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

**Estudo da comunidade bacteriana endofítica e de sua manifestação na
micropropagação de *Eucalyptus benthamii***

Natalia Pimentel Esposito Polesi

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

**Piracicaba
2015**

Natalia Pimentel Esposito Polesi
Engenheira Agrônoma

**Estudo da comunidade bacteriana endofítica e de sua manifestação na micropropagação
de *Eucalyptus benthamii***

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

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

**Piracicaba
2015**

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

Polesi, Natalia Pimentel Esposito
Estudo da comunidade bacteriana endofítica e de sua manifestação na micropropagação
de *Eucalyptus benthamii* / Natalia Pimentel Esposito Polesi. - - Piracicaba, 2015.
151 p. : il.

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

1. Micropropagação 2. Fontes de explante 3. Condições de cultivo 4. Manifestação
endofítica; 5. Desenvolvimento de microcepas 6. Aspectos morfofisiológicos 7. Dinâmica
populacional endofítica 8. Análise independente de cultivo I. Título

CDD 634.9734
P765e

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

*À toda minha família, em especial aos meus pais Maríneusa e Nilson,
irmãos Marcelo e Márcio e marido Luís Fernando*

Dedido

À todos amigos e mestres da vida
Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida, pelas pessoas que colocou em meu caminho e por me auxiliar nos momentos de dificuldade e aflição.

À minha família pelo amor incondicional, pelo apoio e suporte sentimental e financeiro. E é claro por embarcarem no sonho acadêmico comigo.

Ao meu amado marido, Luis Fernando Polesi, pelo amor, cuidado, respeito, carinho e paciência.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Ciências Biológicas, por permitir a realização dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, com especial gratidão aos professores Lázaro Eustáquio Pereira Peres e Ricardo Alfredo Kluge, pela oportunidade, e à Maria Solizete Granziol Silva, mais do que secretária do Programa, uma amiga que me conduziu auxiliando sempre durante todo o Mestrado e o Doutorado.

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pelo exemplo, pela confiança e persistência, pela paciência e brandura com que orienta. Pessoa sem o qual este sonho jamais teria se concretizado.

À Dra. Cristina Vieira de Almeida pela amizade e pelo jeito maternal de conduzir os trabalhos, pela co-orientação, sem a qual o mundo dos endófitos seria muito mais complicado.

Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves pelo auxílio e ao Laboratório de Fisiologia das Árvores na pessoa do José Roberto Romanini (Beto), nosso querido técnico e amigo.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pelo suporte intelectual e prático. E aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP, com especial distinção ao Pedro Avelino Maia de Andrade pela amizade e auxílio nas análises e interpretações dos resultados moleculares.

À nossa querida amiga e técnica Eveline e aos Amigos do Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas da ESALQ/USP – Leandro, Fabiane, Érika, Katherine, Germana, Gabriela, Lívia, Francisco, Priscila, Renato, Rafaela, Marília e Raquel, pelo apoio no trabalho científico e, muito mais pela amizade, tornando o trabalho bem mais leve e prazeroso.

Às minhas irmãs de coração Carol e Ester pela amizade, companheirismo e apoio.

Ao CNPq, processo nº 143253/2011-5, e à CAPES pelas bolsas concedidas.

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

“Maior que a tristeza de não haver vencido é a vergonha de não ter lutado!”

Rui Barbosa

“O entusiasmo é a maior força da alma. Conserva-o e nunca te faltará poder para conseguires o que desejas”.

Napoleão Bonaparte

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Objetivos.....	22
1.1.1 Objetivo Geral	22
1.1.2 Objetivos Específicos	22
Referências	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Eucalyptus	27
2.2 Micropropagação	28
2.2.1 Escolha do Explante	32
2.2.2 Meio de Cultivo	34
2.2.3 Fonte de Carboidrato	37
2.2.4 Condições de Cultivo	37
2.2.5 Contaminações Microbianas.....	38
2.2.6 Contaminação versus Manifestação	40
2.3 Microrganismos Endofíticos	41
2.3.1 Mutualismo dos Endófitos.....	42
2.3.2 Distribuição nas Plantas (Nichos de Colonização).....	44
2.3.3 Estrutura e Variação das Comunidades Endofíticas.....	45
2.3.4 Endófitos e o Cultivo in vitro	49
2.3.5 Investigação da Comunidade Endofítica	51
2.4 Considerações	54
Referências	54
3 MANIFESTAÇÃO ENDOFÍTICA E A MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE DUAS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Eucalyptus benthamii</i> SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	75
Resumo	75
Abstract.....	75
3.1 Introdução.....	76
3.2 Material e Métodos	77
3.2.1 Material Vegetal	77

3.2.2 Estabelecimento in vitro.....	78
3.2.3 Multiplicação in vitro.....	80
3.2.4 Experimentos de Multiplicação in vitro.....	80
3.2.4.1 Parâmetros Avaliados	82
3.2.4.2 Delineamento Experimental e Análise Estatística	82
3.2.5 Condições Cultivo.....	82
3.2.6 Análise Histoquímica.....	82
3.3 Resultados	84
3.3.1 Fonte de explante e Meio de cultivo	84
3.3.2 Sacarose e pH.....	86
3.3.2.1 Aspectos Morfofisiológicos	86
3.3.2.2 Oxidação	91
3.3.2.3 Massa Seca.....	91
3.3.2.4 Análise Histoquímica.....	92
3.3.2.5 Manifestação Endofítica	96
3.4 Discussão	97
3.5 Conclusão.....	105
Referências.....	105
4 COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA ASSOCIADA A DUAS FONTES DE	
EXPLANTE DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN & CAMBAGE.....	115
Resumo.....	115
Abstract	115
4.1 Introdução	116
4.2 Material e métodos.....	117
4.2.1 Material vegetal.....	117
4.2.2 Estabelecimento in vitro.....	118
4.2.3 Multiplicação in vitro.....	119
4.2.4 Alongamento e enraizamento in vitro	119
4.2.5 Avaliação da Comunidade Bacteriana Endofítica	120
4.2.6 Extração de DNA total.....	121
4.2.7 Amplificação do gene 16S rRNA de Bacteria	122
4.2.8 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	122
4.2.9 Análises Estatísticas.....	123
4.3 Resultados	123

4.3.1 Desenvolvimento das plantas	123
4.3.2 Variações na comunidade bacteriana entre os tratamentos avaliados	124
4.4 Discussão	131
4.5 Conclusões.....	135
Referências	136
5 CORRELAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO, DE DIFERENTES FONTES DE EXPLANTES DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MULTIPLICADAS IN VITRO, COM AS COMUNIDADES BACTERIANAS ENDOFÍTICAS	
Resumo	143
Abstract.....	143
5.1 Introdução	144
5.2 Desenvolvimento	144
5.3 Conclusão	149
Bibliografia Consultada.....	149

RESUMO

Estudo da comunidade bacteriana endofítica e de sua manifestação na micropropagação de *Eucalyptus benthamii*

Eucalyptus benthamii tem se mostrado especialmente vantajoso como alternativa ao cultivo em regiões frias, justificando esforços para o estabelecimento de protocolos para sua micropropagação. Porém, as matrizes são preferencialmente selecionadas quando adultas (material apresenta menor competência morfogênica), tornando a micropropagação dependente de maior número de subcultivos e maior tempo para se reverter o material ao rejuvenescimento. Assim, a redução das perdas in vitro tem merecido atenção, como por exemplo, as manifestações endofíticas, que exigem maximização da eficiência da cultura e adequações no protocolo, visando minimizá-las, possibilitando melhorar o entendimento das relações estabelecidas e mantidas entre os endófitos e seu hospedeiro durante a micropropagação. Dessa maneira, foram utilizadas minicepas provenientes de duas fontes de miniestacas coletadas a partir do brotamento de gemas epicórmicas de megaestacas da base da copa e de brotamentos do anelamento da base do tronco, de uma matriz de *E. benthamii* com 13 anos de idade, estabelecidas em minijardim clonal sob condição de casa de vegetação, com o objetivo de avaliar como se dá a multiplicação, sob diferentes condições de cultivo, das duas fontes de explantes (minicepas); analisar se a frequência e intensidade das manifestações endofíticas são afetadas pelas diferentes condições de cultivo; investigar a ocorrência de alterações na comunidade bacteriana endofítica devido à alteração das condições de cultivo e fase da micropropagação (in vivo = minicepas, e in vitro = microcepas, material alongado e enraizado). Visando atender estes objetivos, a pesquisa se dividiu em duas partes. Na primeira (capítulo 3) o desenvolvimento, os aspectos morfofisiológicos, histoquímicos e a manifestação endofítica foram avaliados na multiplicação das duas fontes de explante sob diferentes meios e condições de cultivo. Na segunda (capítulo 4) as comunidades bacterianas endofíticas foram analisadas por meio de PCR-DGGE, baseada na região V6 do gene 16S DNAr. Os resultados mostraram que as microcepas provenientes de megaestaca tiveram melhor desenvolvimento independentemente do tratamento e maior frequência de manifestações endofíticas, comparando-se com as de anelamento. As comunidades bacterianas endofíticas foram distintas entre as amostras in vivo e in vitro, e se alteraram ao longo dos subcultivos e nas amostras alongadas e enraizadas. As diferenças existentes no desenvolvimento das microcepas podem ser inerentes à totipotencialidade do material, mas também podem ser afetadas, tanto pela ocorrência de manifestação, quanto pela comunidade bacteriana endofítica mais ou menos sensível ao processo de micropropagação, auxiliando ou prejudicando o desenvolvimento in vitro de seus hospedeiros. Cabe destacar, ainda, que mesmo em um sistema asséptico e ambientalmente controlado, os microrganismos endofíticos que resistiram a todo processo de desinfestação e cultivo, não estão “adormecidos”, muito pelo contrário podem se alterar em quantidade à medida que seu hospedeiro é submetido a um novo sistema de cultivo (introdução) ou uma nova fase dentro da micropropagação (multiplicação → alongamento e enraizamento) ou, ainda, ao longo dos subcultivos. Sendo assim, a complexa rede de relações das plantas com seus endófitos não cessa durante o cultivo in vitro, ao contrário mantém-se dinâmica.

Palavras-chave: Micropropagação; Fontes de explante; Condições de cultivo; Manifestação endofítica; Desenvolvimento de microcepas; Aspectos morfofisiológicos; Dinâmica populacional endofítica; Análise independente de cultivo

ABSTRACT

Study of endophytic bacterial community and its manifestation in the micropropagation of *Eucalyptus benthamii*

Eucalyptus benthamii has proven to be especially advantageous as an alternative culture in cold regions, justifying efforts to establish protocols for micropropagation. However, the matrices are preferably selected when adults (material with lower morphogenic efficiency), making micropropagation more dependent of subcultures and too longer to reverse the material to rejuvenation. Thus, reduction of losses in vitro has deserved attention, such for example the endophytic manifestations that require the maximization of efficiency culture and adjustments to the Protocol, in order to minimize them, enabling better understanding of the relations established and maintained between endophytes and its host along micropropagation. For this, mini-stumps were used from two sources of mini-cuttings collected from the epicormic shoots of mega-cuttings from the treetop base and shoots from girdling from the trunk base, both of one *E. benthamii* matrix with 13 years of age established in clonal mini garden under greenhouse condition, aimed to evaluate how is the multiplication of two sources of explants (mini-stumps) under different growing conditions; analyze how the endophytic manifestations frequency and intensity are affected by different conditions; investigate the changes to occurrence in the endophytic bacterial community due to the variation of culture conditions and micropropagation phase (in vivo = mini-stumps, and in vitro = micro-stumps, elongated and rooted materials). In order to meet these objectives, the research was divided in two parts. In the first (chapter 3) the development, morphophysiological aspects, histochemical and endophytic manifestation were evaluated in the multiplication of the two explants sources from different media and culture conditions. In the second (chapter 4) endophytic bacterial communities were analyzed by PCR-DGGE based on the V6 region of 16S rDNA gene. The results showed that micro-stumps from mega-cuttings had better development regardless of treatment and increased frequency of endophytic events, comparing with the girdling. Endophytic bacterial communities were different between samples in vivo and in vitro, and have changed over the subcultures and the elongated and rooted samples. The differences in the development of micro-stumps can be explained by the totipotentiality inherent to the material, but may also be affected by both the manifestation occurrence and the endophytic bacterial community more or less sensitive to the micropropagation, helping or harming the in vitro development of their hosts. We also highlight that even in an aseptic and environmentally controlled system, the endophytic microorganisms that resisted the whole process of disinfection and cultivation, are not "asleep", quite the opposite may change in quantity when your host is subjected to a new cultivation system (in vitro establishment) and a new phase within the micropropagation (multiplication → stretching and enraizamiento), or even along the subcultures. This way, the complex network of relationships of the plant with their endophyte does not cease during the in vitro culture, unlike remains dynamic.

Keywords: Micropropagation; Explant sources; Culture conditions; Endophytic manifestation; Micro-stumps development; Morphophysiological aspects; Endophytic population dynamics; Independent cultivation analysis

1 INTRODUÇÃO

Eucalyptus benthamii Maiden & Cambage é uma espécie recomendada para o plantio em regiões mais frias, devido a sua tolerância à geadas (BRONDANI et al., 2012; JOVANOVIĆ; BOOTH, 2002; MUJIU et al., 2003). No entanto, a expansão dos plantios tem sido limitada pelas dificuldades encontradas na sua propagação, ou seja, as sementes quando disponíveis são de alto custo, e sua propagação, apresenta-se recalcitrante ao enraizamento de estacas e à incompatibilidade à enxertia (AGGARWAL et al., 2012; VENGADESAN; PIJUT, 2009). Nesse caso o uso da cultura de tecidos tem se justificado, porém, como na maioria das vezes o material utilizado é oriundo de planta adulta e, portanto, morfogeneticamente menos responsivo, tornando o processo de micropropagação mais delicado e dependente de maior tempo e número de subcultivos (são necessários pelo menos 10 subcultivos) para se alcançar o rejuvenescimento do material (ALFENAS et al., 2004; BACCARIN, 2012; BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). No entanto, este procedimento, tem favorecido o crescimento de microrganismos no meio de cultura, que podem interferir no desenvolvimento das microcepas e levar ao descarte de material.

À medida que os prejuízos aumentaram, pesquisas foram realizadas no sentido de entender o porquê da recorrência desse evento. As descobertas convergiram para o fato de que a cultura de tecidos não era mais utilizada apenas como propagação rápida de material de interesse, mas também passou a ser usada como importante ferramenta de conservação genética (THOMAS, 2004; THOMAS; PRAKASH, 2004), e mais recentemente, como responsável por reverter ou recuperar a juvenilidade de explantes de matrizes adultas (BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012). Nos dois últimos casos houve a necessidade em se manter o material sob condições *in vitro* por um tempo prolongado, desencadeando, cada vez mais, o crescimento indesejado e inexplicável de microrganismos no meio de cultivo.

Trabalhos iniciais, visando entender este fenômeno, atribuíram a este crescimento o conceito de contaminação microbiana ocasionada por falhas durante a desinfestação dos explantes ou problemas referentes ao manuseio nas subculturas (PANICKER et al., 2007; THOMAS et al., 2008). No entanto, com o avanço dos estudos, este evento passou a ser considerado como resultado de um cultivo prolongado que ocorre, na maioria das vezes, em respostas às alterações microambientais, e denominado de manifestação endofítica (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2009; THOMAS; KUMARI, 2010).

Para entender este conceito, antes se deve compreender que os microrganismos, associados às plantas, podem ser classificados, de acordo com a região que colonizam, em epifíticos (habitam a superfícies de folhas ou hastes) ou endofíticos (microrganismos que em alguma etapa de seu desenvolvimento colonizam a endosfera, ou interior dos tecidos vegetais, sem causar danos ao hospedeiro) (AZEVEDO et al., 2000; HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008; IKEDA et al., 2010; PINI et al., 2012; THOMAS; KUMARI, 2010). Dessa maneira, nas fases iniciais da micropropagação o crescimento de microrganismos que se observa, pode ser atribuídas às falhas na desinfestação e, conseqüentemente, falhas na eliminação dos epifíticos, contudo, à medida que as fases avançam (multiplicação, por exemplo) a ocorrência de contaminações, por epifíticos, diminui (ou é ausente), e o crescimento de endofíticos latentes pode ser verificado, principalmente se o período de cultivo *in vitro* for longo, ou se ocorrerem variações drásticas nas condições de cultivo (estresses físicos, mecânicos ou nutricionais). Segundo Thomas e Kumari (2010), a manifestação repentina dos endófitos no meio de cultura pode ser explicada, principalmente, por flutuações na luminosidade e temperatura.

Sabe-se que no ambiente as populações bacterianas endofíticas são flutuantes, ou seja, alteram-se em número e espécie, respondendo, principalmente, às variações das condições ambientais (regime de luz, de chuvas, temperatura, geadas, nutrição do solo, patógenos, outras espécies adjacentes, entre outros) (ARDANOV et al., 2012; BARROS; ARAÚJO; AZEVEDO, 2010; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; DAVITT; CHEN; RUDGERS, 2011; GAGNE-BOURGUE et al., 2013; HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008; ISLAM et al., 2010). As pressões ocasionadas por um sistema de cultivo tão restritivo tem mostrado que, em número de espécies, essas comunidades são bem menores, quando comparadas às plantas do campo (ULRICH; STAUBER; EWALD, 2008). Mas como essas populações variam (em diversidade) no ambiente *in vitro*, nos quais as condições nutricionais, de luz, água, temperatura e pH são controladas, mantendo-se sempre constantes, e no qual os tecidos que originam as microplantas são sadios (sem competições com patógenos), ainda permanece sem resposta.

Estudos têm mostrado que as plantas abrigam uma vasta gama de microrganismos, que formam uma comunidade biológica complexa (MENGONI; SCHAT; VANGRONSVELD, 2010; PINI et al., 2012; RYAN et al., 2008), e estão relacionados a uma série de funções metabólicas com alto grau de complexidade na planta, auxiliando-a a se adaptar aos mais diferentes habitats (ARDANOV et al., 2012; BURLAK et al., 2013; IKEDA et al., 2013; LELIE et al., 2009). No entanto, surge o questionamento se no ambiente *in vitro* estes

microrganismos poderiam interferir no desenvolvimento, favorecendo ou prejudicando a espécie hospedeira.

Sabe-se que a fonte de explante pode interferir no sucesso da micropropagação (BORGES et al., 2011; HARTMANN et al., 2011; LIMA; MORAES, 2006; SILVA et al., 2011), devendo-se, sempre escolher aquele com alta capacidade de resposta morfogênica às condições de cultivo in vitro. Entretanto, além dos fatores genéticos e epigenéticos, o sucesso da micropropagação de uma determinada fonte de explante pode estar relacionado à presença de microrganismos endofíticos que, por sua vez, variam em abundância e diversidade nos diferentes órgãos e tecidos de uma única planta (ABREU-TARAZI et al. 2010; ALMEIDA et al. 2005, 2009; DIAS et al. 2009; ESPOSITO-POLESI, 2011; HUANG et al., 2008; POLESI, 2010).

A essas regiões específicas dentro da planta hospedeira dá-se o nome de nicho, isto é, o ambiente que fornece as condições ideais de crescimento e desenvolvimento do microrganismo e no qual eles estabelecem e desempenham seus papéis biológicos de uma maneira mais eficiente. Eles têm sido relatados colonizando os espaços intercelulares, mas Almeida et al. (2009), comprovaram a existência de microrganismos intracelulares, ou seja, endossimbiontes, os quais vivem no interior das células, estabelecendo dessa forma uma condição muito mais restrita de interdependência entre eles e a planta hospedeira, e certamente alterando de forma direta o metabolismo destas células e consequentemente do tecido, do órgão e da planta, o que pode ser crucial na cultura in vitro. Por essa razão, a qualidade do explante associada à microbiota endofítica presente no explante é capaz de gerar respostas que irão determinar ou não a qualidade da microplanta produzida.

Sendo assim, partindo do pressuposto que estão presentes nos vegetais no momento do estabelecimento in vitro, levanta-se a dúvida se as condições micro-ambientais poderiam estimular ou induzir o crescimento de endófitos no meio de cultivo (manifestação endofítica). O que se sabe é que ao escolher uma fonte de explante, invariavelmente seleciona-se uma comunidade endofítica que pode em maior ou menor grau interferir nas manifestações. Isto significa que o processo de micropropagação, ao envolver condições ambientais tão restritas, passa a ser o responsável por alterações significativas na comunidade bacteriana associada ao vegetal, podendo, em última análise interferir nas relações estabelecidas entre os endófitos e seus hospedeiros, potencializando, ou não, as chances de crescerem no meio de cultivo.

Esses dois fatores (manifestações microbianas e nicho de explante) são extensivamente estudados em diversos trabalhos com micropropagação de plantas, um exemplo disso, tem sido os trabalhos com eucalipto, mais precisamente em clones de

Eucalyptus benthamii (BACCARIN, 2012; BRONDANI, 2012; PIOTTO, 2013), nos quais se observa que a qualidade do cultivo in vitro, bem como a presença de manifestações no meio de cultura, são diretamente influenciadas pelo nicho e pelo explante utilizado, além das diferentes condições de cultivo a que são expostos. Dessa forma, estudos aprofundados são necessários para melhor compreender a associação dos microrganismos endofíticos com as plantas, de maneira a identificar as condições que mais favorecem o cultivo in vitro sem a manifestação desses microrganismos, bem como compreender e avaliar a comunidade bacteriana endofítica nos diferentes nichos e sob diferentes condições de cultivo. Sendo assim, as seguintes hipóteses fundamentaram este trabalho: 1 – Alterações nas condições in vitro (meio, concentração de sacarose e pH) interferem no desenvolvimento e na manifestação endofítica durante a multiplicação in vitro? 2 – Essas alterações são capazes de gerar respostas distintas em explantes de uma mesma planta matriz obtidos de duas regiões (megaestaca e anelamento)? 3 – As diferentes fontes de explantes apresentam a mesma microbiota bacteriana endofítica? 4 – A microbiota bacteriana endofítica presente nas minicepas in vivo permanece nas microcepas in vitro? 5 – Essa microbiota se distingue e varia ao longo dos subcultivos e nas diferentes fases da micropropagação?

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a manifestação endofítica na multiplicação in vitro de duas fontes de explantes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage em diferentes condições de cultivo, bem como comparar a comunidade bacteriana endofítica frente a alteração dessas condições nas diferentes fases da micropropagação.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) avaliar o comportamento, de duas fontes de explantes (megaestaca da base da copa e anelamento da base do tronco) de um clone de *E. benthamii*, na multiplicação in vitro sob diferentes condições de cultivo, por meio de aspectos morfofisiológicos e histoquímicos;
- b) analisar se a frequência e intensidade de manifestações endofíticas podem ser afetadas por estas diferentes condições de cultivo;
- c) investigar a existência de alterações na comunidade bacteriana endofítica em decorrência da alteração das condições de cultivo e da fase de micropropagação (in

vivo e in vitro, sendo multiplicação, alongamento e enraizamento), por meio de técnicas independentes de cultivo;

- d) correlacionar os resultados de modo a fornecer subsídios para o entendimento das relações endófito/hospedeiro no cultivo in vitro.

