytologist**, London, v.90, p.537-543, 1982.

BIASI, L.A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura in vitro de abacateiro. **Bragantia**, Campinas, v.54, p.251-256, 1995.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v.7, p.1513-1522, 1979.

BLAZEVIC, D.J.; EDERER, G.M. **Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology.** New York: John Wiley , 1975. 136p.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.252, p.139-149, 2003.

BOINE, B.; NAUJOKS, G.; STAUBER, T. Investigations on influencing plant-associated bacteria in tissue cultures of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.94, p.219-223, 2008.

BOTTINI, R.; CASSAN; F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.497-503, 2004.

BRIAN, P.W. Effects of antibiotics on plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.8, p.413-426, 1957.

BROADBENT, P; BAKER, F.; WATERWORTH, J. Bacterial and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australia Melbournee soil. **Australian Journal of Biological Science**, Melbourne, v.24, p.925-944, 1971.

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.

BRUSETTI, L.; FRANCIA, P.; BERTOLINI, C.; PAGLUICA, A.; BORIN, S.; SORLINI, C.; ABRUZZESE, A.; SACCHI, G.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L.; BAZZICALUPO, M.; DAFFONCHIO, D. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.266, p.11-21, 2004.

BUCKLEY, P.M; DEWILDE, T.N.; REED, B.M. Characterization and Identification of Bacteria Isolated from Micropropagated Mint Plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v.31, p.58-64, 1995.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. 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.87-132.

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

CARDINALE, M., BRUSETTI, L., QUATRINI, P., BORIN, S., PUGLIA, A.M., RIZZI, A., ZANARDINI, E., SORLINI, C. CORSELLI, C.; DAFFONCHIO, D. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.6147-6156, 2004.

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.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbionts. **Ecology,** New York, v.69, p.2-9, 1988.

CASAMAYOR, E.O.; MASSANA, R.; BENLLOCH, S.; ØVREAS, L.; DÍEZ , B.; GODDARD, V.J.; GASOL, J.M.; JOINT, G.I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.4, p.338-348, 2002.

CASSELLS, A.C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.) .**Micropropagation:** Technology and Application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.31–34.

CERIGIOLI, M.M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho. (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2005. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

CHAMBERLAIN, K.; CRAWFORD D.L. *In vitro* and *in vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.23, p.641–646, 1999.

CHANG, C.C.; SCHMIDT, D.R. Initiation and proliferation of carrot callus using a combination of antibiotics. **Planta**, New York, v.185, p.523-526, 1991.

CHANWAY, C.P. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. **Sydowia**, Horn, v.50, p.149–170, 1998.

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.

CHRISTIANSEN-WENIGER, C. Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia**,** v.17, p.55-76, 1998.

CHU, K.K.; MACDONALD, K.L.; DAVIDSON, D.J.; SPEERT, D.P. Persistence of *Burkholderia multivorans* within the pulmonary macrophage in the murine lung. **Infection and Immunity**, Washington, v.72, p.6142-6147, 2004.

CID, L.P.B.; ZIMMERMANN, M.J. **A contaminação *In Vitro* de plantas**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 20p. (Boletim de Pesquisa, 122).

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.4951-4959, 2005.

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

.

CRAWFORD, K.M.; ZAMBRYSKI, P.C. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, p.1802-1812, 2001.

CREUS, C.M.; SUELDO, R.J.; BARASSI, C. Water relations in *Azospirillum* inoculated wheat seedlings under osmotic stress. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.76, p.238-244, 1998.

CROWDY, S.H.; GROVE, J.F.; HEMMING, H.G.; ROBINSON, K.C. The Translocation of Antibiotics in Higher Plants: II. The movement of griseofulvin in broad bean and tomato**.** **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.7, p.42-64, 1956.

CROWDY, S.H; GARDNER, D.; GROVE, J.F.; PRAMER, D. The Translocation of Antibiotics in Higher Plants I. Isolation of griseofulvin and chloramphenicol from plant tissue. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.6, p.371-383, 1955.

DANIELS, M.J. Possible adverse effects of antibiotic therapy in plants. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v.4, p.167-170, 1982.

DAS, M.; ROYER, T.V.; LEFF, L.G. Diversity of fungi, bacteria and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, p.756-767, 2007.

DE GAUDIO, R. The classifications of antibiotics. In: GULLO, A (Ed.). **Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency A.P.I.C.E.** Milan: Springer, 2006. p.135-142.

DEBERGH, P.C.; VANDERSCHAEGHE, A.M. Some symptoms indicating the presence of bacterial contaminants in plant tissue culture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.255, p.77-81, 1988.

DECKERT, R.J.; MELVILLE, L.; PETERSON, R. Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic lifecycle in the foliage of *Pinus strobus*. **Mycologycal**. **Research**, Cambridge, v.105, p.991-997, 2001.

DEKKER, J. Antibiotics in the control of plant diseases. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.17, p.243-262, 1963.

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

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; TAKAKI, G.M.C.; MARIANO, R.L.R.; FRANÇA, J.G.E. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.30, p.655-657, 2005.

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

DONG, Z.; MCCULLY, ME.; CANNY, M.J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. **Annals of Botany**, London, v.80, p.147-58, 1997.

DUVAL, C.M.; CALDAS, L.S.; RESENDE, R.O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. 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.45-68.

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

ESPINOLA, V.J.; SÁNCHEZ, M.M.; HOCES, A.M.; RODRIGUEZ, M.T.N.; MANRIQUE, J.M.R. Uso racional de fluoroquinolonas: ciprofloxacino y ofloxacino. **Boletín Terapéutico Andaluz**, Andalucia, v.10, p.13-15, 1994.

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

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

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.

FALKINER, F.R. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. **Newsletter International Association of Plant Tissue Culture**, Calgary, v.60, p.13-23, 1990.

FALKINER, R.F. The consequences of antibiotic use in horticulture. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.41, p.429-431, 1998.

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS Jr., W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargón of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v.147, p.282-286, 1996.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPH, 1998. p.21-44.

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

FIOLA, J.A.; HASSAN, M.A.; SWARTZ, H.J.; BORS, R.H.; McNICOLS, R. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.20, p.223-228, 1990.

FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, New York, v.21, p.844-850, 2003.

FISHER, M.M.; KLUG, J.L.; LAUSTER, G.;NEWTON, M.; TRIPLETT, E.W. Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity**. Microbial Ecology**, New York, v.40, p.125-138, 2000.

FISHER, M.M.; TRIPLETT, E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.4630-4636, 1999.

FOSCHINO, R.; GALLI, A.; OTTOGALLI, G. Research on the microflora of UHT milk. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.40, p.47-59, 1990.

FOX, A. 2006. **Antibiotics that affect plant envelope**. Disponível em <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/antibiotics1.htm.> Acesso em: 10 jan 2010.

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

FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, Waterbury, v.96, p.928–936, 1991.

GAGE, D.J.; BOBO, T.; LONG. S.R.. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p**.**7159-7166, 1996.

GANTAR, M.; KERBY, N.W.; ROWELL, P. Colonization of wheat *(Triticum vulgare* L) by N2-fixing cyanobacteria. **New Phytologist**, Lancaster, v.118, p.485-492, 1991.

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

GARBEVA, P.; 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.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.232, p.167-180, 2001.

GONZÁLEZ, N.; ROMERO, J.; ESPEJO, R.T. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v.55, p.91-97, 2003.

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

GOROKHOVATSKY, A.Y.; MARCHENKOV, V.V.; RUDENKO, N.V.; IVASHINA, T.V.; KSENZENKO, V.N.; BURKHARDT, N.; SEMISOTNOV, G.V.; VINOKUROV, L.M.; ALAKHOV, Y.B. Fusion of *Aequorea victoria* GFP and aequorin provides their Ca{sup 2+}-induced interaction that results in red shift of GFP absorption and efficient bioluminescence energy transfer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.320,, p.703-711, 2004.