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, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; SHARMA, J.; REDDY, M.S. Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm, **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 521-529, 2012.

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

ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 10, 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, n. 5, p. 467-470, 2005.

ARDANOV, P.; SESSITSCH, A.; HAGGMAN, H.; KOZYROVSKA, N.; PIRTILÄ, A.M. *Methylobacterium*-induced Endophyte Community Changes Correspond with Protection of Plants against Pathogen Attack. **Plos One**, Alabama, v. 7, n. 10, p. 1-8 (e46802), 2012.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JÚNIOR., 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.

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

BACCARIN, F.J.B; BRONDANI, G.E.; ALMEIDA, L.V. VIEIRA, I.G. OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, Dordrecht, 2015. DOI 10.1007/s11056-015-9472-x.

BARROS, I.A.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. The effect of different growth regimes on the endophytic bacterial communities of the fern, *Dicksonia sellowiana* hook (Dicksoniaceae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n.4, 956-965, 2010.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.D.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C. Multiplicação in vitro de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 173-182, 2011.

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

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

BURLAK, O.P.; de VERA, J.P.; YATSENKO, V.; KOZYROVSKA, N.O. Putative mechanisms of bacterial effects on plant photosystem under stress. **Biopolymers and Cell**, Kiev, v. 29, n. 1, p. 3-10, 2013.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.

DAVITT, A. J.; CHEN, C.; RUDGERS, J.A. Understanding context-dependency in plant-microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, n. 2, p. 137-145, 2011.

DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPCÃO, L.C.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.

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

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

GAGNE-BOURGUE, F.; ALIFERIS, K. A.; SEGUIN, P.; RANI, M.; SAMSON, R.; JABAJI, S. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 114, n. 3, p. 836-853, 2013.

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

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

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 33, n.1, p. 61-75, 2008.

IKEDA, A.C.; BASSANI, L.L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V.K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M.B.R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L.V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, New York, v. 65, n. 1, p. 154-160, 2013.

IKEDA, S.; OKUBO, T.; ANDA, M.; NAKASHITA, H.; YASUDA, M.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; EDA, S.; MOMIYAMA, A.; KIMIHIRO TERASAWA, K.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Community- and Genome-Based Views of Plant-Associated Bacteria: Plant-Bacterial Interactions in Soybean and Rice. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, n. 9, p. 1398-1410, 2010.

ISLAM, S.M.A.; MATH, R.K.; KIM, J.M.; YUN, M.G.; CHO, J.J.; KIM, E.J.; LEE, Y. H.; YUN, H.D. Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. **Current Microbiology**, New York, v. 61, n. 4, p. 346-356, 2010.

JOVANOVIĆ, T.; BOOTH, T.H. **Improved species climatic profiles**. Australia: Union Offset Printing, Joint Venture Agroforestry Program, Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. 68p.

LELIE, D. van der; TAGHAVI, S.; MONCHY, S.; SCHWENDER, J.; MILLER, L.; FERRIERI, R.; ROGERS, A.; WU, X.; ZHU, W.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J.; NEWMAN, L. Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.

LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação in vitro de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 13-19, 2006.

MENGONI, A.; SCHAT, H.; VANGRONSVELD, J. Plants as extreme environments? Niresistant bacteria and Ni-hyper accumulators of serpentine flora. **Plant and Soil**, The Hague, v. 331, n. 1-2, p. 5-16, 2010.

MUJIU, L.; ARNOLD, R.; BOHAI, L.; MINSHENG, Y. Selection of cold-tolerant eucalypts for Hunan Province. In: TURNBULL, J.W. (Ed.). **Eucalyptus in Asia**: proceedings of an international conference held in Zhanjiang, Guangdong, people's Republic of China. Canberra: Elect Printing, 2003. p. 107–116. (ACIAR. Proceedings, 111).

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**, Columbia, v. 43, n. 1, p. 614-622, 2007.

PINI, F.; FRASCELLA, A.; SANTOPOLO, L.; BAZZICALUPO, M.; BIONDI, E. G.; SCOTTI, C.; MENGONI, A. Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 78, p. 1-10, 2012.

PIOTTO, K.D.B. **Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento in vitro de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. 2013. 157p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

POLESI, N.P.E. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. 2010. 120p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

SILVA, I.M.D.C.D.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B.; BIANCHI, V.J. Resposta diferencial ao uso do Thidiazuron na regeneração in vitro de marmeleiros, cvs. ADAMS E MC. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 3/4, p. 375-382, 2011.

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, n. 2, p. 173-179, 2004.

THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, n.1, p. 469-474, 2010.

THOMAS, P.; PRAKASH, G. S. Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years in vitro. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 1, p. 603-607, 2004.

THOMAS, P.; SWARNA, G.K.; PATIL, P.; RAWAL, R.D. Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, n. 1, p. 39-54, 2008.

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, n. 3, p. 347-351, 2008.

VENGADESAN, G.; PIJUT, P. M. In Vitro propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 45, n. 4, p. 474-482, 2009.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* (Myrtaceace) compreende aproximadamente 700 espécies distribuídas no planeta (AGGARWAL et al., 2012; BROOKER, 2000). A maior parte delas tem origem no continente Australiano e ilhas adjacentes, sendo que algumas espécies ocorrem naturalmente em Papua Nova, Timor, Sonda, Flores, Wetar (oeste do arquipélago da Indonésia) e nas Filipinas (PRYOR; WILLIAMS; GUNN, 1995; SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005). Porém, sua capacidade de adaptação juntamente com o rápido crescimento e a alta qualidade da madeira tem impulsionado a sua rápida adoção para o plantio florestal em mais de 100 países em seis continentes ($\approx$ 20 milhões de ha), fazendo com que o eucalipto seja o mais cultivado em todo o mundo (MYBURG et al., 2014). Entre as espécies mais utilizadas nestes plantios estão *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus camaldulensis* além de seus híbridos que compreendem 80% da área plantada mundial de espécies do gênero (POTTS; DUNGEY, 2004).

Seu plantio garante o fornecimento de recursos renováveis essenciais para a produção de celulose, papel, biomateriais e bioenergia, além da grande diversidade e alta concentração de óleos essenciais, muitos dos quais têm funções ecológicas, medicinais e industriais (MYBURG et al., 2014).

No Brasil foi introduzido na região Sudeste do Brasil em meados de 1904, com o objetivo de suprir as demandas de lenha, postes e dormentes (DOSSA et al., 2002), desde então, tem se estabelecido como uma das maiores culturas produzidas, com plantações estabelecidas em mais de 500 municípios, principalmente para a produção de celulose, papel, lenha e carvão vegetal (PINTO JÚNIOR et al., 2013), atingindo a marca de 20% da área plantada no mundo, ficando atrás apenas da Índia, com 22% (GIT FORESTRY CONSULTING - GFC, 2013). Em 2012 (Figura 1) seu plantio, atingiu mais de cinco hectares, com destaque à região sudeste com 53% desse total (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013).

Figura 1 - Crescimento da área plantada com florestas de *Eucalyptus* spp. no Brasil, desde 2006 até 2012 e distribuição dessas áreas pelo país, com destaque à região Sudeste

Fonte: ABRAF (2013)

Essa significativa exploração comercial no Brasil se deve, principalmente, à multiplicidade de seus usos com aproximadamente 70% do volume de eucalipto para a indústria de celulose e papel, 25% para a produção de lenha e 5% para produção de carvão. Sua produtividade se destaca por ser das mais elevadas do mundo, com taxas que variam de 38 a 54 m³.ha⁻¹.ano⁻¹ (STAPE, 2008). Contudo, as condições climáticas limitam a expansão dos plantios comerciais de *Eucalyptus* nas regiões mais frias e de elevada altitude no Brasil, principalmente devido à ocorrência de geadas frequentes, comprometendo significativamente a produtividade (OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2014).

Dentre as diversas espécies do gênero *Eucalyptus*, a espécie de *Eucalyptus benthamii* tem sido amplamente estudada, devido, principalmente a sua alta capacidade de resistência à geadas, o que permite seu cultivo em algumas regiões do país, nas quais as geadas são constantes (BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012; JOVANOVIC; BOOTH, 2002; MUJIU et al., 2003). Seu uso, porém, tem sido limitado devido às dificuldades encontradas na sua propagação. As sementes, quando disponíveis são de alto custo, e a propagação assexuada, por sua vez, possui várias restrições quanto ao enraizamento de estacas e à incompatibilidade ao enxerto (AGGARWAL et al., 2012; VENGADESAN; PIJUT, 2009).

2.2 Micropropagação

Visando atender as demandas na propagação de eucalipto, a micropropagação tem despontado como alternativa eficaz. Esta técnica pode ser definida como o cultivo

(crescimento e multiplicação) de órgãos, ou tecidos e, até mesmo, de células vegetais isoladas, que podem dar origem a plantas inteiras, diretamente do explante ou indiretamente através de calos em ambiente artificial sob condições assépticas controladas, (XIAO; NIU; KOZAI, 2011). Baseia-se na capacidade da totipotência das células a partir de um explante (célula ou qualquer fragmento de tecido ou órgão), permitindo a propagação de células ou organismos, obtendo-se uma nova planta geneticamente idêntica à ancestral (PALMA et al., 2011; TORRES et al., 2000).

A micropropagação tem sido utilizada para multiplicação de espécies de difícil multiplicação, limpeza clonal, conservação e intercâmbio de germoplasma, além de programas de melhoramento genético de plantas (CARVALHO et al., 2007; FIGUEIREDO et al. 2008; LIMA; MORAES, 2006; PALMA et al., 2011; RIBAS et al., 2005; TORRES et al., 1998), permite que um grande número de plantas, idênticas a planta matriz, seja obtido a partir de alguns explantes num curto período de tempo e dentro de uma pequena área (BRONDANI et al., 2012; DAVEY; ANTHONY, 2010; NEHRA et al., 2005), produzindo mudas livres de doenças, independentemente da época e condições meteorológicas (CHANDRA et al., 2010; LIMA; MORAES, 2006; XIAO; NIU; KOZAI, 2011). Além disso, podemos acrescentar as vantagens o aumento da taxa de multiplicação de clones valiosos, ganhos genéticos rápidos e maiores rendimentos de plantações, devido ao aumento produtividade (AGGARWAL et al., 2012; NAVROSKI et al., 2014).

Na área florestal, a micropropagação, esta presente nos programas de melhoramento, que, na maioria das vezes, objetivam a maximização ou a manutenção do valor genético do clone a ser propagado, permitindo, assim, acelerar os métodos convencionais de propagação (reprodução assexuada), outra finalidade é a maximização da produção de madeira em quantidade e qualidade desejáveis, mantendo as características favoráveis evitando a variabilidade encontrada em árvores obtidas a partir de sementes (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000; NAVROSKI et al., 2013; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

O eucalipto é um gênero silvicultural para os quais as técnicas de micropropagação têm sido extensivamente estudadas (BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Os primeiros trabalhos relatados com o cultivo in vitro de eucalipto datam da década de 60. E é recomendada quando: a) outras técnicas de propagação vegetativa não apresentam resultados satisfatórios para determinadas espécies; b) a árvore selecionada não pode ser rejuvenescida por meio da promoção de brotações basais; e c) quando se deseja aumentar a taxa de propagação e abreviar o tempo para seu uso comercial (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Atualmente, o uso da micropropagação em *Eucalyptus* tem se justificado, comercialmente, para o rejuvenescimento de materiais adultos, buscando melhorar os índices de enraizamento, que é sensivelmente afetado quando do uso desse tipo de material (MANKESSI et al., 2010; SULICHANTINI et al., 2014; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). Segundo Wendling e Xavier (2003) uma das características mais importantes que expressa a maturação das plantas lenhosas é a transição da alta capacidade de enraizamento para a baixa taxa de emissão de raízes. Porém, a micropropagação tem se despontado como uma ferramenta eficaz para reverter a maturação restituindo as características de juvenilidade do material, num processo conhecido como rejuvenescimento (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; GONÇALVES, 1982; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). De acordo com a literatura, para o gênero *Eucalyptus* o rejuvenescimento in vitro tem sido obtido com sucesso, utilizando de 10 a 12 subcultivos sucessivos (ALFENAS et al., 2004; BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

O processo de micropropagação inclui a seleção, desinfestação e cultivo dos explantes em meio nutritivo e sob condições assépticas; a multiplicação dos propágulos em sucessivos subcultivos; e o enraizamento das partes aéreas em meio de enraizamento com subsequente aclimatização em ambiente ex vitro (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; MURASHIGE, 1974). O processo de desinfestação objetiva eliminar os microrganismos epifíticos e contaminantes que possam interferir no cultivo asséptico das microplantas. Os procedimentos de desinfestação podem variar em função do tipo e origem do explante, da época do ano e do ambiente onde são coletados, mas geralmente utiliza-se como agente desinfestante o hipoclorito de sódio (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

Já no estabelecimento in vitro o objetivo é possibilitar a acomodação e desenvolvimento dos explantes evitando ao máximo os possíveis danos desse tipo de cultivo (BORGES et al., 2011; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). A multiplicação como o próprio nome diz, visa aumentar consideravelmente o número de propágulos sem perder de vista os aspectos qualitativos dos explantes, entre eles o mínimo de variação dos explantes e homogeneidade da parte aérea produzida, que vão determinar o sucesso nas fases seguintes de enraizamento e aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; OLIVEIRA et al., 2011). Um dos principais desafios nesta etapa é estabelecer as melhores combinações e tipos de reguladores de crescimento, que proporcionem o crescimento e desenvolvimento adequados dos explantes,

especialmente quando se trata de espécies lenhosas (BRONDANI et al., 2012; ILIEV et al., 2010; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

Diversas variáveis podem influenciar na fase de multiplicação, entre elas a composição do meio de cultura utilizado, o ambiente de crescimento e a manipulação do material vegetal durante os subcultivos. Dependendo dos objetivos da micropropagação, deve-se atentar para o tempo e número de subcultivos necessários durante a multiplicação, até alcançar estádios vegetativos com reatividade das gemas, de acordo com os interesses da propagação (XAVIER; OTONI, 2009).

O alongamento das brotações pode ocorrer de maneira simultânea à multiplicação, para eucalipto isso é até desejável (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Mas em alguns casos, o alongamento pode se constituir em uma fase diferente, na qual é possível estimular o alongamento das brotações, reduzindo a concentração hormonal, principalmente de citocininas (BRONDANI et al, 2012), ou ainda, removê-las por completo do meio de cultivo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na sequência ao alongamento ocorre a indução do enraizamento das brotações alongadas. Este processo pode ocorrer tanto no ambiente *in vitro*, com condições assépticas e alteração do balanço auxina/citocinina; quanto em ambiente *ex vitro*, no qual a indução do enraizamento ocorre em condição de casa de vegetação (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). A opção por um dos sistemas depende da qualidade das partes aéreas obtidas na multiplicação, da espécie, do genótipo e da infraestrutura adequada (SANTOS; WENDLING; GROSSI, 2004). Entretanto o enraizamento *ex vitro* tem sido apontado como a melhor opção, pois reduz as perdas ocorridas com quebras das raízes formadas *in vitro* durante o transplante, além disso, este processo diminui o uso de reguladores de crescimento e melhora a aclimatização e a qualidade do sistema radicular (BRONDANI et al., 2012; WENDLING et al., 2010).

A última etapa do processo de micropropagação se constitui na aclimatização das microplantas, objetivando reduzir o estresse causado pela diferença entre os ambientes *in vitro* (condições assépticas e heterotróficas) e *ex vitro* (autotrófica e em condições de casa de vegetação, com inúmeros fatores a se adaptar: umidade, substrato, irradiância e oferta nutricional), se caracterizando como a etapa na qual ocorrem as maiores perdas (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

Inúmeros são os fatores que influenciam a micropropagação, tais como, tipo de explante, meio de cultivo, fonte e concentração de açúcares e reguladores de crescimento, taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma,

coloração e tamanho das folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimatização (LIMA; MORAES, 2006; NAVROSKI et al., 2014). Uma desordem em qualquer destes fatores pode culminar em alterações morfofisiológicas nocivas ao desenvolvimento da planta (PALMA et al., 2011).

Por essa razão muitos estudos buscam a otimização de protocolos, adequando-os a cada espécie (ALMEIDA, 2012; BACCARIN, 2012; BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012; GRANER, 2009). Segundo Kerbauy (1997), a otimização do tempo de cultivo e a obtenção de características genéticas esperadas dependem do estabelecimento de um protocolo que combine adequadamente os fatores da composição do meio de cultura e condições de cultivo.

2.2.1 Escolha do Explante

Culturas de tecidos vegetais são iniciadas a partir de pequenos pedaços de plantas, chamados explantes, tomados a partir de qualquer parte (AHLOOWALIA et al., 2004). Os explantes são constituídos de um conjunto de células em variados estádios fenológicos, fisiológicos e bioquímicos. Dessa forma, diferentes fontes de explantes são testadas para micropropagação, buscando o material com melhor resposta morfogenética, levando-se em conta o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação (HARTMANN et al., 2011; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013; SCHUCH et al., 2008; WENDLING; DUTRA; GROSSI, 2006; WENDLING; XAVIER, 2003).

O genótipo do material colocado em cultura e o estado da planta-matriz, também, influenciam fortemente a morfogênese, no crescimento e nas taxas de multiplicação *in vitro*. Usualmente verifica-se variabilidade clonal no desenvolvimento *in vitro*, com genótipos que respondem positivamente à condição *in vitro* e a diferentes meios de cultura, e clones que necessitam de ajustes específicos no meio de cultura e nas condições de cultivo (BORGES et al., 2011; GEORGE; DEBERGH, 2008; SOBROSA; CORDER, 2003). Por essa razão a escolha do explante para introdução no cultivo *in vitro* está relacionada com a viabilidade e produtividade do material, ou seja, a capacidade de resposta que o material possui em regenerar plantas inteiras (TORRES et al., 2000). Diferenças significativas nessa capacidade estão relacionadas ao se variar o tipo de explante e a época de coleta (BORGES et al., 2011; HARTMANN et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Outro aspecto que deve ser considerado consiste na idade do material a ser utilizado, uma vez que durante a transição da fase juvenil para adulta, algumas espécies sofrem

alterações ponderáveis e a maturação pode causar variações na capacidade propagativa, principalmente quanto ao potencial de clonagem. (HARTMANN et al., 2011; SCHUCH et al., 2008; WENDLING; XAVIER, 2003). Sendo assim, o uso de material adulto, como fonte de explante, no caso de espécies lenhosas, deve priorizar a seleção dos explantes a partir de brotações fisiologicamente ativas em estágio primário de crescimento, ou seja, mesmo sendo árvores adultas, os explantes devem possuir características juvenis (HARTNEY, 1980; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

Alguns estudos tem testado o uso de brotações epicórmicas a partir de galhos ou ramos, os quais são colocados em condições ambientais adequadas (casa de vegetação) para a emissão das brotações e, ao atingirem tamanho adequado, são estaqueadas e, ou, enxertadas para a formação de mudas, que serão posteriormente utilizadas como fontes explantes para o cultivo in vitro. (ALMEIDA et al., 2007; BACCARIN, 2012; BACCARIN et al., 2015; WENDLING et al., 2013; XAVIER; SANTOS, 2002). O anelamento na base do tronco é uma alternativa indicada para obtenção de explantes (ALFENAS et al., 2004), no qual faz-se a incisão de cerca de 1-2 cm de espessura em torno da circunferência do caule, na base da árvore a cerca de 10-15 cm de altura em relação ao solo, a uma profundidade suficiente para interromper o líber, porém, que não danifique o lenho, e, após aproximadamente 20 dias, é possível observar brotações sendo emitidas na região inferior da incisão, e aos 45-50 dias coleta-se estas brotações para a extração das estacas que serão acondicionadas em casa de vegetação e, também servirão como fonte de explantes (BACCARIN, 2012; BACCARIN et al., 2015; HARTNEY, 1980; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). Algumas plantas podem morrer quando do anelamento total, por essa razão pode-se proceder o semi-anelamento ou anelamento parcial, evitando perdas de matrizes com alto potencial econômico e valor genético.

No caso específico de *Eucalyptus*, as fontes de explantes para inoculação in vitro provêm de matrizes cultivadas em ambiente protegido, mini ou microjardim clonal, brotações epicórmicas de árvores adultas, brotações de árvores decepadas ou ainda de galhos podados. (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Na sua grande maioria, tem se utilizado a proliferação de gemas axilares provenientes de explantes obtidos tanto de plântulas como de material adulto, por ser simples comparativamente aos sistemas de micropropagação por embriogênese somática e apresenta resultados satisfatórios (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; GOMES; CANHOTO, 2003; WATT, 2014; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). Avaliações realizadas em campo com plantas micropropagadas de *Eucalyptus*, por meio de proliferação de gemas axilares, apresentam altas taxas de crescimento e

uniformidade, comparáveis ou superiores àquelas obtidas de sementes ou produzidas pela estaquia (WATT et al., 2003).

2.2.2 Meio de Cultivo

Os meios de cultura utilizados na micropropagação fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento in vitro (CALDAS et al., 1998), podem ser sólido, semi-sólido ou líquido, dependendo da presença ou ausência de agentes geleificantes (PRAKASH; HOQUE; BRINKS, 2004). Durante as últimas décadas, muitos tipos de meio têm sido desenvolvidos no cultivo in vitro. Composições de meio foram formuladas para diversas plantas e tecidos específicos. Em geral, a escolha do meio é ditada pelo propósito e a espécie da planta ou variedade a ser cultivada.

Os meios de cultura mais utilizados na micropropagação do eucalipto estão descritos na Tabela 1, sendo eles: o MS desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), o WPM (Woody Plant Medium), formulado por Lloyd e McCown (1980) e o JADS elaborado por Correia et al. (1995) (ALMEIDA, 2012; ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES, 2006; BILLARD; LALLANA, 2005; BORGES et al., 2011; BRAVO et al., 2008; BRONDANI et al., 2009; 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; GLOCKE, et al., 2006; GRAÇA et al., 2001; OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2014; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000; SOBROSA; CORDER, 2003; WATT, 2014; WATT et al., 2003).