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

GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stresses of transplanting. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.230, p.129-135, 1988.

GROUT, B.W.W., ASTON, M.J. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. **Annals of Botany**, London, v.42, p.993-995, 1978.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia vegetal**, 2006. Disponível em: <http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila.htm>. Acesso em: 20 jun. 2009.

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.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. **Microbiology**, New York, v.142, p.3-16, 1996.

HAAHTELA, K.; RONKKO, R.; LAAKSO, T.; WILLIAMS, P.H.; KORHONEN, T.K. Root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* in *Poa pratensis*: Characterization of an ironscavenging system and a substance stimulating root hair production. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.3, p.358-365, 1990.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.102, p.155-162, 1996.

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

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.

HARAGUCHI, T. Antibioticos: classificacao geral. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v.57, p.109-114, 2000.

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.

HARRIS, E.H.;BURKHART, B.D.; GILLHAM, N.W.;BOYNTON, J.E. Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. **Genetics**, Chicago, v.123, p.281-292, 1989.

HASEGAWA, S.; MEGURO, A.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. **Actinomycetologica**, Tokyo, v.20, p.72-81, 2006.

HASHIDOKO, Y.; NAKAYAMA, T.; HOMMA, Y.;TAHARA, S.. Structure elucidation of xanthobaccin A, a new antibiotic produced from *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88. **Tetrahedron letters**, Elmsford, v.40, p.2957-2960, 1999.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, p.105-120, 2006.

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

HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Maryland: Williams and Wilkins, 1994. 787p.

HUANG, J. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Washigton, v.24, p.141-157, 1986.

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.

HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B.; MONTAGU, M.V.; KELLENBBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **The Journal of Bacteriology**, Washigton, v.176, p.1913-1923, 1994.

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

IMBENS, G.M.; WOOLDRIDGE, J.M. Recent developments in the econometrics of program evaluation. **Journal of Economic Literature**, Cambridge, v.47, p.5-86, 2008.

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

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 and Biochemistry**, Oxford, v.39, p.891-899, 2007.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON. D.A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.63, p.1262-1265, 1985.

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

JAN, W.C.; CHEN, R.S.; TSAY, J.S.; TSAY, J.G. Contaminant detection of *Dieffenbachia* and *Phalaenopsis* tissue cultures by polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme analyses. **Journal of the Agricultural Association of China**, Taipei, v.5, p.299-317, 2004.

JAWETZ, E.; GUNNISON, J.B.; SPECK, R.S.; COLEMAN, V.R. Studies on antibiotic synergism and antagonism: Synergism among seven antibiotics against various bacteria in vitro. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.64, p.29-39, 1952.

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

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.

JUCK D.; CHARLES T.; WHYTE L. G.; GREER C. W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.33, p.241-249, 2000.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.H. (Ed.). **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p.21-132.

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

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

KATZNELSON, H.; SUTTON, M.D. Inhibition of plant pathogenic bacteria *in vitro* by antibiotics and quaternary ammonium compounds. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.29, p.270-278, 1951.

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

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

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

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.6, p.1244-1251, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.273, p.91-99, 2005.

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

KUMAR, K; GUPTA, S.C.; BAIDOO, S.K; CHANDER, Y.; ROSEN, C.J. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. **Journal of Environmental Quality**, cidade, v.34, p.2082-2085, 2005.

KUNOH, H. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.68, p.249–252, 2002.

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.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS D.G. ClustalW2 and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, Oxford, v.23, p.2947-2948, 2007.

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

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

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, Berlin, v.129, p.271-280, 2001.

LEIFERT, C; WAITES, W.M.; NICHOLAS, J.R. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v.67, p.353-361, 1989.

LEIFERT, C.; RITCHIE, I.Y.; WAITES, W.M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.7, p.452-69, 1991.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WAITES, W.M. Effect of combination of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.29, p.153-160, 1992.

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

LIU, B.; QIAO, H.; HUANG, L.; BUCHENAUER, H.; HAN, Q.; KANG, Z.; GONG, Y. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. **Biological Control**, Amsterdam, v.49, p.277-285, 2009.

LIU, T.H.A.; HSU, N.W.; WU, R.Y. Control of leaf-tip necrosis of micropropagated ornamental statice by elimination of endophytic bacteria. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v.41, p.546–549, 2005.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MESGEAY, M.; LELIE, D. van der. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v.21, p.583-606, 2002.

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

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R.A. (Ed.). **Princípios de biotecnologia em plantas:** uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p.101-181.

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

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

MATHIAS, P.J.; ALDERSON, P.G.; LEAKEY, R.R.B. Bacterial contamination in tropical hardwood cultures. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.212, p.43-49, 1987.

MATTOS, K.A.; PÁDUA, V.L.; ROMEIRO, A.; HALLACK, L.F.; NEVES, B.C.; ULISSES, T.M.; BARROS, C.F.; TODESCHINI, A.R.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.80, p.477-493, 2008.

McCREE, K.J.; FERNÁNDEZ, C.J. Simulation model for studying physiological water stress responses of whole plants. **Crop Science**, Madison, v.29, p.353-360, 1989.

McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.173, p.337-342, 1995.

McINROY, J.A.; MUSSON, G.; WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Masking of antibiotic-resistance upon recovery of endophytic bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.186, p.213-218, 1996.

McMANUS, P.S.; STOCKWELL, V.O.; SUNDIN, G.W.; JONES, A.L. Antibiotic use in plant agriculture. **Annual Review of Phytopathology**, Washington, v.40, p.443-465, 2002.

MEGURO, A.; HASEGAWA, S.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, T. Induction of disease resistance in tissue-cultured seedlings of mountain laurel after treatment with *Streptomyces padanus* AOK-30. **Actinomycetologica**, Tokyo, v.18, p.48-53, 2004.

MENDES, L.W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP**. 2009. 141p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MEYNIER, V.; ARNOULD, M.F. Compared effectiveness of antibiotic treatments and shoot-tip culture on bacterial decontamination of an *in vitro* propagated clone of hybrid walnut (*Juglans nigra x J. regia*). **Biologia Plantarum**, Prague, v.31, p.269-275, 1989.

MINAMIYAMA, H.; SHIMIZU, M.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y.; ONAKA, H.; YOSHIDA, R.; KUNOH, H.: Multiplication of isolate R-5 *Streptomyces galbus* on rhododendron leaves and its production of cell wall-degrading enzymes. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.69, p.65-70, 2003.

MINOCHA, S.C. pH of the medium and the growth and metabolism of cells in culture. In: BONGA, J.M; DURZAN, D.J (Ed.). **Cell and Tissue culture in Forestry**. Dordrecht: Nijhoff Publishers, 1987. p.125-141.

MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.237, p.47-54, 2001.

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

MISKO, A.L.; GERMIDA, J.J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.42, p.399-407, 2002.

MOORE, F.P.; BARAC, T.; BORREMANS, B.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J.; LELIE, D. van der.; CAMPBELL, C.D.; MOORE, E.R.B. Endophytic bacterial diversity in popular trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation. **Systematic and Applied Microbiology**, Frankfurt,v.29, p.539–556, 2006.

MÜHLING, M.; WOOLVEN-ALLEN, J.; MURRELL, J.C.; JOINT, I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. **The ISME Journal**, Geneva, v.2, p.379-392, 2008.

MULLER, P; DÖRING, M. Isothermal DNA amplification facilitates the identification of a broad spectrum of bacteria, fungi and protozoa in *Eleutherococcus* sp. plant tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.98, p.35-45, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.26, p.473-497, 1962.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.73, p.127-141, 1998.