Tabela 1 - Composição nutricional dos meios de cultura WPM , MS e JAD utilizados na micropropagação do gênero *Eucalyptus*

COMPONENTE	PESO MOLECULAR	MEIOS DE CULTIVO		
		WPM	MS	JADS
Macronutrientes	(g L⁻¹)	(mg L⁻¹)		
NH ₄ NO ₃	80,04	400	1.650,00	320
KNO ₃	101,11	–	1.900,00	809
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	96	440	–
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,15	556	–	1.181,00
KH ₂ PO ₄	136,09	170	170	408
K ₂ SO ₄	174,26	990	–	–
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	370	370	739,5
Micronutrientes	(g)	(mg L⁻¹)		
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	372,24	37,3	37,3	74,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	278,02	27,8	27,8	55,6
MnSO ₄ .H ₂ O	169,01	16,9	16,9	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,54	8,6	8,6	16,9
H ₃ BO ₃	61,83	6,2	6,2	3,1
KI	165,99	–	0,83	–
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	0,25	0,025	1,25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95	0,25	0,25	0,15
CoCl ₂ .6H ₂ O	237,93	–	0,025	0,25
Vitaminas	(g)	(mg L⁻¹)		
Tiamina-HCl	337,3	1	0,1	5,0
Piridoxina-HCl	205,6	1	0,5	0,5
Ácido nicotínico	123,11	1	0,5	0,5
Pantotenato Ca ²⁺	476,54	1	–	2,4
Biotina	244,3	0,01	–	–
Aminoácidos	(g)	(mg L⁻¹)		
Cisteína	121,16	–	–	5,0
Glicina	75,07	1,0	2,0	–
Fonte de carbono	(g)	(mg L⁻¹)		
Mio-inositol	180,16	100	100	100
Sacarose	342,3	30.000,00	30.000,00	30.000,00

O meio de cultivo MS (Tabela 1) e suas modificações são os mais utilizados comercialmente (LEIFERT et al., 1991). Já o WPM (Tabela 1) foi desenvolvido especialmente para espécies lenhosas com composição salina inferior ao do MS e com maior

oferta de Tiamina (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), sendo bastante utilizado na promoção da calogênese e da organogênese (GLOCKE et al. 2006; WERNER et al., 2010) além de ser considerado o mais apropriado para a multiplicação de gemas adventícias de *E. benthamii* em comparação com os meios de cultura MS ou JADS (BRONDANI et al., 2012). O JADS (Tabela 1), por sua vez, é específico para o gênero *Eucalyptus*, e sua formulação foi baseada em testes e pesquisas sobre as exigências nutricionais de *E. grandis* Hill (ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES, 2006; BRAVO et al., 2008; SANTOS; WENDLING; GROSSI, 2004).

Mesmo o JADS tendo sido desenvolvido para o gênero, observa-se variações nas respostas dependendo do genótipo a ser micropropagado, havendo melhores resultados usando-se um ou outro meio. Segundo Souza et al. (2006) o comportamento em razão do tipo e composição do meio de cultura varia não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos de uma mesma espécie e até entre explantes de um mesmo genótipo, por apresentarem demandas específicas. Em estudos com *Eucalyptus saligna*, por exemplo, ao testar os meios MS, WPM e JADS na organogênese em explantes cotiledonares, Dibax et al. (2010a) obtiveram como melhor resposta o uso do meio MS seguido do meio WPM, 57,5 e 55% respectivamente.

Para a multiplicação in vitro dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, os meios de cultura MS e JADS foram os mais adequados, com tendência de melhores resultados do meio MS na segunda e terceira introduções in vitro (BORGES et al., 2011). Entretanto para a multiplicação de *Eucalyptus erythronema* x *E. stricklandii* (GLOCKE et al. 2006), *Eucalyptus globulus* (PINTO et al. 2008), *Eucalyptus camaldulensis* (DIBAX et al., 2010b) e *Eucalyptus benthamii* (BRONDANI et al., 2012) o WPM foi o melhor.

Ressalta-se ainda que de acordo com a etapa da micropropagação as exigências também se alteram, havendo em muitos casos a necessidade de se modificar o meio. Um exemplo disso foi o trabalho que avaliou a organogênese do híbrido *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*, e obteve como o meio de cultura mais indicado para formação de gemas o MS com metade dos sais e os meios indicados para multiplicação de brotações o MS e o WPM (OLIVEIRA-CAUDURO et al, 2014).

2.2.3 Fonte de Carboidrato

A sacarose é a principal fonte de carboidrato utilizada nos meios de cultura, atuando como fonte de energia, fornece carbonos precursores para a biossíntese de componentes estruturais e funcionais, como oligossacarídeos, aminoácidos e outras moléculas necessárias para o crescimento (CALDAS et al., 1998).

Faria et al. (2004) verificaram que a adição de 60 g L⁻¹ de sacarose no meio MS proporcionou maior crescimento e taxa de multiplicação orquídea. Palma et al. (2011) testando três concentrações de sacarose (30, 60 e 90 g L⁻¹) no cultivo in vitro de *Cochlospermum regium*, observaram uma diminuição na porcentagem e intensidade de hiperhidricidade conforme o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura.

A concentração de carboidrato utilizado nos meios de cultura para *Eucalyptus* pode variar de acordo com as fases: multiplicação, alongamento ou enraizamento, mas em geral é mantida entre 20 e 30 g L⁻¹ (ALMEIDA, 2012; BACCARIN, 2012; BORGES et al., 2011; BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Existem estudos que mostram que o uso de sacarose proporciona uma cultura dependente e com fotossistemas subdesenvolvidos para a fotossíntese, criando sérios problemas na etapa de aclimatização das plantas. Por essa razão tem-se desenvolvido técnicas de cultivo sem a adição de sacarose nos meios (micropropagação fotoautotrófica = *sugar-free*). Na micropropagação fotoautotrófica, por não se utilizar açúcar o crescimento das culturas ou acumulação de carboidratos depende em grande parte da fotossíntese e absorção de nutrientes inorgânicos (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; KOZAI; KUBOTA, 2005).

2.2.4 Condições de Cultivo

As condições de cultivo referem-se principalmente ao regime de luz (qualidade e fotoperíodo) e temperatura. Tais condições são inteiramente dependentes da cultura a ser micropropagadas, variando-se temperaturas de 23 a 27 °C e fotoperíodo de 16 a 18h de luz e irradiância de 40 a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (AGGARWAL et al., 2012; BORGES et al., 2011; NAKHOODA; WATT; MYCOCK, 2011). No caso específico de *Eucalyptus* utiliza-se geralmente 25 $\pm$ 2°C de temperatura, 16 horas de luz e 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância (ALMEIDA, 2012; BACCARIN, 2012; BRONDANI et al., 2012).

O pH corresponde a outro fator importante, do ponto de vista das condições de cultivo, que pode alterar a disponibilidade de nutrientes e reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PASQUAL et al., 2002). A mudança de pH do meio de cultura pode influenciar a absorção de outros componentes como sais, vitaminas e reguladores de crescimento, e, assim, afetar a continuação do desenvolvimento da cultura (KUBEŠ et al., 2014; PULLMAN; JOHNSON, 2009). Além disso, interfere nas reações bioquímicas, principalmente, pela ativação ou desnaturação enzimática (PARVEEN; SHAHZAD, 2014).

Entretanto, da mesma maneira que ocorre com a sacarose, em que a melhor fonte e concentração dependerão da espécie vegetal e da fase do processo de micropropagação (NICOLOSO et al., 2003), para o pH, apesar de existir uma convergência a respeito do pH 5,8 como ideal, também podem ocorrer variações na adequação de acordo com as diferentes fases da morfogênese, como o estabelecimento da cultura, na proliferação de ramos e na indução de raízes (OSTROLUCKÁ et al, 2004; PARVEEN; SHAHZAD, 2014).

Por fim, o tipo de frasco, o teor de umidade, tipo de meio (qualidade nutricional), quantidade de material por frasco, trocas gasosas, podem exercer papel preponderante no sucesso da micropropagação (NOWAK; PRUSKI, 2004) e sua manutenção pode ser determinante para manter um ambiente adequado ao desenvolvimento das microplantas, de modo a realizar trocas de cultivo (subcultivo ou subcultura) em intervalos pré-determinados e constantes, uma vez que tais condições podem variar e se tornar mais escassas com o passar do tempo. Esse período de troca pode variar entre 20 e 30 dias para a maioria das espécies de *Eucalyptus* (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

2.2.5 Contaminações Microbianas

A presença de contaminantes crescendo no meio de cultivo é responsável por perdas consideráveis de material com alto potencial genético em laboratórios de pesquisa e biofábricas (MORENO-VÁZQUEZ et al., 2014; THOMAS; ASWATH, 2014; THOMAS et al., 2007, 2008; THOMAS; KUMARI, 2010; THOMAS; SOLY, 2009). Isso se deve ao fato de que os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, além de liberar no meio metabólitos tóxicos que podem ocasionar a morte da planta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PEREIRA; BOLIANI; FURLANI JÚNIOR, 2014; PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003).

Os contaminantes podem expressar-se imediatamente após a introdução das plantas in vitro. Os fungos filamentosos e leveduras raramente permanecem latentes in vitro (DANBY et al., 1994; LEIFERT; MORRIS; WAITES, 1994). Já no caso de bactérias, o crescimento diferencial pode indicar falhas em etapas distintas durante o estabelecimento. Sendo assim, considera-se que a presença de bactérias Gram negativas no ambiente in vitro geralmente ocorre quando a desinfestação inicial foi ineficiente e a presença de bactérias Gram positivas indica ineficiência na esterilização do meio de cultura ou no manuseio, além de assepsia inadequada do operador (LEIFERT; CASSELLS, 2001).

As contaminações microbianas ocorrem por diversos fatores, como por exemplo, o uso de explantes contaminados, ambientes laboratoriais inadequadamente limpos, técnicas de cultura de tecidos incorretas, ou ainda, uso de instrumentos contaminados durante a manipulação das culturas (LATA et al., 2006; MIZRA et al., 2001; SHEN et al., 2010; THOMAS; ASWATH, 2013; THOMAS; GOPLAKRISHNAN; KRISHNAREDDY, 2011). Adicionalmente, salienta-se que a intensidade de contaminação pode variar de acordo com o tipo e origem de explante, época do ano e do ambiente onde são coletados os explantes (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Para minimizar os efeitos desses contaminantes na micropropagação ou eliminá-los da superfície dos explantes, tem se utilizado diferentes procedimentos de desinfestação (FANG; HSU, 2012). Sendo que os métodos mais empregados, para este fim, são: o álcool (70 a 80%), pelo alto potencial germicida, além de um ótimo surfactante, facilitando a ação de outros produtos; e o hipoclorito de sódio (0,1 a 0,5% de cloro ativo) (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PEREIRA; BOLIANI; FURLANI JÚNIOR, 2014; THOMAS, 2012).

No caso específico de *Eucalyptus*, a sua desinfestação será mais ou menos simples, dependendo do local de cultivo e manutenção da planta matriz doadora de explantes, ou seja, a desinfestação superficial de explantes de eucalipto será fácil quando material utilizado for juvenil e retirado de plantas cultivadas em ambientes protegidos. Em contrapartida será dificultada quando as brotações forem provenientes de árvores mantidas em condições de campo (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; McCOMB; BENNETT, 1986).

De qualquer maneira, com o objetivo de minimizar as contaminações durante a micropropagação, tem sido recomendado o uso de tratamentos fitossanitários nas plantas matrizes, para manter a níveis baixos a comunidade epifítica. Em geral, soluções antimicrobianas de ação sistêmica e de contato são pulverizadas nas plantas para o controle de agentes microbianos (WENDLING; DUTRA; GROSSI, 2006). Além disso, a manutenção

nutricional e sanitária das matrizes fornecedoras dos explantes é imprescindível (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

2.2.6 Contaminação *versus* Manifestação

Contaminação microbiana tem sido muito confundida na literatura com manifestação microbiana. A diferença é que a manifestação ocorre pelo surgimento de endófitos latentes no meio de cultura em razão de alterações ambientais e estresses físicos, químicos ou mecânicos. Dessa maneira, pequenas alterações nas condições ambientais (temperatura, pH, luminosidade, composição do meio, ou a transferência para a estufa) (LEIFERT; CASSELLS, 2001; THOMAS; KUMARI, 2010) podem permitir uma rápida manifestação de endófitos no meio de cultura. Adicionalmente, o número de subcultivos, ou o cultivo *in vitro* prolongado de espécies, com vistas à manutenção de germoplasma (JIMTHA et al., 2014) ou ao rejuvenescimento de espécies adultas (ALFENAS et al., 2004; BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), tem sido apontado como um promotor de crescimento (manifestação), no meio de cultivo, de alguns microrganismos endofíticos latentes.

Quando a manifestação ocorre em níveis aceitáveis e consegue-se conviver com ela, sem prejudicar o desenvolvimento da planta recomenda-se em alguns casos manter o subcultivo das microplantas (PIOTTO, 2013) de modo a não descartar o material desnecessariamente. Mas em alguns casos essas manifestações ultrapassam o limite do aceitável e prejudicam o desenvolvimento das espécies, tornando-se prejudiciais ou vitropatogênicas (produzindo sintomas visíveis sobre as plantas e/ou o crescimento visível no meio de cultura) (MORENO-VÁZQUEZ et al., 2014; THOMAS, 2006; THOMAS et al., 2007; THOMAS; PRABHAKARA; PITCHAIMUTHU, 2006; THOMAS; PRAKASH 2004).

Quando o meio de cultura é modificado, por exemplo, altera-se a composição, balanço hormonal, podendo estimular uma maior exsudação por parte das plantas, resultando no crescimento bacteriano. Do mesmo modo, a alteração na temperatura pode promover o crescimento microbiano pelo estabelecimento de uma temperatura ótima ao desenvolvimento, quanto pelo aumento da exsudação, por parte da planta. (LEIFERT; CASSELLS, 2001). Consequentemente, quando a manifestação se estabelece e se multiplica, ela pode causar sérios prejuízos à espécie cultivada, com severa deterioração dos explantes, devido à produção de metabólitos fitotóxicos pelas bactérias, tais como os ácidos láctico e acético, cianeto (LEIFERT; CASSELLS, 2001; PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003).

Nestes casos o mais recomendável é o descarte do material, mas quando a manutenção é necessária, podem ser feitos tratamentos curativos adicionando, ao meio de cultivo, antibióticos, como ampicilina sódica, agrimicina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, gentamicina e cefazolina, por períodos que variam de meses a dias recomenda-se o descarte do (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003; PEREIRA; BOLIANI; JUNIOR, 2014; THOMAS, 2011). Para *Eucalyptus cloeziana* com o objetivo de controlar a manifestação bacteriana endofítica, o uso, por 30 dias, dos biocidas clorometil-isotiazolinona + metil-isotiazolinona e o timentin foram efetivos no controle, sem comprometer efetivamente a morfofisiologia das microcepas, proporcionando melhor vigor das microcepas em função da maior assimilação dos nutrientes (LEONE, 2013).

Os fatores que determinam a manifestação endofítica, apesar de bem teorizados, são pouco compreendidos na prática, havendo a necessidade de estudos que avaliem como elas se iniciam, e qual momento certo de atuar com uma convivência amigável, ou com a eliminação do material. Dessa forma, a atribuição do conceito de “contaminação” a toda manifestação microbiana evidente nos meios de cultura é arbitrária, pois se deve ponderar que existe em todas as espécies vegetais uma microbiota bacteriana endofítica, conferida em diversos trabalhos com microplantas consideradas axênicas (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA et al. 2005, 2009; DIAS et al., 2009; POLES, 2010). A distinção entre “contaminação” e “manifestação” microbiana é fundamental para evitar descartes desnecessários de matrizes com alto potencial genético, além de se considerar que a interação entre os microrganismos endofíticos e as plantas é bastante vantajosa por acarretar inúmeros benefícios nos processos morfogênicos.

2.3 Microrganismos Endofíticos

Semelhante ao microbioma de animais intensamente estudado, as plantas abrigam uma vasta gama de microrganismos que formam uma comunidade biológica complexa (JIMTHA et al., 2014; MENGONI; SCHAT; VANGRONSVELD, 2010; PINI et al., 2012; RYAN et al., 2008). Dependendo da região colonizada da planta, essa comunidade microbiana pode ser classificada como microrganismos epifíticos (habitam a superfícies de folhas ou hastes) e endofíticos (colonizam a endosfera, ou interior dos tecidos vegetais) (IKEDA et al., 2010; PINI et al., 2012).

Os microrganismos endofíticos ou endófitos são classificados como aqueles que vivem dentro da planta em parte ou em todo o seu ciclo de vida, sem, no entanto, causar qualquer

sintoma visível de sua presença, podendo ser isolados de tecidos de plantas com desinfestação superficial (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008; QIN et al., 2011; SUN et al., 2008). Eles habitam as regiões saudáveis da planta, ou regiões assintomáticas, numa densidade entre 10^3 a 10^6 UFC por grama de tecido fresco (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; SHENG et al., 2011). São transmitidos maternalmente (vertical) ou horizontalmente de forma passiva ou através de vetores (HAMILTON et al., 2012).

Embora o conhecimento da ecologia e filogenia de microrganismos endofíticos tenha se acumulado rapidamente durante as últimas duas décadas, perguntas básicas sobre a origem evolutiva, especiação e papel ecológico dos endofíticos permanecem largamente sem resposta (SAIKKONEN et al., 2004). Sabe-se que as, aproximadamente, 300.000 espécies de plantas existentes na terra hospedam pelo menos um microrganismo endofítico (GUO et al., 2008; SAIKKONEN, 2007), e que na maioria dos casos o que estabelece é uma relação (endófito/planta hospedeira) de simbiose e provavelmente mutualística (ARDANOV et al., 2012; GUO et al., 2008). Simbiose é a relação ecológica estabelecida entre dois ou mais indivíduos interespecíficos, que se estende por um contínuo e pode variar com o tempo (CRAWFORD; CLARDY, 2011).

Uma interação simbiótica pode ser positiva (mutualismos), negativa (patogênese ou parasitismo), ou neutra para um ou ambos os indivíduos (comensalismo) (HAMILTON et al., 2012). No caso específico do mutualismo as plantas se beneficiam extensivamente ao abrigar estes microrganismos, que auxiliam no seu crescimento e desenvolvimento (DING; PALMER; MELCHER, 2013; DUAN et al., 2013; GAGNE-BOURGUE et al., 2013; RYAN et al., 2008; SHENG et al., 2011). Eles, por sua vez, ao habitarem regiões microecologicamente distintas recebem suprimento nutricional adequado (C e N) e são protegidos contra condições ambientais adversas, como por exemplo, excesso de luz solar, raios ultravioletas, etc (DUAN et al., 2013).

2.3.1 Mutualismo dos Endófitos

Estudos com estes microrganismos geram informações importantes para entender a biologia da interação com as plantas, além de poderem revelar linhagens promissoras para o controle de patógenos de plantas, promoção de crescimento da planta, entre outras vantagens em relação a aspectos agronômicos, bem como produção de metabólitos com interesse biotecnológico e farmacológico (Figura 2) (IKEDA et al., 2013).

Dentro do controle biológico de doenças o uso de microrganismos endofíticos tem gerado bons resultados (ARAVIND et al., 2010; HO et al., 2015). Muitas pesquisas sugerem que as comunidades endofíticas estão diretamente envolvidas na defesa da planta, podendo reduzir a invasão de patógenos por vários mecanismos, dentre eles pode-se citar a competição pelo mesmo nicho de colonização, a produção de uma vasta gama de compostos contra o invasor, e a indução de resistência sistêmica das plantas (ARDANOV et al., 2012; CHEN et al., 2014).

Figura 2 - Usos e aplicações dos endófitos nos mais variados setores. Adaptado de Ryan et al. (2008)

Estudos revelam que endófitos podem melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas, de forma direta ou indireta (LELIE et al., 2009). De maneira direta, estão envolvidos na fixação de nitrogênio, aumento da disponibilidade de minerais, produção de sideróforos, produção de reguladores de crescimento (como auxinas, citocininas e giberelinas), e supressão da síntese de etileno (CANBOLAT et al., 2006; EL-TARABILY, 2008; HERNANDEZ et al., 2009; JIMTHA et al., 2014; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Indiretamente beneficiam a planta, impedindo o crescimento ou atividade de patógenos, por meio da competição por nicho e nutrientes, por antibiose, ou produção de enzimas

hidrolíticas, inibição de enzimas ou toxinas produzidas pelo patógeno, ou pela indução de mecanismos de defesa sistêmica da planta (LELIE et al., 2009; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; SINGH et al., 2008).

A fotossíntese, também responsável pelo crescimento e desenvolvimento do vegetal, é uma importante função fisiológica auxiliada por ecossistemas microbianos endofíticos, que podem fornecer energia para cada componente do sistema, proteger o fotossistema através de uma rede de sinais e melhorar da cadeia transportadora de elétrons (BURLAK et al., 2013).

Levando-se em consideração a necessidade de moléculas naturais e com eficiente uso biotecnológico e farmacológico, os endófitos têm sido utilizados na prospecção de compostos bioativos, usados pelas plantas hospedeiras para defesa contra patógenos, e que, alternativamente, mostram-se promissores não apenas como antibióticos, mas também como antitumorais, além de alcaloides, terpenoides, flavonoides e esteroides (ALY et al. 2011; GUO et al. 2008; HUSSAIN et al., 2015; KATOCH; SALGOTRA SINGH, 2014; KOUR et al. 2008; QIU et al. 2010).

Mais recentemente os microrganismos endofíticos têm despontado como úteis na produção de compostos bioativos com interesse na fitorremediação, devido à capacidade que possuem em melhorar esse processo, diretamente no metabolismo e assimilação dos metais pesados, ou indiretamente, impedindo a fitotoxidez da planta (AFZAL; KHAN; SESSITSCH, 2014; ESPOSITO-POLESI, 2011; GUTIÉRREZ-GINÉS et al., 2014; LI et al., 2011; KHAN et al., 2015; MA et al., 2011; NEWMAN; REYNOLDS, 2005).

2.3.2 Distribuição nas Plantas (Nichos de Colonização)

Endófitos têm sido relatados colonizando raízes, caules, folhas, flores, sementes, frutos, tubérculos e também dentro de nódulos de leguminosas (COMPANT et al., 2011; McCULLY, 2001; PICCOLO et al., 2010; QIN et al., 2011; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Em geral, estão presentes nos espaços inter e intracelulares de diferentes tecidos como parênquima, epiderme, bainha do feixe vascular, xilema e floema (ALMEIDA et al., 2009; PICCOLO et al., 2010; POLESI, 2010; SHENG et al., 2011; THOMAS; SEKHAR, 2014).

Existem diversos estudos que explicam que o início da colonização dos endófitos nas plantas ocorre predominantemente a partir do sistema radicular, mais precisamente nos locais de dano epidérmico, que surgem naturalmente, devido ao desenvolvimento de raízes laterais, por meio de pêlos radiculares ou em conjunções epidérmicas. Uma vez no interior da planta,

os endófitos colonizam a planta sistematicamente pela migração através do sistema vascular ou do apoplasto, ou ainda permanecem no córtex da raiz ou no xilema (COMPANT et al., 2011; LELIE et al., 2009).

No entanto, para o sucesso da colonização, por qualquer via, o endófito deve atender a uma série de condições: (1) penetrar rapidamente e de maneira generalizada nas plantas jovens em condições de campo; (2) colonizar um ambiente dentro das plantas que suportem a sua função específica (isto é, deve haver um fornecimento adequado de carbono fixo, substratos apropriados, pH ótimo, tensão de oxigênio, umidade, bem como os meios para o fluxo de metabólitos bacterianos para os locais apropriados); (3) não comprometer significativamente a função normal da planta (McCULLY, 2001).

Pesquisas revelam que apesar de haver uma elevada diversidade taxonômica de microrganismos, apenas poucos táxons foram encontrados caracteristicamente associados à maioria das espécies de plantas, consequentemente, a ideia geralmente aceita é de que a capacidade de colonizar a planta não é uma característica comum, estando ligada a um grupo geneticamente propenso à associação com plantas. Esta hipótese foi recentemente suportada pela descoberta de que, pelo menos, na classe de *Alphaproteobacteria*, um repertório de genes comuns parece estar presente em todos os seus membros que se associam com plantas (PINI et al., 2011, 2012).

Por essa razão acredita-se que as maiores densidades de endófito se localizam na rizosfera e diminuem progressivamente a partir das raízes para o caule e para as folhas, onde a densidade é menor (COMPANT et al., 2011; VAZ et al., 2014; YAN et al., 2015). Uma vez que as exigências devem ser cada vez maiores e devidamente atendidas pelos endófitos.

2.3.3 Estrutura e Variação das Comunidades Endofíticas

A densidade e diversidade dos organismos são moldadas pelo ambiente em que vivem, pelas espécies que residem os mesmos habitats com adaptações comuns, por sua ecologia e história evolutiva (BORCARD; LEGENDRE; DRAPEAU, 1992; FRECKLETON; JETZ, 2009). Sendo assim, espécies estreitamente relacionadas têm a tendência de serem mais semelhantes do que espécies parentes distantes (HARVEY; PAGEL, 1991). Esta tendência em relacionar espécies que se assemelham, por acaso, mais em um traço do que o esperado é referido como sinal filogenético (BLOMBERG; GARLAND, 2002).

A aplicação destes princípios, às relações endófitos-hospedeiro, auxilia no entendimento das variações que ocorrem no microbioma vegetal, em decorrência da espécie,

do cultivar, e até mesmo entre espécies transgênicas e suas respectivas progenitoras (ANDREOTE et al., 2010; da SILVA et al., 2014). Também podem ser influenciados pela idade da planta, estágio de desenvolvimento, status fisiológico, práticas agrícolas, além de condições ambientais como temperatura, oferta de água e nutrientes (ARDANOV et al., 2012; BARROS; ARAÚJO; AZEVEDO, 2010; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; DAVITT; CHEN; RUDGERS, 2011; GAGNE-BOURGUE et al., 2013; HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008; ISLAM et al., 2010).

A arquitetura da planta, estrutura e distribuição etária da folhagem, topografia da superfície foliar, nutrientes presentes na superfície das folhas e o microclima estabelecido (MUKHTAR et al., 2010; SAIKKONEN, 2007), presença de patógenos, ou ainda o resultado de processos estocásticos não explicados, podem também interferir na comunidade endofítica (HOLLANTS et al., 2013; LIU et al., 2012, 2013; MEJÍA et al., 2014).

Cabe salientar, porém, que independentemente dos fatores externos aos endófitos, ou ambientais, existe uma especialização em colonizar uma determinada espécie (coevolução). Dessa maneira, de acordo com as estratégias de vida dos endófitos eles podem ser classificados em obrigatórios ou facultativos. Os obrigatórios são estritamente dependentes da planta hospedeira para seu crescimento e sobrevivência. Os facultativos, por outro lado, possuem uma fase de seu ciclo dentro da planta hospedeira e outra em que vivem fora delas (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008). Alguns são mais frequentes em determinado tipo de vegetal, designados dominantes, em contraposição há outros mais raros, chamados de secundários (PILEGGI, 2006).

A especialização é um mecanismo biótico que depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos, como: a concorrência, parasitismo, herbivoria, reforço de barreiras reprodutivas, resistência do hospedeiro e coevolução de características correspondentes (MEJÍA et al., 2014; MORICCA; RAGAZZI, 2008; MORICCA; GINETTI; RAGAZZI, 2012). Este processo de adaptação leva à restrição de nicho, e pode favorecer a convivência duradoura de espécies de endofíticos no mesmo hospedeiro (MORICCA; GINETTI; RAGAZZI, 2012). Por essa razão os microrganismos endofíticos obrigatórios estão filogeneticamente estruturados e são regidos pela história evolutiva com o hospedeiro, enquanto que os facultativos devem estar distribuídos mais aleatoriamente entre as espécies hospedeiras e fortemente influenciados por todos esses fatores ambientais supracitados (HOLLANTS et al., 2013).

Segundo Ding, Palmer e Melcher (2013), em se tratando de endófitos foliares, quatro fatores são relevantes para as flutuações das comunidades endofíticas: espécies de plantas

hospedeiras, tempo, data e locais de amostragem. O mesmo autor discute que, o fator “espécies de plantas hospedeiras” leva em consideração o ambiente bioquímico interno e as características fisiológicas da planta hospedeira, bem como considera que a coevolução pode contribuir para as semelhanças e diferenças entre as comunidades bacterianas endofíticas. O fator tempo, por sua vez inclui mudanças no ambiente físico, tais como temperatura, umidade, irradiância e velocidade do vento, e as dinâmicas de crescimento da planta hospedeira (estádio fenológico). Os impactos da data de amostragem sobre a distribuição de bactérias endofíticas associadas, por exemplo, sugerem que durante o crescimento da planta hospedeira, as estruturas das comunidades bacterianas são flutuantes em resposta às mudanças dos ambientes bioquímicos internos e as variações do clima e meio ambiente externo em geral. Por fim, o fator do ambiente físico inclui as condições de solo e geobioquímicas, o efeito de plantas e animais ao redor, do manejo adotado, etc.

A coevolução, também, faz com que mesmo que os endófitos tenham a disposição incontáveis recursos e hospedeiros, fiquem restritos a um seleto grupo de hospedeiros, ou a uma única espécie, ou a um único indivíduo, ou a certos órgãos de um mesmo indivíduo, e até mesmo em diferentes regiões de um único órgão (Figura 3) (COOK et al., 2009, 2012; MORICCA; GINETTI; RAGAZZI, 2012; SUKUMAR et al., 2013; VAZ et al., 2014). A interação competitiva entre as espécies de endofíticos de explorar um recurso comum (um hospedeiro ou um órgão do hospedeiro) no tempo pode levar esses invasores a se tornarem estreitamente especializados para uma espécie vegetal ou um órgão em particular dentro de cada hospedeiro (MORICCA; GINETTI; RAGAZZI, 2012). Dessa forma, uma vez dentro de uma determinada espécie hospedeira, os endófitos podem se distribuir de maneira distinta nos órgãos e tecidos, variando sua estrutura e diversidade (ARDANOV et al., 2012; BODENHAUSEN; HORTON; BERGELSON, 2013; ERRASTI; CARMARÁN; VICTORIANOVAS, 2010; NISSINEN; MÄNNISTÖ; ELSAS, 2012; PRASANNA et al., 2012).

Liu et al. (2013) estudaram diferentes estágios da embriogênese em linhagens de milho, mostrando que pode-se estabelecer uma relação entre as fases de desenvolvimento do embrião com mudanças significativas na sucessão da comunidade bacteriana endofítica, comprovada pelas diferenças nas linhagens e espécies encontradas em cada fase. Segundo os mesmos autores isso ocorre, pois na fase inicial de maturação da semente, muito mais bactérias são capazes de penetrar a semente, por ser mais tenra, representando, assim, uma diversidade relativamente maior de endófitos nesta fase. Durante o processo de maturação, a quantidade e a concentração da água e de matéria seca na semente mudam significativamente, influenciando os tipos de bactérias endofíticas capazes de colonizar esse novo ambiente.

Figura 3 - Ilustra a probabilidade de se isolar determinadas espécies de fungos endofíticos em regiões restritas da folha. Extraído de Vaz et al. (2014), no qual avalia a presença de fungos endofíticos em diferentes regiões da folha, sendo: (A) ápice da folha; (B) margem direita; (C) base da folha – próximo ao pecíolo; (D) margem esquerda; (E e F) nervura central

Um aspecto importante da estrutura e variação da comunidade endofítica avaliada juntamente com o cultivo *in vitro* tem trazido a tona questionamentos quanto ao tipo de explante a ser introduzido. Neste contexto, aliado a capacidade de estabelecimento e multiplicação *in vitro*, o explante selecionado traz consigo uma comunidade endofítica que varia em decorrência do local de onde foi retirado (copa, base, ramos jovens ou adultos), uma vez que a diversidade endofítica se modifica nos diferentes órgãos de uma única planta (folha, caule, raiz, flor, fruto e semente), devido às diferenças existentes na estrutura interna dos órgãos da planta e os diversos tecidos do mesmo órgão, à constituição química do tecido vegetal e ao estado nutricional oferecido para que os microrganismos possam crescer, demonstrando a alta capacidade e especificidade que esses microrganismos possuem para sobreviver dentro de um substrato específico (tecido diferente, textura e composição química) (GONG; GUO, 2009; HUANG et al., 2008; IZUMI et al., 2008; MEJÍA et al., 2014).

2.3.4 Endófitos e o Cultivo in vitro

No ambiente as populações endofíticas são flutuantes, ou seja, alteram-se em número e espécie, respondendo, principalmente, às variações das condições ambientais (regime de luz, de chuvas, temperatura, geadas, nutrição do solo, patógenos, outras espécies adjacentes, entre outros) (ARDANOV et al., 2012; BARROS; ARAÚJO; AZEVEDO, 2010; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; DAVITT; CHEN; RUDGERS, 2011; GAGNE-BOURGUE et al., 2013; HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008; ISLAM et al., 2010). No ambiente in vitro as fontes geradoras de estresse, são outras, como a alta taxa metabólica (material em intensa multiplicação) uso de reguladores de crescimento e de sacarose (LEIFERT; CASSELLS, 2001; THOMAS; KUMARI, 2010), influenciando drasticamente na manutenção e diversidade endofítica.

Ulrich, Stauber, e Ewald (2008) ao comparar a comunidade bacteriana endofítica de plantas de *Populus* sp oriundas de campo e de micropropagação observou redução no número de espécies quando o material do campo foi introduzido in vitro. Segundo Fang e Hsu (2012), o ambiente in vitro é responsável por acomodar apenas espécies de endófitos específicos, em detrimento da supressão de outros, além disso, cada espécie, cultivar ou clone geram um ambiente in vitro único e exclusivo, de modo a permitir a colonização de espécies mais adaptadas, de tal forma que como mencionado anteriormente por Hollants et al. (2013), somente os endófitos obrigatórios conseguem resistir aos fatores ambientais, devido a uma história ecológica evolutiva, já os facultativos tenderão a se manifestar no meio de cultivo.

De qualquer maneira, assim como no ambiente in vivo e ao contrário do que se supunha, os microrganismos endofíticos tem despontado como importantes aliados no cultivo in vitro (ESPOSITO-POLESI, 2011). Segundo Pirtilä et al. (2008), o genótipo da planta e a composição de espécies endofíticas, aliados às condições de cultivo in vitro, representam um fator chave para a obtenção de culturas com alta capacidade de regeneração. Muitos estudos sugerem que os endófitos auxiliam a microplanta no ajuste osmótico, no desenvolvimento, pela produção de fitormônios, absorção de nutrientes e proteção contra ação de patógenos, além de favorecer o crescimento e sobrevivência das microplantas na fase de aclimatização e na rapidez da produção de biomassa (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2005; 2009; DIAS et al., 2009; QUAMBUSCH et al., 2014; THOMAS; SOLY, 2009). Adicionalmente alguns endófitos podem aumentar a tolerância ao estresse causado durante os subcultivos (LATA et al.2006).

Espécies endofíticas do gênero *Methylobacterium* são relatadas na literatura como benéficas na cultura de tecidos vegetais, por promoverem a embriogênese e organogênese, além de induzirem a formação de calos e brotações em *Triticum aestivum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, e *Linum usitatissimum*, e permitir o desenvolvimento das plantas regeneradas, pela biossíntese de compostos e fitormônios como auxinas e citocininas (PIRTTILÄ et al., 2008; TROTSSENKO; IVANOVA; DORONINA, 2001). Além disso, essas bactérias podem produzir vitamina B12, e remover o metanol e outros resíduos metabólicos do meio de cultivo (PIRTTILÄ et al., 2004, 2005).

Algumas actinobactérias, por exemplo, produzem auxinas que podem aumentar a capacidade de germinação e o crescimento da microplanta (QIN et al., 2011). No caso específico de microplantas de *Pinus sylvestris*, sabe-se que alguns endófitos podem minimizar o escurecimento dos calos, através da formação de biofilmes que protegem contra as reações de oxidação e escurecimento, além da produção de compostos que afetam a morfologia e aumentam a viabilidade dos explantes (PIRTTILÄ et al., 2004, 2008; PIRTTILÄ; LAUKKANE; HOHTOLA, 2002).

Vários estudos evidenciaram a onipresença de endófitos em espécies cultivadas in vitro, sem lhes causar danos, dentre elas uva, mamão, melão, banana, abacaxi, orquídea, pupunha, manjerição, mogno, eucalipto, pinheiro, sequoia, violeta, cúrcuma, cana-de-açúcar, teca, morango, entre outros (ABREU-TARAZI et al. 2010; ALMEIDA et al., 2005; 2009; DIAS et al., 2009; POLES, 2010; THOMAS et al. 2008, 2007; THOMAS; PRABHAKARA; PITCHAIMUTHU, 2006; THOMAS; PRAKASH, 2004; THOMAS; SOLY, 2009). Sendo assim, a presença de tais microrganismos pode não representar problemas reais à cultura, e ainda constituir um ganho ao mantê-los na planta, pois, além de não apresentarem características patogênicas, também se configuram como vetores genéticos, agentes de controle biológico e fonte de metabólitos secundários, dentre outros (ALMEIDA et al., 2005; DONATO et al. 2005; LONDE et al. 2007). Em recente estudo com microplantas de *E. benthamii*, Piotto (2013) constatou que na maioria dos casos as manifestações, que cresceram no meio de cultivo repentinamente após meses de subcultivos, surtiram efeito neutro (sem danos) ou benéfico nas microcepas, havendo incremento no número de brotações e na massa seca.

2.3.5 Investigação da Comunidade Endofítica

O isolamento, mesmo sendo um método amplamente utilizado ainda hoje nas pesquisas com endofíticos, possui como desvantagem o fato de que certas espécies de microrganismos podem ter exigências específicas para crescimento e, conseqüentemente, não desenvolverão colônias prontamente nas placas, havendo, portanto, uma limitação desse processo de análise, por não se conhecer perfeitamente as características e necessidades desses microrganismos (GARBEVA et al., 2001). Outro aspecto é que a proporção da diversidade microbiana identificada usando as técnicas convencionais de cultivo é de 1% das espécies existentes (LI et al., 2010). Essas limitações metodológicas têm restringido o conhecimento sobre endófitos.

No entanto, a detecção molecular com base na análise de DNA direta faz com que essas etapas demoradas sejam desnecessárias, com uma sensibilidade suficiente para a maioria dos grupos de bactérias (LÓPEZ et al., 2009). A detecção molecular por PCR é geralmente baseada na análise de três tipos de sequências: genes relacionados à patogênese, genes e operons ribossomais plasmídial (incluem os 16S, 23S e 5S genes bem conservados e relativamente variáveis) (LÓPEZ et al., 2009; MORENO-VÁZQUEZ et al., 2014).

O gene ribossomal 16S a partir de extratos de rDNA é o mais útil para a identificação de bactérias em nível de gênero (HUYS et al., 2008). Reações em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR), dessas regiões é uma metodologia bem estabelecida para amostras ambientais, hospitalares, água e alimentos (MORENO-VÁZQUEZ et al., 2014). Mais recentemente, juntamente com técnicas de *fingerprinting*, tem sido utilizada com sucesso para identificação e estudos da diversidade genética endofítica entre populações de plantas (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2009; ANDREOTE et al., 2010; IKEDA et al., 2013; LI et al., 2010; LIU et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; RAMOND et al., 2013; SESSITSCH et al., 2002; SUN et al., 2008).

Dentre as metodologias baseadas no 16S rDNA, destaca-se o DGGE por fornecer uma rápida caracterização das comunidades microbianas cultiváveis e não cultiváveis (LACAVA et al., 2006; PINHEIRO et al., 2013; RAMOND et al., 2013). Esta técnica identifica diferenças estabelecidas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA, com mesmo comprimento, mas diferentes quanto à composição básica (pares de base), que submetida a um gradiente crescente de concentração de agentes desnaturantes (uréia e formamida), se separam em fragmentos discretos, chamados de domínios de desnaturação (GARBEVA et al., 2001; LACAVA et al., 2006; MUYZER, 1999; MUYZER; SMALLA, 1998). Assim,

teoricamente, cada banda no gel representa uma espécie ou um grupo de espécies de bactéria, e a imagem final do gel corresponderá a um padrão referente ao microbioma bacteriano das plantas estudadas.

Sua aplicabilidade se relaciona ao estudo de comunidades endofíticas de diversas espécies vegetais e para detecção de possíveis alterações nessas comunidades em decorrência de modificações no ambiente (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2009; da SILVA et al., 2014; PINHEIRO et al., 2013; POLESI, 2010; RAMOND et al., 2013; THOMAS et al., 2008).

O uso dessas diferentes técnicas para o estudo das comunidades endofíticas, têm levantado a eficácia desses métodos, principalmente, no tocante a amplificação do gene 16S rRNA de *Bactéria*, devido ao fato de que o DNA total extraído da planta, inclui DNAs que não são propriamente da comunidade endofítica, havendo, portanto, a possibilidade de superestimar a comunidade ou ainda, aferir sua existência de maneira equivocada. Pensando em minimizar essas interferências por parte das organelas vegetais (cloroplasto e mitocôndrias), Chelius e Triplett (2001) desenharam o *primer* 799f (5'AAC MGG ATT AGA TAC CCK G 3') que amplifica a maioria das sequências bacterianas, pois possui alta especificidade com gene 16S rRNA de *Bactéria*, excluindo o DNA cloroplastidial, e gerando um produto mitocondrial de aproximadamente 1,5 vezes o tamanho do produto bacteriano. Juntamente com o 1492r (LANE, 1991) o 799f tem sido amplamente utilizado em estudos com endófitos, para aumentar a concentração do DNA bacteriano antes da amplificação com grampo GC (ANDREOTE et al., 2009; BODENHAUSEN; HORTON; BERGELSON, 2013; LIU et al., 2013; SUN et al., 2008; THOMAS; SOLY, 2009).

A figura 4 ilustra as etapas e procedimentos da análise de DGGE e como os primers 799f e 1492r atuam nas amostras, eliminando os interferentes, deste modo o que se tem como resultado final é um perfil no gel de acrilamida das comunidades bacterianas endofíticas presentes nas diferentes amostras de planta, permitindo assim, uma avaliação da diversidade de endófitos.

Figura 4 - Esquema dos diferentes procedimentos para a realização de uma análise de DGGE, utilizando os primers 799f e 1492r para melhor avaliação da diversidade da comunidade endofítica presente nas plantas

Além das técnicas moleculares as análises histológicas têm servido como prova definitiva de colonização dos tecidos vegetais pelos endófitos (ALMEIDA et al., 2009; COMPANT et al., 2008, 2011; POLESÍ, 2010; THOMAS, 2011; THOMAS; REDDY, 2013). Em adição, as análises usando testes histoquímicos, podem ainda servir como indicativo da presença de microrganismos endofíticos na planta hospedeira, pelas possíveis alterações causadas nos perfis metabólicos (pela produção ou estímulo à produção) e na anatomia em decorrência dessa colonização, verificar a presença de metabólitos, uma vez que a técnica se baseia em reações cromáticas utilizadas no reconhecimento da natureza química das membranas e conteúdo celular (ESPOSITO-POLESÍ; ALMEIDA; ALMEIDA, 2013). São métodos de análise qualitativa e quantitativa de todos os componentes celulares, incluindo

proteínas, carboidratos, lipídeos e elementos iônicos que ocorrem no meio celular (GERSBACH, 2002).

2.4 Considerações

Com base no que foi exposto na introdução e revisão bibliográfica a presente tese se justificou visando atender e responder aos questionamentos surgidos, bem como as hipóteses formuladas. Sendo assim, ao se considerar a importância crescente dos microrganismos endofíticos na cultura de tecidos vegetais, o avanço e uso de diferentes técnicas de análise, bem como a importância florestal da espécie *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage, estabeleceu-se os objetivos e capítulos seguintes dessa tese.

Na sequência foram descritos, discutidos e concluídos pontos chave dessa pesquisa, sendo que no primeiro (capítulo 3) o enfoque foi dado ao desenvolvimento de duas fontes de explante de *E. benthamii* durante a multiplicação in vitro, avaliando muitos parâmetros, dentre eles o mais inovador foi a manifestação endofítica, analisada como uma possível indicadora de estresse e da qualidade das relações entre os endófitos e as microcepas hospedeiras. No segundo (capítulo 4) o comportamento da comunidade bacteriana endofítica foi o objeto de estudo, considerando sua dinâmica em predominância e diversidade nas diferentes fontes de explante, desde o momento da coleta na casa de vegetação até o alongamento e enraizamento in vitro, passando pela multiplicação e seus subcultivos. Finalizando, o último capítulo se reservou a correlacionar os conhecimentos e resultados obtidos na tese, discutindo e considerando tudo que foi apresentado ao longo da tese.

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, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.
- AFZAL, M.; KHAN, Q.M.; SESSITSCH, A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. **Chemosphere**, Oxford, v. 117, n. 1, p. 232-242, 2014.
- AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; SHARMA, J.; REDDY, M. S. Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 521-529, 2012.