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.; TESKE, A.; WIRSEN, C.;JANNASCH, H. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.164, p.165-172, 1995.

NAKATANI, A.S.; SIQUEIRA, J.O.; SOARES, C.R.F.S.; LAMBAIS, M.R. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de "Landfarming" de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, p.1501-1512, 2008.

NAVARRETE, A.A. **Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.** 2009. 114p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

NDOWORA, T.C.R.; KINKEL, L.L.; JONES, R.K.; ANDERSON, N.A. Fatty acid analysis of pathogenic and suppressive strains of streptomyces species isolated in Minnesota. **Phytophatology**, Cornell, v.86, p.138-143, 1996.

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAM, M.P.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. Amsterdam, v.115, p.237-247, 2006.

NOWAK, J. Benefits of *in vitro* “biotization” of tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v.34, p.122-130, 1998.

NOWAK, J.; ASIEDU, S.K.; LAZAROVITS, G. Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Ed.). **Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* Cultures**. Saint-Paullez-Durance: CEA, 1995. p.173-180.

ODUTAYO, O.I; AMUSA, N.A.; OKUTADE, O.O.; OGUNSANWO, Y.R. Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v.2, p.67-72, 2007.

OLDROYD, G.E.D; HARRISON, M.J.; PASZKOWSKI, U. Reprogramming plant cells for endosymbiosis. **Science**, Washington, v.324, p.753-754, 2009.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v.21, p.197-200, 1996.

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

OROS-SICHLER, M.; COSTA, R.; HEUER, H.; SMALLA, K. Molecular Fingerprinting Techniques to Analyze Soil Microbial Communities. In: van ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T. (Ed.). **Modern Soil Microbiology**. Madison:CRC Press, 2007. p.355-386.

OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; MARIA, J.; POWER, J.B. Influência do antibiotico *cefotaxima* na cultura de protoplastos derivados de mesofilo de *Passiflora incarnata* L.. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, p.507-515, 1995.

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, London, v.3, p.236-251, 2000.

PALUS, J.A.; BORNEMAN, J.; LUDDEN, P.W.; TRIPLETT, E.W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* lltis and doebley. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.186, p.135-142, 1996.

PANICKER, B.; THOMAS, P.; JANAKIRAM, T.; VENUGOPALAN, R.; NARAYANAPPA, S.B. Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum 'Arka Swarna' and activation of endophytic bacteria. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v.43, p.614-622, 2007.

PARBERY, D.G. Trophism and the ecology of fungi associated with plants. **Biological Reviews**, Cambridge, v.71, p.473-527, 1996.

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

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

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

PEDROSO, A.A.; OETTING, L.L.; UTIYAMA, C.E.; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R.; MIYADA, V.S. Variabilidade espacial da comunidade bacteriana intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, p.1225-1233, 2005.

PELCZAR, M.J.; CHANE, E.C.S.; KRIEG, R.N. **Microbiologia conceitos e aplicações.** 2.ed. São Paulo: Ed. McGraw-Hill. v.2. 1997. 517 p.

PEMSL, D.E; WAIBEL, H.; GUTIERREZ, A.P. The economics of biotechnology under ecosystems disruption. **Ecological Economics**, Amsterdam, v.66, p.177-183, 2007.

PEREIRA, J.E.S; FORTES, G.L.R. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, p.1273-1279, 2003.

PEROS, J.; TORREGROSA, L.; BERGER, G. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogensis and antibiotic sensivity. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.49, p.171–179, 1998.

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.

PHELPS, T.; KUNTZ, D. Translocation and persistence of cycloheximide and oligomycin in northern pin oaks. **Forest Science**, Bethesda, v.11, p.353-359, 1965.

PILLAY, V.K.; NOVAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.354-361, 1997.

PIRTTILÄ, A.M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch fine (*Pinus sylvestris* L.) by *in situ* hybridization**. Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v.66, p.3073–3077, 2000.

POSPÍŠILOVÁ, J.; ČATSKÝ, J.; SOLÁROVÁ, J.; TICHÁ, I. Photosynthesis of plant regenerants. Specificity of *in vitro* conditions and plantlet response. **Biologia Plantarum**, Prague, v.29, p.415-421, 1987.

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.

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

QUEIROZ, C.G.S.; GARCIA, Q.S.; LEMOS FILHO, J.P. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v.14, p.59-63, 2002.

QUEIROZ, C.G.S.; ALONSO, A.; MARES-GUIA, M.L.; MAGALHÃES, A.C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in roots of (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biology Plantarum**, Copenhagen,v.41, p.403-413, 1998.

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.

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.

REED, B.M.; TANPRASERT, P. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Bangladesh, v.1, p.137–141, 1995.

REINHOLD, B.; HUREK, T. Location of diazotrophs in the interior with special attention to the kallar grass association. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.110, p.259-268, 1988.

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

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

RITCHIE, N.J.; SCHUTTER, M.E.; RICHARD, P.D.; MYROLD, D.D. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v.66, p.1668-1675, 2000.

ROBERTS, I.M.; BOEVINK, P.; ROBERTS, A.G.; SAUER, N.; REICHEL, C.; OPARKA, K.J. Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. **Protoplasma**, Vienna, v.218, p.31-44, 2001.

RODRIGUES, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.17, p.319-339, 1999.

ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v.61, p.33-36, 1962.

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

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p.1341–1348, 2006.

RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.; SCHMELZER, R. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.145, p.261-273, 1992.

RUTZ, S.F.; HIRAKAWA, C.E. Um **Modelo matemático da evolução por Endossimbiose**. Cadernos do IME – Série Matemática, Rio de Janeiro, v.20, 2008.

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.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.4, p.406-425, 1987.

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

SAMANTA, S.K; SINGH, O.V.; JAIN, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**, London, v.20, p.243-248, 2002.

SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Déficit Hídrico e os processos morfológicos e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.2, p.287-294, 1998.

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.

SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, B.; BORGONOVI, G.E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2691-2693, 1992.

SCHERLING, C.; ULRICH, K.; EWALD, D.; WECKWERTH, W. A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte paenibacillus sp. isolate and *in vitro*-grown poplar plants revealed by metabolomics. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.22, p.1032-1037, 2009.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; NADER FILHO, A.; DIMENSTEIN, A.R. Ocorrência de bactérias esporuladas do gênero *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, p.25-27, 1996.

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

SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.1475–1482, 2004.

SELOSSE, M.A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v.327, p.639-648, 2004.

SENTHILKUMAR, M.; MADHAIYAN, M.; SUNDARAM, S.; KANNAIYAN, S. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). **Microbiological Research**, Copenhagen, v.164, p.92-104, 2009.

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

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

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.39, p.23–32, 2002.

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

SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T. de A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, p.535-538, 2008.

SHORT, K.C.; WARDLE, K.; GROUT, B.W.W.; SIMPKINS, I. *In vitro* physiology and acclimatization of aseptically cultured plantlets. In: NOVAK, F.J.; HASEL, L.; DOLEZEL, J. (Ed.). **Plant tissue and cell culture Applications to crop improvement**. Prague: Czechoslovak Academy of Sciences, 1984. p.475-486.

SILVA, A.B.; LEITE, H.A.C.; DE SOUZA, J.T.; LOGUERCIO, L.L. Efeito do uso de bactérias endofíticas na promoção de crescimento e tolerância à seca em mudas de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55., 2009. Águas de Lindóia. **Resumos...** Aguas de Lindóia: SBG, 2009. Disponível em: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2009/GM049-28424.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2010.

SILVA, L.G.; MIGUENS, F.C.; OLIVARES, F.L. *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, p.69-71, 2003.