- AHLOOWALIA, B.S.; PRAKASH, J.; SAVANGIKAR, V.A.; SAVANGIKAR, C. Plant Tissue Culture. In: **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. Austria; Vienna: International Atomic Energy Agency (IAEA), 2004. p. 3-10. (IAEA-TECDOC-1384)
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442p.
- ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 10, 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, n. 5, p. 467-470, 2005.
- ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M.; PAIVA, H.N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.
- ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação in vitro de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K. D. Hill & L.A.S. Johnson**. 2012. 106p.. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ALY, A.H.; DEBBAB, A.; CLEMENTS, C.; EDRADA-EBEL, R.; ORLIKOVA, B.; DIEDERICH, M.; WRAY, V.; LIN, W.; PROKSCH, P. NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 19, n.1, p. 414-421, 2011.
- ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.
- ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, R.L.T.; SALLES, J.F.; MARCON, J.; LABATE, C.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culture-independent assessment of rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic *Eucalyptus*. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 1, p. 82-93, 2009.
- ANDREOTE, F.D.; ROCHA, U.N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; OVERBEEK, L.S. van. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 97, n. 4, p. 389-399, 2010.
- ARAVIND, R.; EAPEN, S.J.; KUMAR, A.; DINU, A.; RAMANA, K.V. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 4, p. 318-324, 2010.
- ARDANOV, P.; SESSITSCH, A.; HAGGMAN, H.; KOZYROVSKA, N.; PIRTTILÄ, A.M. *Methylobacterium*-induced Endophyte Community Changes Correspond with Protection of Plants against Pathogen Attack. **Plos One**, Alabama, v. 7, n. 10, p. 1-8 (e46802), 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2011. Brasília. 2012. 150 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF12/ABRAF12-BR.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2013.

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

BACCARIN, F.J.B.; BRONDANI, G.E.; ALMEIDA, L.V. ;VIEIRA, I.G.; OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, Dordrecht, 2015. DOI 10.1007/s11056-015-9472-x.

BANDARA, W.M.M.S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S.A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 31, n. 5, p. 645-650, 2006.

BARROS, I.A.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. The effect of different growth regimes on the endophytic bacterial communities of the fern, *Dicksonia sellowiana* hook (Dicksoniaceae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n.4, 956-965, 2010.

BILLARD, C.E.; LALLANA, V.H. Multiplicación in vitro de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, Entre Ríos, v.16, n.30, p.199-216, 2005.

BLOMBERG, S.P.; GARLAND, T. Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 15, n. 6, p. 899-910, 2002.

BODENHAUSEN, N.; HORTON, M.W.; BERGELSON, J. Bacterial Communities Associated with the Leaves and the Roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plos One**, Alabama, v. 8, n. 2, p. 1-9 (e56329), 2013.

BORCARD, D.; LEGENDRE, P.; DRAPEAU, P. Partialling out the spatial component of ecological variation. **Ecology**, Tempe, v. 73, n. 3, p. 1045-1055, 1992.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.D.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C. Multiplicação in vitro de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 173-182, 2011.

BRAVO, C.D.V.; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; VENCOSKY, R. Controle genético da regeneração in vitro em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2181-2185, 2008.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Establishment, multiplication and elongation in vitro of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage×*Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

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

BROOKER, M.I.H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, Melbourne, v. 13, n. 1, p. 79-148, 2000.

BURLAK, O. P.; de VERA, J.P.; YATSENKO, V.; KOZYROVSKA, N.O. Putative mechanisms of bacterial effects on plant photosystem under stress. **Biopolymers and Cell**, Kiev, v. 29, n. 1, p. 3-10, 2013.

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-CNPq, 1998. 1 v.p. 87-132.

CANBOLAT, M.Y.; BILEN, S.; ÇAKMAKÇI, R.; ŞAHİN, F.; AYDIN, A. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 42, n. 4, p. 350-357, 2006.

CARVALHO, D.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; CARVALHO, C.R. Regeneração de plantas após fusão de protoplastos de tangelo 'Page' e toranja 'Lau Tau'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n. 2, p. 329-332, 2007.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.

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, n.3, p.252-263, 2001.

CHEN, Y.; GAO, X.; CHEN, Y.; QIN, H.; HUANG, L.; HAN, Q. Inhibitory efficacy of endophytic *Bacillus subtilis* EDR4 against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed. **Biological Control**, Orlando, v. 78, p. 67-76, 2014.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.

COMPANT, S.; KAPLAN, H.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; AIT BARKA, E.; CLÉMENT, C. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 84-93, 2008.

COMPANT, S.; MITTER, B.; COLLI-MULL, J.G.; GANGL, H.; SESSITSCH, A. Endophytes of Grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microbial Ecology**, New York, v. 62, n. 1, p. 188-197, 2011.

COOK, D.; GARDNER, D.R.; RALPHS, M.H.; PFISTER, J.A.; WELCH, K.D.; GREEN, B.T. Swainsonine concentrations and endophyte amounts of *Undifilum oxytropis* in different plant parts of *Oxytropis sericea*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 10, p. 1272-1278, 2009.

- COOK, D.; SHI, L.; GARDNER, D.R.; PFISTER, J.A.; GRUM, D.; WELCH, K.D.; RALPHS, M.H. Influence of Phenological Stage on Swainsonine and Endophyte Concentrations in *Oxytropis sericea*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 38, n. 2, p. 195-203, 2012.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 48, n. 49, p. 107-116, 1995.
- CRAWFORD, J. M.; CLARDY, J. Bacterial symbionts and natural products. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 47, n. 27, p. 7559-7566, 2011.
- da SILVA, D.; COTTA, S.; VOLLÚ, R.; de JURELEVICIUS, D.; MARQUES, J.; MARRIEL, I.; SELDIN, L. Endophytic microbial community in two transgenic maize genotypes and in their near-isogenic non-transgenic maize genotype. **BMC Microbiology**, London, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.
- DANBY, S.; BERGER, F.; HOWITT, D.J.; WILSON, A.R.; DAWSON, S.; LEIFERT, C. Fungal contaminants of *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue cultures. In: LUMSDEN, P.J.; NICHOLAS, J.R.; DAVIES, W.J. (Ed.) **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 397-403.
- DAVEY, M.R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture: essential methods**. Wiley: Chichester, UK, 2010. 358p.
- DAVITT, A.J.; CHEN, C.; RUDGERS, J.A. Understanding context-dependency in plant–microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, n. 2, p. 137-145, 2011.
- DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; TEIXEIRA, M.A.; ASSUMPÇÃO, L.C.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.
- DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J.C.; VIEIRA, L.G.E.; MOLINARI, H.B.C.; CAMPOS, M.K.F.; QUOIRIN, M. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 6-12, 2010a.
- DIBAX, R.; QUISEN, R.C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis in vitro. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 311-318, 2010b.
- DING, T.; PALMER, M.W.; MELCHER, U. Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria. **BMC Microbiology**, London, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2013.

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; TAKAKI, G.M.C.; MARIANO, R.L.R.; MACIEL, G.A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas in vitro com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n.1, p. 134-141, 2005.

DOSSA, D.; SILVA, H.D.; BELLOTE, A.F.J.; RODIGHERI, H.R. **Produção e rentabilidade do eucalipto em empresas florestais**. Colombo, Embrapa Florestas, 2002. 4p. (Comunicado Técnico, 83).

DUAN, J. L.; LI, X. J.; GAO, J.M.; WANG, D.S.; YAN, Y.; XUE, Q.H. Isolation and identification of endophytic bacteria from root tissues of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and determination of their bioactivities. **Annals of Microbiology**, Heidelberg, v.63, n.4, p. 1501-1512, 2013.

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

EL-TARABILY, K.A. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 308, n. 1/2, p. 161-174, 2008.

ERRASTI, A.; CARMARÁN, C.C.; VICTORIA-NOVAS, M. Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 41, n. 1, p. 29-40, 2010.

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

ESPOSITO-POLESI, N.P.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Avaliação histoquímica de espécies de microplantas hospedeiras de endófitos. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 19, n. 2, p. 61-71, 2013.

FANG, J.Y.; HSU, Y.R. Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micropropagated *Aglaonema* cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, n. 1, p. 53-62, 2012.

FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA, V.R.O.; MÜLLER, C. In vitro *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 780-783, 2004.

FIGUEIREDO, M.A.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A.G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F. C.; RODRIGUES, V.A. Fontes de potássio no crescimento in vitro de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 255-257, 2008.

FRECKLETON, R.P.; JETZ, W. Space versus phylogeny: disentangling phylogenetic and spatial signals in comparative data. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 276, n. 1654, p. 21-30, 2009.

GAGNE-BOURGUE, F.; ALIFERIS, K.A.; SEGUIN, P.; RANI, M.; SAMSON, R.; JABAJI, S. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 114, n. 3, p. 836-853, 2013.

- GARBEVA, P.; OVERBEEK, L.S. van; VUURDE, J.W.L. van; ELSAS, J.D. van. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA Based PCR Fragments. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 4, p. 369-383, 2001.
- GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A.M.; DE KLERK, G.-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 29-64.
- GERSBACH, P.V. The Essential Oil Secretory Structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 3, p. 255-260, 2002.
- GIT FORESTRY CONSULTING. **Global Eucalyptus map**. Version 1.0.1. Disponível em: <http://git-forestry.com/download_git_eucalyptus_map_PT.htm>. Acesso em: 21 maio 2013.
- GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema*×*Eucalyptus stricklandii* Cv. ‘Urrbae Gem’. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 42, n. 2, p. 139-143, 2006.
- GOMES, F.; CANHOTO, J.M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 39, n. 3, p.316-321, 2003.
- GONÇALVES, A.N. **Reversão a juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*, S.T. Blake “in vitro”**. 1982. 98p.. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.
- GONG, L.J.; GUO, S.X. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 8, n. 5, p. 731-736, 2009.
- GRAÇA, M.E.C.; KALIL FILHO, A.N.; MEDEIROS, A.C.D.S.; TAVARES, F.R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron na multiplicação in vitro de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 107-112, 2001.
- GRANER, E.M. **Avaliações morfofisiológicas do desenvolvimento de microplantas de pupunheiras submetidas a tratamentos com biorreguladores**. 2009. 242p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998. 1 v. p. 183-260.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- GUTIÉRREZ-GINÉS, M.J.; HERNÁNDEZ, A.J.; PÉREZ-LEBLIC, M.I.; PASTOR, J.; VANGRONVELD, J. Phytoremediation of soils co-contaminated by organic compounds and heavy metals: Bioassays with *Lupinus luteus* L. and associated endophytic bacteria. **Journal of Environmental Management**, London, v. 143, p. 197-207, 2014.

HAMILTON, C.E.; GUNDEL, P.E.; HELANDER, M.; SAIKKONEN, K. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2012.

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

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

HARTNEY, V.J. Vegetative propagation of the Eucalyptus. **Australian Forest Research**, Melbourne, v. 10, n. 3, p. 191-211, 1980.

HARVEY, P.H.; PAGEL, M.D. **The comparative method in evolutionary biology**. Oxford, UK: Oxford University Press. 1991. 239p.

HERNANDEZ, J.P.; BASHANA, L.E.; RODRIGUEZ, D.J.; RODRIGUEZ, Y.; BASHANA, Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, n. 1, p. 88-93, 2009.

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

HO, Y.N.; CHIANG, H.M.; CHAO, C.P.; SU, C.C.; HSU, H.F.; GUO, C.T.; HSIEH, J.L.; HUANG, C.C. In planta biocontrol of soilborne Fusarium wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. **Plant and Soil**, The Hague, v. 387, n. 1/2, p. 295-306, 2015.

HOLLANTS, J.; LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; WILLEMS, A.; DE CLERCK, O. Permanent residents or temporary lodgers: characterizing intracellular bacterial communities in the siphonous green alga *Bryopsis*. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, London, v. 80, n. 1754, p. 1-8, 2013.

HUANG, W.Y.; CAI, Y. Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 33, n.1, p. 61-75, 2008.

HUSSAIN, H.; JOHN, M.; AL-HARRASI, A.; SHAH, A.; HASSAN, Z.; ABBAS, G.; RANA, U. A.; GREEN, I. R.; SCHULZ, B.; KROHN, K. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of an endophytic fungus *Phoma* sp. **Journal of King Saud University - Science**, Riade, v. 27, n. 1, p. 92-95, 2015.

HUYS, G.; VANHOUTTE, T.; JOOSSENS, M.; MAHIOUS, A.S.; DE BRANDT, E.; VERMEIRE, S.; SWINGS, J. Coamplification of eukaryotic DNA with 16S rRNA gene-based PCR primers: possible consequences for population fingerprinting of complex microbial communities. **Current Microbiology**, New York, v. 56, n. 6, p. 553-557, 2008.

IKEDA, A.C.; BASSANI, L.L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V.K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M.B.R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L.V.

Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, New York, v. 65, n. 1, p. 154-160, 2013.

IKEDA, S.; OKUBO, T.; ANDA, M.; NAKASHITA, H.; YASUDA, M.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; EDA, S.; MOMIYAMA, A.; KIMIHIRO TERASAWA, K.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Community- and Genome-Based Views of Plant-Associated Bacteria: Plant-Bacterial Interactions in Soybean and Rice. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, n. 9, p. 1398-1410, 2010.

ILIEV, I.; GAJDOSOVÁ, A.; LIBIAKOVÁ, G.; JAIN, S.M. Plant Micropropagation. In: DAVEY M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture: essential methods**. Wiley: Chichester, UK, 2010. chap. 1, p. 1-20.

ISLAM, S.M.A.; MATH, R.K.; KIM, J.M.; YUN, M.G.; CHO, J.J.; KIM, E.J.; LEE, Y.H.; YUN, H.D. Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. **Current Microbiology**, New York, v. 61, n. 4, p. 346-356, 2010.

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, n. 3, p. 173-179, 2008.

JIMTHA, J.C.; SMITHA, P.V.; ANISHA, C.; DEEPTHI, T.; MEEKHA, G.; RADHAKRISHNAN, E.K.; GAYATRI, G.P.; REMAKANTHAN, A. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 118, n. 1, p. 57-66, 2014.

JOVANOVIC, T.; BOOTH, T.H. **Improved species climatic profiles**. Australia: Union Offset Printing, Joint Venture Agroforestry Program, Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. 68p.

KATOCH, M.; SALGOTRA, A.; SINGH, G. Endophytic fungi found in association with *Bacopa monnieri* as potential producers of industrial enzymes and antimicrobial bioactive compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, n. 5, p. 714-722, 2014.

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

KHAN, M.U.; SESSITSCH, A.; HARRIS, M.; FATIMA, K.; IMRAN, A.; ARSLAN, M.; SHABIR, G.; KHAN, Q.; AFZAL, M. Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. **Frontiers in Plant Science**, Arizona, v. 5, n.755, p. 1-10, 2015.

KOUR, A.; SHAWL, A.S.; REHMAN, S.; SULTAN, P.; QAZI, P. H.; SUDEN, P.; KHAJURIA, R.K.; VERMA, V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, n. 7, p. 1115-1121, 2008.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 19-30.

KUBEŠ, M.; DRÁŽNÁ, N.; KONRÁDOVÁ, H.; LIPAVSKÁ, H. Robust carbohydrate dynamics based on sucrose resynthesis in developing Norway spruce somatic embryos at variable sugar supply. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 50, n. 1, p. 45-57, 2014.

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, n. 4, p. 637-642, 2006.

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

LATA, H.; LI, X. C.; SILVA, B.; MORAES, R.M.; HALDA-ALIJA, L. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated *Echinaceae* plants using 16S rRNA sequencing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, n. 3, p. 353-359, 2006.

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

LEIFERT, C.; MORRIS, C.E.; WAITES, W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems in vitro. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 13, n. 2, p. 139-183, 1994.

LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P.J.; MURPHY, K.P. Effects of mineral nutrition on growth of tissue culture plants. In: GLOUDING, K.H. (Ed.). **Horticultural exploitation of recent biological development**. Preston: Lancashire, 1991. p. 43-57

LEITZKE, L.N.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento in vitro de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

LELIE, D. van der; TAGHAVI, S.; MONCHY, S.; SCHWENDER, J.; MILLER, L.; FERRIERI, R.; ROGERS, A.; WU, X.; ZHU, W.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J.; NEWMAN, L. Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.

LEONE, G.F. **Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação in vitro de eucalipto**. 2013. 99p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

LI, T.; LIU, M.J.; ZHANG, X.T.; ZHANG, H.B.; SHA, T.; ZHAO, Z.W. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 409, n. 6, p. 1069-1074, 2011.

- LI, Y.H.; ZHU, J.N.; ZHAI, Z.H.; ZHANG, Q.A. Endophytic bacterial diversity in roots of *Phragmites australis* in constructed Beijing Cuihu Wetland (China). **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 309, n. 1, p. 84-93, 2010.
- LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação in vitro de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 13-19, 2006.
- LIU, Y.; ZUO, S.; ZOU, Y.Y.; WANG, J.H.; SONG, W. Investigation on diversity and population succession dynamics of indigenous bacteria of the maize spermosphere. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, n. 1, p. 391-396, 2012.
- _____ Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. **Annals of Microbiology**, Heidelberg, v. 63, n. 1, p. 71-79, 2013.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Ashville, v. 30, p. 421-427, 1980.
- LONDE, L.N.; SOUSA, C.S.; VIEIRA, C.U.; BONETTI, A.M.; KERR, W.E. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 94-100, 2007.
- LÓPEZ, M. M.; LLOP, P.; OLMOS, A.; MARCO-NOALES, E.; CAMBRA, M.; BERTOLINI, E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, Norfolk, v. 11, n. 1, p.13-46, 2009.
- MA, Y.; PRASAD, M.N.V.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 2, p. 248-258, 2011.
- MANKESSI, F.; SAYA, A.R.;BOUDON, F.; GUÉDON, Y.; MONTES, F.; LARTAUD, M.; VERDEIL, J.; MONTEUUIS, O. Phase change-related variations of dome shape in *Eucalyptus urophylla*×*Eucalyptus grandis* shoot apical meristems. **Trees**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 743-752, 2010.
- McCOMB, J.A.; BENNETT, I.J. Eucalypts (*Eucalyptus* spp.). In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Trees 1. Berlin: Springer-Verlag, 1986. 1 v. p. 340-362.
- McCULLY, M.E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 28, n. 9, p. 983-990, 2001.
- MEJÍA, L.C.; HERRE, E.A.; SPARKS, J.P.; WINTER, K.; GARCÍA, M N.; VAN BAELE, S. A.; STITT, J.; SHI, Z.; ZHANG, Y.; GUILTINAN, M.J.; MAXIMOVA, S N. Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 479, p. 1-16, 2014.

MENGONI, A.; SCHAT, H.; VANGRONSVELD, J. Plants as extreme environments? Niresistant bacteria and Ni-hyper accumulators of serpentine flora. **Plant and Soil**, The Hague, v. 331, n. 1/2, p. 5-16, 2010.

MIZRA, 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 micropropagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, n. 1, p. 47-54, 2001.

MORENO-VÁZQUEZ, S.; LARRAÑAGA, N.; UBERHUAGA, E.C.; BRAGA, E.J.B.; PÉREZ-RUIZ, C. Bacterial contamination of in vitro plant cultures: confounding effects on somaclonal variation and detection of contamination in plant tissues. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 119, n. 3, p. 533-541, 2014.

MORICCA, S.; GINETTI, B.; RAGAZZI, A. Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, n. 3, p. 587-598, 2012.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: A lesson from *Discula quercina*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 4, p. 380-386, 2008.

MUJIU, L.; ARNOLD, R.; BOHAI, L.; MINSHENG, Y. Selection of cold-tolerant eucalypts for Hunan Province. In: TURNBULL, J.W. (Ed.). **Eucalyptus in Asia**: proceedings of an international conference held in Zhanjiang, Guangdong, people's Republic of China. Canberra: Elect Printing, 2003. p. 107–116. (ACIAR. Proceedings, 111).

MUKHTAR, I.; MUSHTAQ, S.; ALI, A.; KHOKHAR, I. Epiphytic and endophytic phyllosphere microflora of *Cassytha filiformis* L. and its hosts. **Ecoprint**, Nepal, v. 17, p. 1-8, 2010.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MUYZER, G. DGGE/ TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, n. 3, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Mini review. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.

MYBURG, A.A. GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G.A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R.D.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; LINDQUIST, E.; TICE, H.; BAUER, D.; GOODSTEIN, D. M.; MIZRACHI, E.; KULLAN, A.R.K.; DUBCHAK, I.; POLIAKOV, A.; HUSSEY, S.G.; PINARD, D.; MERWE, K. van der; SINGH, P.; JAARVELD, I.; SILVA JÚNIOR, O.B.; TOGAWA, R.C.; PAPPAS, M.R.; FARIA, D.A.; SANSALONI, C.P.; PETROLI, C.D.; YANG, X.; RANJAN, P.; TSCHAPLINSKI, T.J.; YE, C.Y.; LI, T.; STERCK, L.; VANNESTE, K.; MURAT, F.; SOLER, M.; CLEMENTE, H.S.; SAIDI, N.; CASSANWANG, H.; DUNAND, C.; HEFER, C.A.; BORNBERG-BAUER, E.; KERSTING, A.R.; VINING, K.; AMARASINGHE, V.; RANIK, M.; NAITHANI, S.; ELSE, J.; BOYD, A. E.; LISTON, A.; SPATAFORA, J.W.; DHARMWARDHANA, P.; RAJA, R.; SULLIVAN, C.; ROMANEL, E.; ALVES-FERREIRA, M.; LHEIM, C.K.; FOLEY, W.; CAROCHA, V.; PAIVA, J.; KUDRNA, D.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; PASQUALI, G.; BYRNE, M.; RIGAULT, P.; TIBBITS, J.; SPOKEVICIUS, A.; JONES, R.C.; STEANE, D.A.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M., JOUBERT, F.; BARRY, K.; PAPPAS JÚNIOR, G. J.; STRAUSS, S. H.; JAISWALL, P.; GRIMA-PETTENATI, J.; SALSE, J.; PEER, Y. van der; ROKHSAR, D. S.; SCHMUTZ, J. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, London, v. 510, n. 7505, p. 356-362, 2014.

NAKHOODA, M.; WATT, M. P.; MYCOCK, D. Auxin stability and accumulation during in vitro shoot morphogenesis influences subsequent root induction and development in *Eucalyptus grandis*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 65, n. 2, p. 263-271, 2011.

NAVROSKI, M.C.; REINIGER, L.R.S.; ARAÚJO, M.M.; CURTI, A.R.; PEREIRA, M.O. In vitro establishment and multiplication of genotypes of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 1, p. 139-146, 2014.

NAVROSKI, M.C.; REINIGER, L.R.S.; PEREIRA, M.O.; CURTI, A.R.; PAIM, A.F. Alongamento in vitro de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 4, p. 545-550, 2013.

NEHRA, N.S.; BECWAR, M.R.; ROTTMANN, W.H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H.D.; KODRZYCKI, R.J.; ZHANG, C.; GAUSE, K.C.; PARKS, D. W.; HINCHEE, M.A. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 41, n.1, p. 701-717, 2005.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, London, v. 23, n. 1, p. 6-8, 2005.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

NISSINEN, R.M.; MÄNNISTÖ, M.K.; ELSAS, J.D. Endophytic bacterial communities in three arctic plants from low arctic fell tundra are cold-adapted and host-plant specific. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 82, n. 2, p. 510-522, 2012.

NOWAK, J.; PRUSKI, K. Priming tissue cultured propagules. In: **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. IAEA-TECDOC-1384, International Atomic Energy Agency (IAEA), Austria; Vienna, 2004. p. 69-81.

OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OLIVEIRA, M.L.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R.M.; OTONI, W.C.; TEIXEIRA, J.B. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação in vitro de clones de *Eucalyptus grandis*×*E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011.

OLIVEIRA-CAUDURO, Y.D.; ADAMUCHIO, L.G.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; BESPALHOK FILHO, J.C.; DIBAX, R.; QUOIRIN, M. Organogênese indireta a partir de explantes foliares e multiplicação in vitro de brotações de *Eucalyptus benthamii*×*Eucalyptus dunnii*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 2, p. 347-355, 2014.

OSTROLUCKÁ, M.G.; LIBIAKOVÁ, G.; ONDRUŠKOVÁ, E.; GAJDOŠOVÁ, A. In vitro propagation of *Vaccinium* species. **Acta Universitatis Latviensis, ser. Biology**, Latvia, n. 676, p. 207-212, 2004.

PALMA, D.; SCHUELTER, A.R.; STEFANELLO, S.; FORTES, A.M.T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v.17, v. 2, p.174-184, 2011.

PARVEEN, S.; SHAHZAD, A. Factors affecting in vitro plant regeneration from cotyledonary node explant of *Senna sophora* (L.) Roxb.—A highly medicinal legume. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 13, n. 3, p. 413-422, 2014.

PASQUAL, M.; ALVES, G.P.; DUTRA, L.F.; FINOTTI, D.R.; CHAGAS, E.A. Cultivo in vitro de embriões imaturos de tangerina ‘Poncã’: concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 49, n. 282, p. 181-189, 2002.

PEREIRA, G.A.; BOLIANI, A.C.; FURLANI JÚNIOR, E. Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira ‘Thap maeo’. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 3, p. 299-305, 2014.

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

PICCOLO, S.L.; FERRARO, V.; ALFONZO, A.; SETTANNI, L.; ERCOLINI, D.; BURRUANO, S.; MOSCHETTI, G. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. **Annals of Microbiology**, Heidelberg, v. 60, n.1, p. 161-167, 2010.

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

PINHEIRO, J.C.; MARQUES, C.R.; PINTO, G.; BOUGUERRA, S.; MENDO, S.; GOMES, N.C.; GONÇALVES, F.; ROCHA-SANTOS, T.; DUARTE, A.C.; ROEMBEKE, J.; SOUSA, J. P.; KSIBI, M.; HADDIOUI, A.; PEREIRA, R. The performance of *Fraxinus angustifolia* as a helper for metal phytoremediation programs and its relation to the endophytic bacterial communities. **Geoderma**, Amsterdam, v. 202, p. 171-182, 2013.

- PINI, F.; FRASCELLA, A.; SANTOPOLO, L.; BAZZICALUPO, M.; BIONDI, E.G.; SCOTTI, C.; MENGONI, A. Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 78, p. 1-10, 2012.
- PINI, F.; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. Plant-bacteria association and symbiosis: are there common genomic traits in *Alphaproteobacteria*?. **Genes**, Basel, v. 2, n. 4, p. 1017-1032, 2011.
- PINTO JÚNIOR, J.E.; SANTOS, P.E.T.; AGUIAR, A.V.; KALIL FILHO, A.N.; PALUDZYSZYN FILHO, E.; STURION, J.A.; SOUSA, V.A. **Melhoramento genético de espécies arbóreas na Embrapa Florestas: uma visão histórica**. Colombo: Embrapa Florestas, 2013. 111p. (Documento, 259).
- PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y. S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 1, p. 79-88, 2008.
- PIOTTO, K.D.B. **Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento in vitro de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**. 2013. 157p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- PIRTTILÄ, A.M.; JOENSUU, P.; POSPIECH, H.; JALONEN, J.; HOHTOLA, A. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, n.2, p. 305-312, 2004.
- PIRTTILÄ A.M.; POSPIECH, H.; LAUKKANE, H.; MYLLYLÄ, R.; HOHTOLA, A. Seasonal variations in location and population structure of endophytes in buds of Scots pine. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 289-297, 2005.
- PIRTTILÄ, A.M.; PODOLICH, O.; KOSKIMÄKI, J.J.; HOHTOLA, E.; HOHTOLA, A. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 1, p. 47-55, 2008.
- PIRTTILÄ, A.M.; LAUKKANE, H.; HOHTOLA, A. Chitinase production in pine callus (*Pinus sylvestris* L.): a defense reaction against endophytes? **Planta**, Berlin, v. 214, n. 6, p. 848-852, 2002.
- POLESI, N.P.E. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. 2010. 120p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- POTTS, B.M.; DUNDGEY, H.S. Interspecific Hybridisation of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. **New Forests**, Amsterdam, v.27, n.2, p.115-138, 2004.
- PRAKASH, S.; HOQUE, M.I.; BRINKS, T. Culture Media and Containers. In: **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. IAEA-TECDOC-1384, International Atomic Energy Agency (IAEA), Austria; Vienna, 2004. p. 29-40.

PRASANNA, R.; NAIN, L.; PANDEY, A.K.; SAXENA, A.K. Microbial diversity and multidimensional interactions in the rice ecosystem. **Archives of Agronomy and Soil Science**, Berlin, v. 58, n. 7, p. 723-744, 2012.

PRYOR, L.D.; WILLIAMS, E.R.; GUNN, B.V. A Morphometric analysis of *Eucalyptus urophylla* and related taxa with descriptions of two new species. **Australian Systematic Botany**, Melbourne, v. 8, n. 1, p. 57-70, 1995.

PULLMAN, G.S.; JOHNSON, S. Loblolly pine (*Pinustaeda*) female gametophyte and embryo pH changes during seed development. **Tree Physiology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 829-836, 2009.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.H.; XU, L.H.; LI, W.J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

QIU, M.; XIE, R.S.; SHI, Y.; ZHANG, H.; CHEN, H.M. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. **Annals of Microbiology**, Heidelberg, v. 60, n. 1, p. 143-150, 2010.

QUAMBUSCH, M.; PIRTTILÄ, A.M.; TEJESVI, M.V.; WINKELMANN, T.; BARTSCH, M. Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. **Tree Physiology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 524-533, 2014.

RAMOND, J.B.; TSHABUSE, F.; BOPDA, C.W.; COWAN, D.A.; TUFFIN, M.I. Evidence of variability in the structure and recruitment of rhizospheric and endophytic bacterial communities associated with arable sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Plant and Soil**, The Hague, v. 372, n. 1-2, p. 265-278, 2013.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

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

SAIKKONEN, K. Forest structure and fungal endophytes. **Fungal Biology Reviews**, Oxford, v. 21, n. 2/3, p. 67-74, 2007.

SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SANTOS, D.C.; WENDLING, I.; GROSSI, F. Efeito de diferentes combinações de fitorreguladores e vitaminas no desenvolvimento in vitro e ex vitro de *Grevillea robusta* Cunn. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 6 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 122).

- SCHUCH, M.W.; DAMIANI, C.R.; SILVA, L.C.; ERIG, A.C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar climax. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008.
- SCHUMACHER, M .V.; CALIL, F.N.; VOGEL, H.L.M. **Silvicultura Aplicada**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. 120p.
- 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**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 23-32, 2002.
- SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 511-518, 2000.
- SHEN, H.; LI, Z.; HAN, D.; YANG, F.; HUANG, Q.; RAN, L. Detection of indigenous endophytic bacteria in *Eucalyptus urophylla* in vitro conditions. **Frontiers of Agriculture in China**, Hebei, v. 4, n. 1, p. 37-41, 2010.
- SHENG, H.M.; GAO, H.S.; XUE, L.G.; DING, S.; SONG, C.L.; FENG, H.Y.; AN, L.Z. Analysis of the composition and characteristics of culturable endophytic bacteria within subnival plants of the tianshan mountains, northwestern China. **Current Microbiology**, New York, v. 62, n. 3, p. 923-932, 2011.
- SILVA, I.M.D.C.D.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B.; BIANCHI, V.J. Resposta diferencial ao uso do Thidiazuron na regeneração in vitro de marmeleiros, cvs. ADAMS E MC. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 3/4, p. 375-382, 2011.
- SINGH, N.; PANDEY, P.; DUBEY, R.C.; MAHESHWARI, D.K. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, n. 9, p. 1669-1679, 2008.
- SOBROSA, R.C.; CORDER, M.P.M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in vitro. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.58-68, 2003.
- SOUZA, F.V.D.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; COSTA, M. A.P.C. Micropropagação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 38-52.
- STAPE, J.L. A pesquisa silvicultural e a visão socioambiental são imprescindíveis para os novos clusters florestais. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, 2008. 37p.
- SUKUMAR, P.; LEGUE, V.; VAYSSIERES, A.; MARTIN, F.; TUSKAN, G. A.; KALLURI, U. C. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 909-919, 2013.

SULICHANTINI, E.D.; SUTISNA, M.; SUKARTININGSIH, S.; RUSDIANSYAH, R. Clonal Propagation of Two Clones *Eucalyptus Pellita* F. Muell By Mini-Cutting.

International Journal of Science and Engineering, Semarang, v. 6, n. 2, p. 112-116, 2014.

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, n. 3, p. 415-424, 2008.

THOMAS, P. Intense association of non-culturable endophytic bacteria with antibiotic-cleansed in vitro watermelon and their activation in degenerating cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 12, p. 2313-2325, 2011.

_____ Long-term survival of *Bacillus* spores in alcohol and identification of 90% ethanol as relatively more spori/bactericidal. **Current Microbiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 130-139, 2012.

_____ Reemergence of covert bacteria *Bacillus pumilus* and *Brevibacillus* sp. in microbe-free grape and watermelon stocks attributable to occasional autoclaving-defying residual spores from previous cycles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, n. 2, p. 155-165, 2006.

THOMAS, P.; ASWATH, C. Alcohol-mediated horizontal spread of *bacillus* spores and assessing the recurrent sterilization needs of culture-handling tools contaminated with hardy spores. **Proceedings National Academy of Sciences**, India, v. 83, n. 2. p.207-213, 2013.

_____ In vitro introduction of hardy alcohol resistant *bacillus* spp. through aseptically grown watermelon seedlings. **Advances in Microbiology**, New York, v.4, n.9, p. 504-510, 2014.

THOMAS, P.; GOPLAKRISHNAN, C.; KRISHNAREDDY, M. Soft rot inciting *Pectobacterium carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora*) is unlikely to be transmitted as a latent pathogen in micropropagated banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 3, p. 423-429, 2011.

THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, n. 4, p. 469-474, 2010.

THOMAS, P.; KUMARI, S.; SWARNA, G. K.; GOWDA, T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 3, p. 380-390, 2007.

THOMAS, P.; PRABHAKARA, B.S.; PITCHAIMUTHU, M. Cleansing the long-term micropropagated triploid watermelon cultures from covert bacteria and field testing the plants for clonal fidelity and fertility during the 7–10 year period in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, n.3, p. 317-329, 2006.

THOMAS, P.; PRAKASH, G.S. Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years in vitro. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 6, p. 603-607, 2004.

THOMAS, P.; REDDY, K.M. Microscopic elucidation of abundant endophytic bacteria colonizing the cell wall–plasma membrane peri-space in the shoot-tip tissue of banana. **AoB Plants**, Oxford, v. 5, n. plt011, p. 1-12, 2013.

THOMAS, P.; SOLY, T. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n.4, 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, n.1, p. 55-63, 2008.

THOMAS, P.; SEKHAR, A.C. Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. **AoB Plants**, Oxford, v. 6, n. plu002, p. 1-12, 2014.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998. 509 p., 1 v.

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

TROTSSENKO, Y.A.; IVANOVA, E.G.; DORONINA, N.V. Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. **Microbiology**, Moscow, v. 70, n.6, p. 623-632, 2001.

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, n. 3, p. 347-351, 2008.

VAZ, A B.M.; da COSTA, A.G.F.C.; RAAD, L.V.V.; GOES-NETO, A. Fungal endophytes associated with three South American Myrtae (Myrtaceae) exhibit preferences in the colonization at leaf level. **Fungal Biology**, Oxford, v. 118, n. 3, p. 277-286, 2014.

VENGADESAN, G.; PIJUT, P.M. In Vitro propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 45, n. 4, p. 474-482, 2009.

WATT, M.P. Genotypic-unspecific protocols for the commercial micropropagation of *Eucalyptus grandis*×*nitens* and *E. grandis*×*urophylla*. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 38, n. 1, p. 125-133, 2014.

WATT, M.P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. In vitro field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.

WENDLING, I.; BRONDANI, G.E.; BIASSIO, A.; DUTRA, L.F. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 1, p. 117-125, 2013.

WENDLING, I.; BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; HANSEL, F. A. Mini-cuttings technique: a new ex vitro method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 343-353, 2010.

WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: EMBRAPA Florestas. 2006. 54p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).

WENDLING, I.; XAVIER, A. Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 475-480, 2003.

WERNER, E.T.; MILANEZ, C.R.D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botânica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

XAVIER, A.; OTONI, W.C. Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, San José, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.

XAVIER, A.; SANTOS, G.A. **Clonagem em espécies florestais nativas**. In: ROCHA, M.G.B. Melhoramento de espécies arbóreas nativas. Belo Horizonte: IEF, 2002. p. 29-40.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Editora UFV, 2009. 272p.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011.

YAN, J. F.; BROUGHTON, S. J.; YANG, S. L.; GANGE, A. C.; Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? **Fungal Ecology**, Netherlands, v. 13, n.1, p. 53-59, 2015.

3 MANIFESTAÇÃO ENDOFÍTICA E A MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE DUAS FONTES DE EXPLANTE DE *Eucalyptus benthamii* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Resumo

O trabalho objetivou avaliar fontes distintas de explantes de *E. benthamii* na multiplicação *in vitro* sob diferentes condições de cultivo, quanto aos aspectos morfofisiológicos, massa seca, manifestação endofítica e análise histoquímica. Para isso, utilizou-se microcepas de um clone de *E. benthamii*, provenientes de duas regiões (megaestacas da base da copa e anelamento da base do tronco) e estabelecidas *in vitro* em fase de multiplicação. As microcepas foram cultivadas em meio WPM, MS ou JADS, suplementados com 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 0,05 mg L⁻¹ de ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4,5 g L⁻¹ de ágar. Com base nos melhores resultados realizou-se outro experimento avaliando-se as concentrações 0, 30 e 60 g L⁻¹ de sacarose e os pHs de 4,8; 5,8 ou 6,8 do meio de cultivo. Ambas as microcepas apresentaram melhor desenvolvimento no meio de cultura WPM, porém, verificou-se superioridade nas de megaestaca. Para sacarose, as respostas foram semelhantes para ambas as fontes de explantes, destacando-se a morte das microcepas na ausência de sacarose, elevada oxidação com 60 g L⁻¹ e o melhor desenvolvimento na concentração de 30 g L⁻¹. Com relação ao pH, não houve alteração no desenvolvimento das microcepas. A manifestação endofítica ocorreu em maior intensidade em microcepas provenientes de megaestaca. Dessa forma, a fonte de explante responde distintamente aos tratamentos, devido aos aspectos fisiológicos e genéticos intrínsecos, podendo determinar o sucesso da micropropagação, bem como a presença de manifestação endofítica, uma vez que ajustes no protocolo podem favorecer uma fonte em detrimento da outra, ou promover e inibir estas manifestações.

Palavras-chave: Fontes de Explantes; Rejuvenescimento; Ajuste de Protocolo; Sacarose; Ph

Abstract

This study evaluated morphophysiological aspects, dry mass, endophytic manifestation and histochemical analysis of *Eucalyptus benthamii* explants from different sources under different growing conditions for *in vitro* multiplication. To this end, we used micro-stumps, of one *E. benthamii* clone, from two regions (treetop base mega-cuttings and trunk base girdling) and established them *in vitro* and in multiplication phase. Micro-stumps were cultured in WPM, JADS or MS media, and all were supplemented with 0.5 mg L⁻¹ of BAP, 0.05 mg L⁻¹ NAA, 30 g L⁻¹ sucrose and 4.5 g L⁻¹ agar. Based on the best results in initial experiments, further tests were performed to evaluate 0, 30 and 60 g L⁻¹ sucrose concentrations and 4.8, 5.8 or 6.8 pH cultivation media. Although micro-stumps exhibited better development in WPM medium, mega-cuttings were superior. For sucrose, the responses were similar for both explant sources, with micro-stumps dying in the absence of sucrose, demonstrating high oxidation with 60 g L⁻¹ and developing optimally in the 30 g L⁻¹ concentration. With respect to pH, there was no change in the micro-stumps' development. Endophytic manifestation occurred at a higher intensity in micro-stumps from mega-cuttings. Thus, the explant source responded to treatment distinctively due to physiological and genetic intrinsic factors. These factors may determine micropropagation success and the presence of endophytic manifestation because the protocol may favor one source over another source and inhibit or promote these manifestations.

Keywords: Explant Source; Rejuvenation; Protocol Setting; Sucrose; pH

3.1 Introdução

O eucalipto é amplamente cultivado nas diferentes regiões tropicais e subtropicais do mundo para atender a crescente demanda mundial por biomassa, pois representa uma fonte de recurso renovável (ROCKWOOD et al., 2008). Entretanto, dentre as 700 espécies que compreendem o gênero *Eucalyptus* (AGGARWAL et al., 2012; BROOKER, 2000) menos de 20 são plantadas em escala comercial (GONZALEZ et al., 2011). Além disso, a necessidade de se cultivar em regiões que apresentam restrições climáticas, tais como seca e geada, restringe ainda mais a sua expansão.

Eucalyptus benthamii Maiden & Cabbage é uma espécie potencial para plantio em regiões mais frias, devido a sua tolerância à geadas, permitindo assim seu cultivo nestas áreas (BRONDANI et al., 2012; MUJIU et al., 2003). A expansão dos plantios com *E. benthamii* tem sido limitado pelas dificuldades encontradas na sua propagação. As sementes quando disponíveis são de alto custo, e a propagação assexuada, por sua vez, possui restrições quanto ao enraizamento de estacas e à incompatibilidade à enxertia (BRONDANI et al., 2012).

Nesse contexto, a micropropagação se apresenta como uma alternativa na propagação da espécie, uma vez que as técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido extensivamente estudadas para o gênero *Eucalyptus* (AGGARWAL et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Atualmente, o uso da micropropagação em *Eucalyptus* tem se justificado, comercialmente, para o rejuvenescimento de materiais adultos, buscando melhorar os índices de enraizamento adventício das estacas (SULICHANTINI et al., 2014; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

A fonte de explante constitui um dos fatores predominantes no sucesso da micropropagação (LIMA; MORAES, 2006). A escolha do explante para introdução *in vitro* está relacionada com o estado fisiológico da planta-matriz, com o tipo de explante e a época de coleta, pois influenciam diretamente nas taxas de multiplicação *in vitro* (BORGES et al., 2011; HARTMANN et al., 2011; SILVA et al., 2011). No caso específico de trabalhos objetivando o rejuvenescimento (reversão do estágio maduro para o juvenil) a idade do explante exerce ainda maior influência, pois o uso de explantes maduros pode diminuir consideravelmente a competência de organogênese e outros processos de regeneração da planta *in vitro* (SCHUCH et al., 2008).

Na micropropagação, fatores extrínsecos ao material vegetal, tais como meio de cultura, concentração de açúcares e pH do meio de cultivo também podem afetar significativamente as respostas *in vitro*. Dentre estes fatores, o meio de cultura se destaca

como o principal a influenciar a multiplicação *in vitro* (CALDAS et al., 1998; GEORGE; DEBERGH, 2008). Os meios de cultura mais empregados na micropropagação de *Eucalyptus* são o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o WPM (LLOYD; McCOWN, 1988) e o JADS (CORREIA et al., 1995).

O pH corresponde a outro fator importante, podendo alterar a disponibilidade de nutrientes e reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PASQUAL et al., 2002). A adição de açúcares, bem como a sua concentração podem garantir melhorias na propagação *in vitro*, influenciando vários processos metabólicos com efeitos diretos no crescimento e diferenciação dos tecidos (SKREBSKY; NICOLOSO; FERRÃO, 2004; KUBEŠ et al., 2014). Contudo, os trabalhos de micropropagação de *Eucalyptus* se concentram em analisar os reguladores de crescimento, havendo informações insuficientes a respeito do efeito desses outros fatores no cultivo *in vitro* da espécie.

Adicionalmente, quando se objetiva o rejuvenescimento, têm se aplicado para o gênero subcultivos sucessivos na ordem de 10 a 12 (ALFENAS et al., 2004; BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), mas este procedimento pode, ocasionalmente, induzir o crescimento, no meio de cultivo, de alguns microrganismos endofíticos latentes. A esse fenômeno convencionou-se denominar de manifestação endofítica, que se desenvolve em muitos casos em resposta ao tempo excessivo de multiplicação do material vegetal, ou às variações microambientais (THOMAS, 2004; THOMAS; KUMARY, 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento de duas fontes de explantes (megaestaca da base da copa e anelamento da base do tronco) de um clone de *E. benthamii* na multiplicação *in vitro* sob diferentes condições de cultivo, bem como, avaliar o efeito dessas condições na manifestação endofítica.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal

Segmentos nodais de minicepas cultivadas sob condições de casa de vegetação (umidade relativa do ar >80%, temperatura entre 26 a 30 °C, crescendo em vasos com areia lavada) foram utilizados como fontes de explantes. Essas minicepas, estabelecidas em minijardim clonal por Baccarin (2012), foram obtidas a partir de brotos ou brotações epicórmicas de duas regiões distintas (megaestaca da base da copa e de anelamento da base do

tronco), provenientes de uma única matriz selecionada de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage com 13 anos de idade (Figura 1).

3.2.2 Estabelecimento in vitro

Antes da coleta, fez-se a aplicação, no jardim clonal, de $2,4 \text{ g L}^{-1}$ de fungicida Orthocide 500[®] (Arysta LifeScience) (Captan 50% como princípio ativo). Segmentos nodais (explantes) do terço médio dos brotos, contendo um par de gemas axilares e medindo aproximadamente 1,5 cm foram coletados e imersos em água deionizada para transporte para o laboratório de cultura de tecidos vegetais.

Inicialmente, os explantes foram lavados em água corrente durante vinte e cinco minutos com duas gotas de Twenn 20 (0,05 %, v/v) e logo após procedeu-se a lavagem em água deionizada autoclavada. Em seguida, os explantes foram colocados em solução de fungicida contendo $2,4 \text{ g L}^{-1}$ de Orthocide[®], por 15 minutos, ao final dos quais procedeu-se três lavagens, em água deionizada autoclavada.