SI-PING, Z.; BIN, C.; XIONG, G.; WEI-WEN, Z. Diversity analysis of endophytic bacteria within. *Azolla microphylla* using PCR-DGGE and electron microscopy. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, Cambridge, v.5, p.269-276, 2008.

SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, Heidelberger, v.5, p.292-294, 1986.

SLATER, A.; SCOTT, N.W.; FOWLER, M.R. Plant tissue culture. In: _____. **Plant biotechnology:** the genetic manipulation of plants. New York: Oxford University Press, 2003. p.35-53.

SMITH, D.C. From extracellular to intracellular: the establishment of a symbiosis. **Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences**, London, v.204, p.115-130, 1979.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry:** The principles and practice of statistics in biological research. San Francisco: W.H. Freeman, 1969. 776p.

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

SOUZA, J.G.; BELTRÃO, N.E.M.; SANTOS, F.W. Fisiologia e produtividade do algodoeiro em solo encharcado na fase de plântula. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.425-430, 2001.

SOUZA, M.V.N.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, A.D.; COURI, M.R.C.. Ciprofloxacina uma importante fluorquinolona no combate do Antraz. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.85, p.13-18, 2004.

STANFORD, H.C. Tetracyclines and chloramphenicol. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (Ed.). **Bennett's Principles and Practice of Infections Disease**. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p.306-317.

STANGE, L. Plant cell differentiation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.16, p.119-140, 1965.

STOKES, A. Uptake and translocation of griseofulvin by wheat seedlings. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.5, p.132-142, 1954.

STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker. 2000. p.3-29.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B. (Ed.). **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 1997. p.387-416.

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

STURZ, A.V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht,, v.175, p.257–263, 1995.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of Rhizobacteria and the strategies required creating yield-enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.15, p.183-190, 2000.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v.19, p.1-30, 2000.

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

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; ARSENAULT, W.J.; BUCHANAN, N.A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, London, v.48, p.360-369, 1999.

SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, New York, v.55, p.415-424, 2008.

SUSARLA, S.; MEDINA, V.F.; MCCUTCHEON, S.C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v.18, p.647-658, 2002.

SUZUKI, T.; SHIMIZU, M.; MEGURO, A.; HASEGAWA, S.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. Visualization of infection of an endophytic actinomycete. *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured rhododendron. **Actinomycetologica**, Tokyo, v.19, p.7–12, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Transporte de solutos. In: _____. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 6, p.115-136.

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

TANPRASERT, P.; REED, B.M. Determination of minimal bactericidal and effective antibiotic treatment concentrations for bacterial contaminants from micropropagated strawberries. ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v.33, p.227-230, 1997.

TAŠKI-AJDUKOVIĆ KSENIJA J., VASIĆ DRAGANA M. Different sterilization methods for overcoming internal bacterial infection in sunflower seeds. **Proceedings of the National Science Matica Srpska Novi Sad**, Serbia, v.109, p.59-64, 2005.

TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.3, p.42-47, 2001.

TEIXEIRA, M.A.; MELO, I.S.; VIEIRA, R.F; COSTA, F.E.C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.43-49, 2007.

TENG, W.L.; NICHOLSON, L. Pulse treatments of penicillin-G and streptomycin minimize internal infections and have post-treatment effects on the morphogenesis of ginseng root cultures. **Plant Cell Reports**, New York, v.16, p.531-535, 1997.

THOMAS, P. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. **Current Science**, Bangalore, v.87, p.67-72, 2004a

]THOMAS, P. In vitro decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.77, p.173-179, 2004b.

THOMAS, P. Isolation of an ethanol-tolerant endosporeforming Gram-negative Brevibacillus sp as a covert contaminant in grape tissue cultures. **Journal of Applied Microbiology,** Bedford, v.101, p.764-774, 2006.

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

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

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

THOMPSON, I.P.; BAILEY, M.J.; ELLIS, R.J.; PURDY, K.J. Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v.102, p.75-84, 1993.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.4876-4882, 1997.