Posteriormente, os explantes foram imersos em solução de NaOCl 1% (v/v) Brilhante[®] por 5 minutos, adicionados de três gotas Tween 20. Em seguida os mesmos foram conduzidos à câmara de fluxo laminar para proceder a tríplice lavagem com água deionizada autoclavada.

Após a assepsia ambos os tipos de explantes de *E. benthamii* foram introduzidos *in vitro* utilizando-se meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6-benzilamino purina), sacarose ($30,0 \text{ g L}^{-1}$) e ágar ($4,5 \text{ g L}^{-1}$). O meio de cultura foi preparado com água deionizada, pH ajustado para 5,8 com HCl (1M) e NaOH (1M), e autoclavado por 20 minutos a 121°C ($\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$). Os explantes foram cultivados por 40 dias em sala de crescimento com condições controladas.

Figura 1 - Detalhamento do material vegetal utilizado para a realização da pesquisa, bem como as fases iniciais de cultivo in vitro, até o início dos experimentos de multiplicação (após o 10º subcultivo)

3.2.3 Multiplicação in vitro

As brotações originadas na fase de estabelecimento *in vitro* foram transferidas (Figura 1), sob condições assépticas, no meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 0,05 mg L⁻¹ ANA (ácido 1-naftalenoacético), 30 g L⁻¹ de sacarose e 4,5 g L⁻¹ de ágar (meio de multiplicação). O meio de cultura foi preparado com água deionizada, pH ajustado para 5,8, e autoclavado por 20 minutos a 121°C.

A cada 20 dias procedeu-se o subcultivo das microcepas (conjunto de cerca de 10 brotações axilares) para novo meio de cultura de igual composição.

3.2.4 Experimentos de Multiplicação in vitro

Após 10 subcultivos sucessivos, as microcepas assintomáticas de *E. benthamii* (sem crescimento visível de microrganismos no meio de cultura) de cada fonte (megaestaca da base copa e anelamento da base do tronco) foram utilizadas para a realização do experimento de desenvolvimento das microcepas em diferentes meios de cultivo. Para tanto, as microcepas foram inoculadas em tubos de ensaio ($\varnothing = 2,5$ cm) contendo 5 mL de meio WPM, MS ou JADS (CORREIA et al., 1995), suplementados com 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 0,05 mg L⁻¹ ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4,5 g L⁻¹ de ágar.

O segundo experimento (Figura 2) foi realizado com base nos resultados obtidos no primeiro, ou seja, selecionando-se o melhor meio de cultivo. Neste objetivou-se avaliar o desenvolvimento das microcepas ao alterar-se as concentrações de sacarose e os valores de pH. Dessa forma, as microcepas de cada fonte (no 13º subcultivo), foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio WPM suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 0,05 mg L⁻¹ ANA e 4,5 g L⁻¹ de ágar, combinando-se três concentrações de sacarose (0, 30 e 60 g L⁻¹) com três valores de pHs (4,8; 5,8 e 6,8).

Para cada experimento, realizaram-se dois subcultivos sucessivos, cada um com duração de 20 dias, somente para renovação do meio de cultura, mantendo-se todas as condições do subcultivo anterior, totalizando um período de 40 dias por experimento.

Figura 2 - Segundo experimento de avaliação do efeito da concentração de sacarose e do pH no desenvolvimento, multiplicação e manifestação endofítica das microcepas de *E. benthamii*

3.2.4.1 Parâmetros Avaliados

Foram avaliados os seguintes parâmetros: aspectos morfofisiológicos (aparência e vigor), oxidação, massa seca e indução da manifestação endofítica. As avaliações ocorreram ao final de cada subcultivo por meio de análise visual atribuindo-se notas para a aparência: ruim (0), regular (1), média (2), normal (3) ou excelente (4); para oxidação e manifestação endofítica: (0) ausência e (1) presença. A massa seca foi avaliada ao final do experimento, cujo valor foi mensurado pela pesagem de 6 amostras de cada tratamento, previamente e individualmente embaladas em papel Kraft e submetidas a secagem em estufa a 60 °C por no mínimo 72 horas até a obtenção de peso constante.

3.2.4.2 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial: para o primeiro experimento (2x3), testando-se as duas origens e três meios de cultivo (WPM, MS e JADS), utilizando-se 24 repetições com 1 explantes por repetição (tubo), e para o segundo (2x2x3x3), testando-se as duas origens, os dois subcultivos, as três concentrações de sacarose (0, 30 e 60 g L⁻¹) e três pHs (4,8; 5,8 e 6,8), utilizando-se 6 repetições com 1 explantes por repetição (tubo).

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $P < 0.05$ e $P < 0.01$) e ao teste de Tukey ($p > 0,05$) para comparação das médias utilizando o pacote estatístico ASSISTAT (versão 7.6 Beta) (SILVA; AZEVEDO, 2002).

3.2.5 Condições Cultivo

As condições de cultivo, do estabelecimento *in vitro*, multiplicação e dos experimentos de multiplicação, foram controladas, com temperatura de 25 ($\pm$ 2°C), fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes, branca fria).

3.2.6 Análise Histoquímica

Para verificar a ocorrência de possíveis alterações metabólicas e morfológicas nas microcepas submetidas aos diferentes tratamentos do segundo experimento, realizou-se análise histoquímica das amostras teciduais do terço médio da lâmina foliar das microcepas (Figura 3). Para tanto as amostras foram fixadas em solução Karnovsky (1965), posteriormente desidratadas em série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20,

30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% v/v) e inclusas em resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica®, Heidelberg, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos com as amostras foram seccionados transversalmente em micrótomo rotativo com aproximadamente 5 µm de espessura.

As secções histológicas foram submetidas à dupla coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) (MAIA, 1979) e Naphtol blue-black (ALMEIDA et al., 2012), resultando em uma coloração rosa para polissacarídeos na parede celular e amido no citoplasma, laranja para compostos fenólicos e azul para proteínas. As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2®, Carl Zeiss, Jena, Germany) sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera (MA88-300, Premiere® Câmera EyePieces, Microscopes América Inc., Cumming, GA, EUA), atribuindo-se o critério de avaliação segundo os parâmetros: ausência (-) ou presença (+) das substâncias e, quantitativamente, classificados como pouco presente (+), moderadamente presente (++) ou intensamente presente (+++), de acordo com a intensidade das respostas (ESPOSITO-POLESI; ALMEIDA; ALMEIDA, 2013).

Figura 3 - Avaliação histoquímica das microcepas de *E. benthamii*

3.3 Resultados

3.3.1 Fonte de explante e Meio de cultivo

Do ponto de vista dos aspectos morfofisiológicos (Figura 4A), ao se comparar as origens, tem-se que as microcepas de megaestaca apresentaram avaliação igual às de anelamento quando cultivadas em WPM, e inferior nos demais meios de cultura (MS e JADS). As microcepas de megaestaca, avaliadas em relação aos três meios de cultivo, tiveram ligeiro aumento no desenvolvimento em WPM, quando comparadas ao MS e JADS, nas microcepas de anelamento observou-se o oposto.

Figura 4 - Valores médios do aspecto morfológico de vigor (A) e de massa seca (B) das microcepas de *E. benthamii* provenientes de anelamento do tronco e megaestacas da copa em três diferentes meios de cultura (WPM, MS e JADS). Letras minúsculas iguais para duas diferentes procedências de material vegetativo dentro de um mesmo meio de cultura e letras maiúsculas iguais para os diferentes meios de cultura dentro de uma mesma procedência de material vegetativo, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Considerando-se a massa seca (Figura 4B), os maiores acúmulos foram para as microcepas de megaestaca nos meios WPM (215,7 mg) e MS (229,9 mg). Em contrapartida no meio JADS as massas foram iguais (205,1 mg para anelamento e 200,9 mg para megaestaca) (Figura 4B). Nota-se, porém que não houve variação para os pesos de massa seca das microcepas de anelamento, independentemente do meio de cultivo.

Ressalta-se que houve multiplicação diferenciada das microcepas de megaestaca cultivadas no meio MS (Figura 5), o que promoveu incremento de massa seca das brotações. Adicionalmente a esta multiplicação ocorreu hiperhidricidade (Figura 5, seta branca) das microcepas, o que interferiu sensivelmente nos aspectos morfofisiológicos.

Figura 5 - Microcepas de megaestaca e de anelamento por meio dos aspectos morfofisiológicos de vigor nos meios de cultura MS, WPM e JADS aos 40 dias de subcultivo. Seta branca = microcepas hiperhidratadas de megaestaca em MS; seta preta = oxidação nos meios de cultivos MS para as microcepas de anelamento e no meio JADS para megaestaca. Barras = 0,5 cm

De maneira geral, a oxidação das brotações das microcepas, independentemente da origem, mostrou-se ausente em WPM, intermediária em MS e intensa no meio JADS (Figura 6). Os resultados demonstraram maior oxidação das brotações das microcepas de anelamento cultivadas em meio MS (Figura 5, seta preta) e das de megaestaca cultivadas em meio JADS (Figura 5, seta preta). Entretanto, verifica-se que para ambas as origens o meio WPM não promoveu a oxidação, o que lhe confere uma característica importante do ponto de vista de desenvolvimento das microcepas.

Figura 6 - Valores médios da oxidação das microcepas de megaestaca da copa e anelamento do tronco de *E. benthamii* em função de três diferentes meios de cultura (WPM, MS e JADS). Letras minúsculas iguais para duas diferentes procedências de material vegetativo dentro de um mesmo meio de cultura e letras maiúsculas iguais para os diferentes meios de cultura dentro de uma mesma procedência de material vegetativo, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

As manifestações endofíticas não foram promovidas ou induzidas pelos meios ou balanços nutricionais por eles oferecidos, tanto para as microcepas provenientes de anelamento quanto para as de megaestaca.

3.3.2 Sacarose e pH

Os resultados permitiram verificar variações nas respostas de acordo com a fonte de explante (megaestaca da base da copa e anelamento da base do tronco), com o subcultivo, concentração de sacarose e pH. Para melhor entendimento dessas variações, serão apresentados os resultados de acordo com o aspecto avaliado.

3.3.2.1 Aspectos Morfofisiológicos

As microcepas de megaestaca apresentaram melhor aspecto morfofisiológico quando cultivadas em meio adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 7A), com decréscimo gradativo nas concentrações de 60 e 0 g L⁻¹, respectivamente. Por outro lado, nas microcepas oriundas de anelamento da base do tronco as respostas foram superiores quando subcultivadas nas concentrações de 30 e 60 g L⁻¹ de sacarose.

Os aspectos morfofisiológicos das microcepas de megaestaca não foram alterados em decorrência da variação do pH (Figura 7B). No entanto, houve redução do vigor das microcepas provenientes de anelamento quando subcultivadas no pH 6,8.

Figura 7 - Valores médios do aspecto morfológico de vigor das microcepas de *E. benthamii* provenientes de anelamento do tronco e megaestaca da copa, multiplicadas in vitro em diferentes combinações de sacarose (A) e de pH (B), nos primeiro e segundo subcultivo (C e D). Letras minúsculas iguais para duas diferentes procedências de material vegetativo ou subcultivos dentro de uma mesma concentração de sacarose e valor de pH e letras maiúsculas iguais para diferentes concentrações de sacarose suplementadas ao meio de cultura valores de pH dentro de uma mesma procedência de material vegetativo ou mesmo subcultivo não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Outro aspecto importante é o fato de que a exposição das microcepas aos diferentes tratamentos ao longo do tempo foram prejudiciais, ocasionando redução em seu vigor, de tal maneira que no geral as microcepas apresentaram melhores aspectos morfofisiológicos no primeiro subcultivo em comparação ao segundo (Figuras 7C - D). Com relação à concentração de sacarose, os aspectos morfofisiológicos não difeririam em ambos os subcultivo, com exceção dos tratamentos sem sacarose, nos quais ocorreu uma brusca redução desse parâmetro no segundo subcultivo, ocasionado pela morte da maioria das microcepas.

No caso do pH o mesmo foi observado, ou seja, no primeiro subcultivo os aspectos morfofisiológicos das microcepas de ambas as origens foram superiores, independentemente do pH. Em contrapartida no segundo subcultivo houve redução no vigor, das microcepas subcultivadas em pH 6,8.

A interação entre o pH e as diferentes concentrações de sacarose resultaram em maiores valores de vigor quando as microcepas foram subcultivadas em meio de cultura suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e com pH 4,8 (Figura 8). Para os tratamentos com 0 ou 60 g L⁻¹ de sacarose as respostas foram iguais independentemente do pH. Entretanto, na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, as respostas variaram de acordo com o pH, decrescendo o vigor das microcepas com o aumento do valor de pH do meio de cultura.

Figura 8 - Valores médios do aspecto morfológico de vigor das microcepas de *E. benthamii* multiplicadas in vitro em diferentes combinações de sacarose e de pH. Letras minúsculas iguais para as três diferentes concentrações de sacarose dentro de um mesmo valor de pH e letras maiúsculas iguais para diferentes valores de pH dentro de uma mesma concentração de sacarose não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

As figuras 9 e 10 confirmam os resultados estatísticos e ilustram de maneira clara os aspectos morfofisiológicos das microcepas de ambas as origens submetidas aos diferentes tratamentos no primeiro e segundo subcultivos.

Figura 9 - Aspectos morfofisiológicos de vigor das microcepas de megaestaca, subcultivadas em três concentrações de sacarose, associadas a três valores de pH em dois subcultivos sucessivos. Barra: 0,5cm

Figura 10 - Aspectos morfofisiológicos das microcepas de anelamento subcultivadas em três concentrações de sacarose, associadas a três valores de pH em dois subcultivos sucessivos. Barra: 0,5cm

3.3.2.2 Oxidação

A oxidação nos diferentes tratamentos não foi expressiva, havendo diferença somente quando se comparou os subcultivos, sendo que para o primeiro a oxidação ocorreu em todos os tratamentos, enquanto que no segundo não houve oxidação (Figura 11).

Figura 11 - Valores médios de oxidação das microcepas de *E. benthamii* nos dois subcultivos realizados na fase de multiplicação *in vitro*. Letras minúsculas iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

3.3.2.3 Massa Seca

Em relação à massa seca das microcepas de *E. benthamii* observou-se comportamento diferenciado quanto à concentração de sacarose e a variação de pH (Figura 12). O menor incremento foi constatado no meio de cultura sem adição de sacarose independentemente do pH. Houve variação nos resultados quando a sacarose foi adicionada, sendo encontrado o maior ganho de massa seca em meio de cultura suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose nos pHs 4,8 e 6,8, obtendo-se valores entre 178 e 191 mg.

Figura 12 - Valores médios de massa seca das microcepas de *E. benthamii* avaliadas em função da concentração de sacarose e do valor de pH do meio de cultura. Letras minúsculas iguais para as três diferentes concentrações de sacarose dentro de um mesmo valor de pH e letras maiúsculas iguais para diferentes valores de pH dentro de uma mesma concentração de sacarose não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

3.3.2.4 Análise Histoquímica

Assim como nos aspectos morfofisiológicos o acúmulo de componentes do metabolismo celular verificado por meio de análises histoquímicas, mostra um padrão de reações diretamente ligado à variação da concentração de sacarose no meio de cultivo, de tal modo que ao variar-se os valores de pH não se observou mudanças drásticas nestes padrões.

Dessa forma, tanto para as microcepas de megaestaca, quanto para as de anelamento, ocorreu intensificação gradual nas reações para polissacarídeos e compostos fenólicos, com o aumento na concentração de sacarose no meio de cultura, independentemente do pH, bem como a diminuição na intensidade de resposta das proteínas, ou seja, as reações foram mais intensas na ausência de sacarose (Tabela 1).

Para as amostras cultivadas em meio de cultivo sem sacarose, independentemente do pH e do método de resgate do material vegetativo do campo (megaestaca da base da copa ou anelamento da base do tronco) não houve reações para compostos fenólicos e polissacarídeos. Para as proteínas (setas azuis), no entanto, a reação variou de moderadamente presente (microcepas de megaestaca, no pH 4,8 e 5,8, bem como as de anelamento no pH 4,8) a intensamente presente (para microcepas de megaestaca em pH 6,8 e as de anelamento em pH 5,8 e 6,8).

Ressalta-se, ainda, do ponto de vista anatômico que as microcepas de anelamento cultivadas em meio sem sacarose no pH 5,8, apresentaram hipertrofia das células do mesofilo, sem delimitação correta dos parênquimas paliçádico e lacunoso (Figura 13).

Tabela 1 – Resultados dos testes histoquímicos para polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos de folhas de microcepas de *E. benthamii* provenientes de duas diferentes origens e subcultivadas na fase de multiplicação *in vitro* em diferentes valores de pH do meio de cultura e concentrações de sacarose

ORIGEM	TRATAMENTOS		P OLISSACARÍDEOS	PROTEÍNAS	COMPOSTOS FENÓLICOS
	pH	Sacarose (g L ⁻¹)			
MEGAESTACA	4,8	0	-	++	-
		30	+	+	++
		60	+	+	+++
	5,8	0	-	++	-
		30	+	+	++
		60	++	+	++
	6,8	0	-	+++	-
		30	++	++	+++
		60	+++	+	+++
ANELAMENTO	4,8	0	-	++	-
		30	+	++	++
		60	+++	+	+++
	5,8	0	-	+++	-
		30	+	++	++
		60	+++	++	++
	6,8	0	-	+++	-
		30	+	++	+
		60	+	++	+

Nota: Os sinais (-) ou (+) representam respectivamente ausência ou presença das substâncias e, quantitativamente, classificados como pouco presente (+), moderadamente presente (++) ou intensamente presente (+++), de acordo com a intensidade das respostas aos testes aplicados.

Ao observar-se as amostras multiplicadas em meio de cultivo contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, obteve-se, para as microcepas de megaestaca em pH 4,8 e 5,8, reações pouco intensas para polissacarídeos (setas rosas) e proteínas e moderadamente intensas para compostos fenólicos (setas amarelas), com padrão distinto de distribuição na célula, sendo os polissacarídeos mais restritos à parede celular de algumas células do feixe vascular, enquanto

que as proteínas e os compostos fenólicos distribuídos no citoplasma de células do mesofilo. No pH 6,8 a intensidade de reação para todos os componentes aumentou.

Ainda na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, mas agora para as microcepas de anelamento observou-se que tanto no pH 4,8 quanto no 5,8 as proteínas e compostos fenólicos apresentaram acúmulo semelhante (intensidade moderada), enquanto que para os polissacarídeos a intensidade de reação foi menor. Já no pH 6,8 houve redução na intensidade de reação dos compostos fenólicos e manutenção dos demais compostos.

Finalmente, na concentração de 60 g L⁻¹ de sacarose, para as amostras de megaestaca no pH 4,8 foi possível verificar que os polissacarídeos e as proteínas foram pouco presentes, enquanto que os compostos fenólicos intensamente presentes. No pH 5,8, entretanto, observou-se manutenção do acúmulo de proteínas e diminuição dos compostos fenólicos, bem como aumento na intensidade de resposta dos polissacarídeos (moderadamente presentes), a tal ponto que puderam ser verificados não somente próximos à parede celular das células do feixe vascular, como também distribuídos no citoplasma de algumas células do mesofilo (Figura 13, setas rosas). Em pH 6,8, os polissacarídeos assim como os compostos fenólicos aumentaram (intensamente presentes) e as proteínas reduziram (pouco presentes).

Para as microcepas de anelamento, diferentemente das de megaestaca que tiveram aumento crescente na concentração de polissacarídeos à medida que se elevou o valor do pH, ocorreu maior acúmulo de polissacarídeos nos pHs 4,8 e 5,8 (intensamente presentes), com redução drástica no pH 6,8 (pouco presentes). As proteínas, porém, ocorreram de maneira menos intensa no pH 4,8 e se mantiveram moderadamente presentes nos pHs 5,8 e 6,8. Quanto aos compostos fenólicos, verificou-se redução gradual no acúmulo relacionada ao aumento do pH, sendo intensamente presente no pH 4,8, moderadamente presente em pH 5,8 e pouco presente em 6,8.

Figura 13 - Testes Histoquímicos Aplicados às Microcepas de Megaestaca e de Anelamento, evidenciando as diferentes repostas aos acúmulos dos polissacarídeos (setas rosas), proteínas (setas azuis) e compostos fenólicos (setas amarelas), havendo, de maneira geral, um aumento na intensidade de respostas proporcionalmente à concentração de sacarose no meio, para polissacarídeos e compostos fenólicos, e inversamente proporcional para as proteínas. HIPER = células do mesofilo de microcepas de anelamento, no meio sem sacarose e pH 5,8, apresentando hipertrofia. Barra = 50 µm. Abreviaturas: EAb = epiderme abaxial, EAd = epiderme adaxial, Me =mesofilo, FV= Feixe Vascular

3.3.2.5 Manifestação Endofítica

A manifestação endofítica ocorreu aplicando-se os diferentes tratamentos de cultivo nas microcepas de ambas as origens, porém de maneira pouco expressiva. Comparando-se as origens obteve-se uma maior intensidade de manifestação nas microcepas de megaestaca independentemente do tratamento (Figura 14A). Levando-se em consideração os dois subcultivos, verificou-se diminuição na manifestação endofítica do primeiro para o segundo em microcepas de megaestaca, enquanto que para as de anelamento as manifestações mantiveram-se iguais (Figura 14B).

Figura 14 - Valores médios de manifestação endofítica de *E. benthamii* avaliadas em relação à fonte de explante, subcultivo, concentração de sacarose e do valor de pH do meio de cultura. Letras minúsculas iguais para duas diferentes fontes de material vegetativo ou subcultivos dentro de uma mesma concentração de sacarose e valor de pH e letras maiúsculas iguais para diferentes concentrações de sacarose suplementadas ao meio de cultura valores de pH dentro de uma mesma procedência de material vegetativo ou mesmo subcultivo não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A concentração de sacarose utilizada no meio também induziu de maneira diferencial a manifestação nos diferentes subcultivos, não havendo diferença significativa na ausência de sacarose e redução do primeiro para o segundo subcultivo, independentemente da fonte de explante para as concentrações de 30 e 60 g L⁻¹ de sacarose (Figura 14C).

O pH influenciou a manifestação quando em interação com as diferentes concentrações de sacarose para ambas as fontes de microcepas (Figura 14D), de tal modo que em pH 4,8 a manifestação foi mais intensa na ausência de sacarose e menos intensa na concentração de 30g L^{-1} , já em pH 5,8 a intensidade foi decrescente a medida em que as concentrações de sacarose foram aumentadas no meio. Por fim, no pH 6,8, manifestação foi igual, independentemente da concentração de sacarose.