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

TIMMUSK, S.; NICANDER, B.; GRANHALL, U.; TILLBERG, E. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, p.1847-1852, 1999.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPH, 1998. 509p.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 128 p.

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.

ULRICH, K.; STAUBER, T.; EWALD, D. *Paenibacillus* - a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.93, p.347-351, 2008.

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

VALERO-ARACAMA, C. **Physiological and anatomical basis for differences in growth performance during *in vitro* and *ex vitro* culture of sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes**. 2005. 173p. Tese (Doutorado) - University of Florida, Gainesville, 2005.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.67, p.503-549, 2003.

VAN KIRK, L.S.; HAYES, S.F.; HEINZEN, R.A. Ultrastructure of *Rickettsia rickettsii* actin tails and localization of cytoskeletal proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, p.4706–4713, 2000.

VAN LE, Q.U.Y.; SAMSON, G.U.Y.; DESJARDINS, Y. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of *in vitro* plantlets of tomato (*L. esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO_2 concentration. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.158, p.599-606, 2001.

VAN OEVELEN, S.; DE WACHTER, R.; VANDAMME, P.; ROBBRECHT, E.; PRINSEN, E. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of *Psychotria* (Rubiaceae, angiosperms) and proposal of '*Candidatus Burkholderia kirkii*' sp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.52, 2023-2027, 2002.

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

WATNICK, P., KOLTER, R. Miniriview - Biofilm, City of Microbes. **Journal of Babcteriology**, Washington, v.182, p.2675-2679, 2001.

WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.210, p.103-113, 1999.

WEBER, O.B.; CORREIA, D.; ROCHA, M.W.; ALVEZ, G.C.; OLIVEIRA, E.M.; SÁ, E.G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.38, p.1419-1426, 2003a.

WEBER, O.B.; CORREIA, D.; SILVEIRA, M.R.S.; CRISÓSTOMO, L.A.; OLIVEIRA, E.M.; SÁ, E.G. Efeito de bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.38, p.689-696, 2003b.

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

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

WELBAUM, G.E.; STURZ, A.V.; DONG, Z.; NOWAK, J. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v.23, p.175-193, 2004.

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

WOJTANIA, A.; PUŁAWSKA, J.; GABRYSZEWSKA, E. Identification and elimination of bacterial contaminants from *Pelargonium* tissue cultures. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Skierniewice, v.13, p.101-108, 2005.

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

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v.66, p.345-351, 2000.

YARA, R. **Localização *in situ* e caracterização molecular da bactéria endossimbionte de *Pleurotus ostreatus***. 2006 88p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

YOON, Y.; MOBIN, M.; HAHN, E.; PAEK, K. Impact of *in vitro* CO2 enrichment and sugar deprivation on acclamatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to *ex vitro* conditions **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.65, p.183-188, 2009.

YOSHIHARA, T.; HANYU, H. pH changes in culture medium with progress of growing stages, callus, multiple shoot and intact plant of strawberry. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.319, p.291-296, 1992.

YOU, C.; ZHOU, F. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, p.403-408, 1989.

YU, Y.; WEI, Z.M. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. **Biologia Plantarum**, Prague, v.52, p.553-556, 2008.

ZAKHAROVA, E.A. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry**. European Journal of Biochemistry**. Edinburgh, v.259, p.572-576, 1999.

ZANGARO, W.; ASSIS, R.L.; ROSTIROLA, L.V.; SOUZA, P.B.; GONÇALVES, M.C.; ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M.A. Changes in arbuscular mycorrhizal associations and fine root traits in sites under different plant successional phases in southern Brazil. **Mycorrhiza**, Berlin, v.19, p.37–45, 2008.

ZHANG, B.; STOLTZ, L.P. Shoot proliferation of *Euphorbia fulgens in vitro* affected by medium components. **Hort Science**, Mont Vernon, v.24, p.503-504, 1989.

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