3.4 Discussão

O meio de cultivo representou um fator importante para a multiplicação *in vitro* de *E. benthamii*, no entanto, dependendo da fonte de explante (megaestaca da base da copa ou anelamento da base do tronco) as respostas foram diferentes. Segundo Souza et al. (2006) o comportamento em razão do tipo e composição do meio de cultura varia não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos de uma mesma espécie e até entre explantes de um mesmo genótipo, por apresentarem demandas específicas. Sendo assim, ao se multiplicar microcepas provenientes de megaestaca o melhor meio de cultura, do ponto de vista de massa seca e oxidação foi o WPM (Figuras 4B, 5 e 6). O meio de cultura WPM é bastante utilizado na promoção da calogênese e da organogênese de espécies lenhosas (GLOCKE et al. 2006; WERNER et al., 2010). Conforme a literatura, dentre os meios de cultura mais utilizados para a micropropagação de *Eucalyptus*, o WPM tem sido o mais apropriado para a multiplicação de gemas adventícias de *E. benthamii* em comparação com os meios de cultura MS ou JADS (ALMEIDA, 2012; BRONDANI et al., 2012; CORREIA et al., 1995; GLOCKE et al., 2006).

Em contraposição, para as microcepas de anelamento o melhor meio de cultura foi o JADS, pois promoveu os melhores resultados de crescimento e multiplicação expressos pelos aspectos morfofisiológicos de vigor e peso de massa seca, além de um baixo índice de oxidação (Figuras 4, 5 e 6). O resultado positivo do meio JADS, possivelmente está correlacionado ao fato deste meio ter sido elaborado de acordo com as exigências nutricionais de *E. grandis*, fazendo com que tenha uma composição mais próxima àquela exigida para a multiplicação *in vitro* de espécies do gênero (ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES, 2006; BRAVO et al., 2008; LIMA; GONÇALVES, 1998; QUISEN, 2007).

O meio MS, ao contrário do que sugere a literatura (BILLARD; LALLANA, 2005; BORGES et al., 2011; BRONDANI et al., 2009; 2011; GLOCKE, et al., 2006; GOMES; CANHOTO, 2003; GRAÇA et al., 2001; NUGENT et al., 2001; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000; WATT et al., 2003), não favoreceu adequadamente a multiplicação

de microcepas de anelamento (alta taxa de oxidação) e de megaestaca de *E. benthamii*. No caso específico de megaestaca induziu uma multiplicação excessiva, o que pode justificar o alto peso de massa seca (Figura 4B), alterando o vigor das microcepas, apresentando redução do crescimento das folhas, comparado aos demais meios de cultura, acompanhada de hiperhidricidade das mesmas (Figura 5, seta branca).

Segundo Debergh, Harbaoui e Lemeur (1981) um dos fatores que podem desencadear a hiperhidricidade é a concentração de sais presentes no meio de cultura. O meio de cultura MS tem sido mencionado na literatura como um possível agente na indução deste fenômeno, devido a sua alta concentração salina (RADMANN et al., 2009), fato este que corrobora os resultados observados nas microcepas provenientes de megaestaca.

O genótipo e o tipo de explante a ser cultivado *in vitro* tem influência direta sobre a hiperhidricidade havendo variações nas respostas, quando do cultivo de uma determinada fonte de explante. Esta característica foi conferida no presente trabalho, no qual não ocorreu hiperhidricidade em microcepas provenientes de anelamento da base do tronco, cultivadas no mesmo meio e sob as mesmas condições. Tsay et al. (2006) observaram que o cultivo de meristemas apicais de *Scrophulariayo shimurae* resultou em maior número de brotos hiperhídricos do que segmentos nodais, nas mesmas condições de cultivo.

A presença de oxidação contribui para a escolha do melhor meio de cultivo e está intimamente relacionada ao genótipo e tipo de explante utilizado (BASSAN et al., 2006). Neste contexto, o meio de cultura WPM não apresentou oxidação para ambas as origens, enquanto que o meio de cultura MS apresentou oxidação intermediária, sendo o JADS o responsável pelo maior índice de promoção desse fenômeno (Figura 6), portanto, o meio de cultura WPM foi o escolhido como ideal ao desenvolvimento e multiplicação de *E. benthamii*. Resultado semelhante ao observado no presente trabalho, foi obtido por Borges et al. (2011), na multiplicação *in vitro* de 21 clones de *E. urophylla* x *E. globulu*, destacando que houve maior tendência de escurecimento e liberação de compostos fenólicos, quando cultivados em JADS, ainda segundo os autores.

Independentemente das respostas específicas de cada fonte de explante, o meio de cultura WPM, mostrou-se mais adequado à condução dos demais experimentos, devido a apresentação de homogeneidade nas respostas de ambas as origens, permitindo, assim, inferências mais próximas do real, ao se modificar outros parâmetros do cultivo, como concentração de sacarose e pH.

Testando-se as diferentes concentrações de sacarose (0, 30 e 60 g L⁻¹) e variações de pH (4,8, 5,8 e 6,8), verificou-se que as microcepas provenientes de megaestaca, novamente,

mostraram-se superiores quanto ao vigor em relação às microcepas de anelamento, independentemente dos tratamentos e número de subcultivos. Uma possível causa para essa diferenciação está relacionada às condições intrínsecas de cada tecido ou órgão selecionado para introdução e cultivo *in vitro*, o que mostra em sua grande maioria a aptidão de uma determinada fonte em relação à outra, sob as mesmas condições e estímulos (GEORGE; DEBERGH, 2008; HARTMANN et al., 2011).

Dessa forma, embora os tecidos da região de anelamento sejam ontogeneticamente mais jovens do que os de megaestacas (ELDRIDGE et al., 1994; GREENWOOD; HUTCHISON, 1993; HARTMANN et al., 2011), a região basal ou tronco (anelamento) está menos suscetível e exposta às alterações ambientais, comparativamente à mesgaestaca, que é constantemente perturbada por diferentes condições climáticas, possuindo, dessa forma, uma ampla gama de respostas adaptativas, garantindo-lhe uma maior sobrevivência e aclimação em diferentes condições de cultivo (SHINOZAKI; DENNIS, 2003; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SEKI, 2003). Esta plasticidade se reflete também no cultivo *in vitro*, por isso a necessidade em se escolher adequadamente o explante que será utilizado na micropropagação.

Além dos aspectos morfofisiológicos de vigor serem diferentes ao se avaliar as duas fontes de explante, eles também variaram ao longo do tempo (maiores valores para o primeiro subcultivo), o que pode servir de indicação para comprovar que os diferentes tratamentos tiveram um efeito cumulativo ao longo dos subcultivos, provavelmente sensibilizando mais as microcepas de ambas as origens.

A concentração de sacarose apresentou implicação direta nos aspectos morfofisiológicos e também no desenvolvimento das microcepas de ambas as origens. No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos, e a sacarose tem sido a mais utilizada na cultura de tecidos vegetais (NICOLOSO et al., 2003; PARVEEN; SHAHZAD, 2014). Sendo assim, quando adicionada ao meio de cultivo, a sacarose apresenta efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos (SKREBSKY; NICOLOSO; FERRÃO, 2004). Além disso, age como fonte de energia para sustentar o metabolismo fotomixotrófico, garantindo o desenvolvimento ideal, como precursor de carbono e metabólito de sinalização, bem como atua na manutenção do potencial osmótico, garantindo a conservação da água nas células (GAGO et al., 2014; MULLER et al., 2011; SMEEKENS et al., 2010).

No entanto, nota-se nos resultados que existe uma concentração ideal ao desenvolvimento das microcepas, no caso específico de *E. benthamii* esta concentração foi a

de 30 g L⁻¹ de sacarose, independentemente da origem. Isso pode ser explicado, pois tanto a alta concentração, quanto a baixa concentração prejudicaram o desenvolvimento normal do vegetal *in vitro*, haja vista que na análise histoquímica, houve um nítido aumento no acúmulo proteico sinalizando o estresse ou a morte celular programada. A alta concentração de sacarose restringe a eficiência fotossintética das plantas, reduzindo os níveis de clorofila e enzimas importantes para a fotossíntese (HAZARIKA, 2006). Por outro lado, a ausência de sacarose inibe o desenvolvimento, pois a quantidade de CO₂ presente no frasco é insuficiente para que a planta exerça plenamente seu autotrofismo (JO et al, 2009).

O pH, no entanto, não foi responsável por promover alterações significativas nos aspectos morfofisiológicos das microcepas, tanto de megaestaca, quanto de anelamento, uma vez que os valores de vigor ficaram em torno de 2,5, havendo diferença, somente, no pH 6,8 para amostras oriundas de anelamento (Figura 7B). A mudança de pH do meio de cultura pode influenciar a absorção de outros componentes como sais, vitaminas e reguladores de crescimento, interferir nas reações bioquímicas, principalmente, pela ativação ou desnaturação enzimática e, assim, afetar desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (KUBEŠ et al., 2014; PARVEEN; SHAHZAD, 2014; PULLMAN; JOHNSON, 2009).

Contudo, apesar de existir uma convergência a respeito do pH 5,8 como ideal, podem ocorrer variações na adequação de seus valores de acordo com as diferentes fases da morfogênese, como no estabelecimento da cultura, na proliferação de ramos e na indução de raízes (OSTROLUCKÁ et al, 2004; PARVEEN; SHAHZAD, 2014).

Cabe salientar que as interações entre os diferentes fatores, foram significativas e intensificam o que já foi discutido até o momento, com os melhores resultados para: a megaestaca, se destacando como a melhor fonte de explante para *E. benthamii*, com as microcepas sendo subcultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e pH ajustado para 5,8. Adicionalmente as figuras 9 e 10 comprovam e ilustram de maneira eficiente como os aspectos morfofisiológicos foram avaliados, bem como evidenciam as diferenças nas respostas das microcepas quando cultivadas nos meios com diferentes concentrações de sacarose, obedecendo a um padrão independente do pH, para ambas as origens.

É possível notar, também, como uma característica não quantificada, mas que interferiu na avaliação dos aspectos morfofisiológicos, a ocorrência de um avermelhamento das folhas das microcepas de ambas as origens quando cultivadas em meio de cultura com 60 g L⁻¹ de sacarose. Esse fenômeno é usualmente observado e associado ao excesso de produção de antocianinas pelas plantas, que está intimamente relacionado à concentração de sacarose no

sistema (DAI et al., 2014). Tal fato pode justificar a razão pela qual tenha ocorrido nas microcepas de ambas as origens, somente na maior concentração de sacarose (Figuras 9 e 10).

Os resultados demonstraram que não houve promoção significativa da oxidação nos tratamentos com diferentes concentrações de sacarose e valores de pH, diferentemente do que ocorreu no experimento em que se testou os meios de cultivo na multiplicação. Ressalta-se que houve diferença, apenas, quando os subcultivos foram comparados, ocorrendo oxidação mais proeminente no primeiro subcultivo do que no segundo (Figura 11). Sendo um processo intimamente influenciado por danos mecânicos e químicos na microplanta (BASSAN et al., 2006), é razoável que a maior severidade de oxidação ocorra no primeiro subcultivo, por razão da mudança brusca das condições do meio (sacarose e pH) a que as microcepas vinham sendo cultivadas. Posteriormente ao impacto do primeiro subcultivo, no segundo pode ocorrer habituação da microcepa, diminuindo assim a resposta oxidativa.

As diferenças para a massa seca das microcepas foram encontradas apenas para as diferentes concentrações de sacarose e variação dos valores de pH (Figura 12). A origem do material e o número de subcultivos, porém, não influenciaram nesse parâmetro. Dessa maneira, por mais que haja diferenças intrínsecas entre as origens, observa-se uma aptidão semelhante no ganho de massa das microcepas. Destaca-se, no entanto, que a massa seca, não é a única responsável por permitir a escolha de um determinado protocolo em detrimento de outro. Por essa razão os outros aspectos foram avaliados, sendo assim, por mais que as massas não tenham sido diferentes, ocorreram outras diferenças que determinaram não somente o protocolo, como também a fonte de explante de *E. benthamii*, a comentar o vigor, nos quais as microcepas provenientes de megaestaca se sobressaíram.

De maneira geral, observou-se que para as maiores concentrações de sacarose ocorreram os maiores incrementos de massa seca, contrariamente ao verificado com o pH, no qual os maiores valores foram atribuídos aos menores pHs (Figura 12). Embora tenha-se notado que para pH essa diferença foi quase mínima (114 a 103 mg, nos pHs 4,8 e 5,8, respectivamente). Esse resultado, pode servir de indicativo para comprovar, que nessa fase do desenvolvimento das microcepas (multiplicação) o pH não teve atuação preponderante, ou expressiva (por mais que sua importância já tenha sido esclarecida anteriormente). Por sua vez, a sacarose teve influência significativa na multiplicação das microcepas, na qual ocorreram variações nas massas da ordem de 100 mg (32 a 177 mg, para as concentrações de 0 e 60 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente). Esse resultado fica mais claro quando se observa que a escala de variação mais intensa está representada pelas concentrações de sacarose que se distribuem semelhantemente ao longo das variações do pH (Figura 12).

As avaliações histoquímicas permitiram um entendimento de como os diferentes tratamentos, a que as microcepas foram submetidas, atuam, modificando em certo grau seu metabolismo (Figura 13). De maneira geral, a presença de polissacarídeos aumentou gradualmente à medida que a concentração de sacarose foi maior, independentemente da origem do explante (Figura 13, setas rosa). Cabe salientar, que grande parte dos polissacarídeos observados, está representada pelo amido, isso pode ser explicado, pelo fato de que o excedente de sacarose, que não foi utilizado nos processos metabólicos essenciais, é normalmente convertido em amido. Estudos mostram que o excesso de fornecimento de sacarose no cultivo *in vitro*, pode acarretar na produção maciça de amido (CAPELLADES; LEMEUR; DEBERGH, 1991; GRANER, 2013). No caso específico de *E. benthamii* os altos índices de polissacarídeos podem ser atribuídos não somente ao amido, mas também aos polissacarídeos de cadeias mais curtas (solúveis). Pois, uma das características que confere a espécie a resistência a geadas é o fato de acumular em seu protoplasma, dentre outros compostos, carboidratos solúveis (FLORIANI et al., 2013).

Nas condições de cultivo *in vitro*, com a suplementação ao meio de cultura com 30 g L⁻¹ de sacarose, a síntese de polissacarídeos foi menos evidente, com restrição às regiões dos feixes vasculares. Já na ausência de sacarose não se observou nenhum acúmulo de polissacarídeos, nem na forma de amido, provavelmente, devido à morte das microcepas, indicando o forte heterotrofismo das plantas micropropagadas. Adicionalmente, durante o processo de senescência, o amido e açúcares simples são consumidos, devido à grande demanda energética do processo de morte celular (ELMORE, 2007; GRANER, 2013).

A avaliação individual das microcepas demonstrou que o comportamento acima descrito é verdadeiro, mas há uma flutuação em relação ao pH de maneira diferenciada para uma ou outra fonte. No pH 4,8 não houve aumento nas reações de polissacarídeos quando se elevou a concentração de sacarose de 30 para o 60 g L⁻¹ para as microcepas de megaestaca. Resultado esse diferente do observado para os pHs 5,8 e 6,8, nos quais os acúmulos, e consequentemente as reações, de polissacarídeos foram maiores e mais intensas a medida em que a concentração de sacarose aumentou. Em contraste, as microcepas de anelamento apresentaram aumentos graduais, com incremento de sacarose no meio, nos pHs 4,8 e 5,8 e sem diferença no pH 6,8 (Tabela 1). Os resultados demonstraram que mesmo o pH não tendo sido responsável por respostas macroscópicas significativas (aspectos morfofisiológicos), a sua alteração foi responsável por promover respostas distintas no acúmulo de polissacarídeos dependendo da origem do explante.

Sabendo-se que o pH desempenha importante função na manutenção das reações bioquímicas, principalmente as que envolve enzimas (KUBEŠ et al., 2014; PARVEEN; SHAHZAD, 2014; PULLMAN; JOHNSON, 2009), e que tais condições são moduladas por características intrínsecas ao material vegetal, estágio fisiológico, fase do desenvolvimento *in vitro* e estado nutricional (OSTROLUCKÁ et al, 2004; PARVEEN; SHAHZAD, 2014), considera-se que estas diferenças sejam aceitáveis, inferindo-se, ainda, que as condições ideais metabólicas requeridas para uma fonte de explante não são iguais as da outra.

Os compostos fenólicos, assim como os polissacarídeos, tiveram aumento gradual e proporcional à quantidade crescente de sacarose no meio de cultivo para ambas as origens, demonstrando uma intensa atividade metabólica, muito provavelmente, pela atividade de rotas alternativas para a destinação correta da sacarose excedente. Segundo Piotto (2013) alguns compostos fenólicos são amplamente utilizados como sinalizadores de estresses e alta taxa metabólica. Dessa forma, a ausência de sacarose no meio de cultura pode indicar reduzida atividade metabólica, e sua alta concentração no meio de cultura (Tabela 1 e Figura 13, setas amarelas) uma elevada atividade (del RÍO et al., 2006; ESPOSITO-POLESI; ALMEIDA; ALMEIDA, 2013).

As proteínas, no entanto, tiveram comportamento de acúmulo diferenciado com relação aos demais compostos, havendo uma tendência de diminuição com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo (Tabela 1). Sendo assim, nos tratamentos sem sacarose observou-se maior concentração de proteínas, que reduziram à medida que a sacarose do meio aumentou (Tabela 1 e Figura 13, setas azuis). A presença de proteínas nas células das folhas de microcepas de ambas as origens, cultivadas em meio sem sacarose, pode ser um indicativo de estresse ou até mesmo de morte celular, ocorrida neste tratamento. Uma vez que, segundo alguns estudos, nesse momento ocorre a atuação de inúmeras enzimas e complexos proteicos com a função de degradar estruturas e organelas, além de cessar o ciclo celular. Existem pelo menos 6 proteínas com atividade de caspases em vegetais, que mediam eventos envolvidos na morte celular programada (GRANER, 2013; PALAVAN-UNSAL; ARISAN, 2011). A atuação dessas proteínas e enzimas, durante o processo de senescência das células, podem favorecer o incremento de proteínas detectado nos testes histoquímicos.

A manifestação endofítica, foi outro parâmetro avaliado no processo de multiplicação *in vitro* de *E. benthamii*. Tal aspecto, não é levado em consideração nesses estudos, muito provavelmente, por temer se tratar de contaminações ou falhas durante o processo de subcultivo, levando, rapidamente, ao descarte do material. No entanto, o que se observa cada vez mais é que muitos desses microrganismos não representam um perigo iminente ao cultivo

in vitro e podem ser microrganismos endofíticos latentes que cresceram no meio de cultivo em resposta a algum estresse ou desequilíbrio físico e/ou químico (ESPOSITO-POLESI, 2011). Dessa forma, a atribuição do conceito de “contaminação” a toda manifestação microbiana evidente nos meios de cultura é arbitrária, pois se deve ponderar que existe em todas as espécies vegetais uma microbiota bacteriana endofítica, conferida em diversos trabalhos com microplantas consideradas axênicas (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2009; DIAS et al., 2009; THOMAS, 2004; THOMAS; KUMARI, 2010). A distinção entre “contaminação” e “manifestação” microbiana é fundamental para se evitar descartes desnecessários de matrizes com alto valor genético e comercial.

No cultivo utilizando diferentes meios (WPM, MS e JADS) não se verificou manifestação endofítica. Já nos tratamentos (Figura 14), utilizando diferentes concentrações de sacarose em combinação com valores distintos de pH, ocorreu manifestação endofítica, porém, de maneira insuficiente para indicar um ou outro tratamento como indutor de manifestação, uma vez que as notas de intensidade de presença foram medidas de 1 a 4, obtendo-se médias abaixo de 1 para todos os tratamentos, independentemente da fonte de explante.

Esse resultado comprova que as alterações de cultivo a que as microcepas de *E. benthamii* foram expostas, não foram suficientes para gerar respostas de manifestação, muito provavelmente o tempo de exposição a essa nova e diversificada oferta nutricional, ou de carboidratos ou iônica, não tenha surtido efeito na comunidade endofítica ao ponto de induzir a sua manifestação efetiva nos meios. Porém, observa-se que o tempo foi adequado para gerar alterações morfofisiológicas. Isso pode levar a suposição de que as alterações na morfofisiologia da planta podem modular as interações e equilíbrios na microbiota endofítica, determinando a manifestação ou não dessas bactérias. Dessa maneira, possivelmente, seguir-se-á uma ordem de mudanças: o microclima (alterações no meio, açúcar, pH, luz, temperatura) *in vitro* é alterado, ele por conseguinte altera as características morfofisiológicas da planta e por fim essas mudanças no ambiente interno da planta e dos tecidos modulam a dinâmica populacional endofítica.

Segundo, Thomas e Kumari (2010) a manifestação repentina dos endófitos no meio de cultura pode ser explicada, principalmente, por flutuações ambientais durante o cultivo *in vitro*. No entanto, acredita-se que tal manifestação possa ser modulada, mais precisamente, por fatores intrínsecos à planta, como genótipo, cultivar, idade da planta, estágio de crescimento, status fisiológico (ANDREOTE et al., 2010; ARDANOV et al., 2012; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; DAVITT; CHEN; RUDGERS, 2011;

GAGNE-BOURGUE et al., 2013; HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008; ISLAM et al., 2010).

Outro aspecto importante é o quão adaptado evolutivamente esse microrganismo está à planta, ou seja, se participam de um processo coevolutivo, no qual, independentemente, das espécies e recursos disponíveis o endófito se restringe a um seleto grupo de hospedeiros, ou a uma única espécie, ou a um único indivíduo e até mesmo a certos órgãos de um mesmo indivíduo (COOK et al., 2009, 2012; MORICCA; GINETTI; RAGAZZI, 2012; NISSINEN; MÄNNISTÖ; ELSAS, 2012; SUKUMAR et al., 2013). De tal modo que na escolha e coleta de um determinado explante, “escolhe-se” inevitavelmente uma microbiota endofítica que poderá estar mais propensa a se manifestar, dependendo do grau de intimidade que cada microrganismo estabelece com seu hospedeiro ou partes dele, tornando-se obrigatórios e, conseqüentemente, mais íntimos e menos propensos a existirem na ausência do seu hospedeiro (não se manifestam) ou ainda, facultativos menos dependentes do hospedeiro (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008), com maiores chances de crescerem no meio de cultivo na ocorrência de alterações microambientais desfavoráveis.

3.5 Conclusão

Em resumo, as características específicas de cada região selecionada como fonte de explante (megaestaca da base da copa e anelamento da base do tronco) permitiu uma gama de respostas às variações ambientais (meio de cultivo, concentração de sacarose e pH). De tal maneira que as microcepas de megaestaca mostraram-se superiores aos diferentes tratamentos aplicados. Adicionalmente, a manifestação endofítica, mesmo sendo pouco expressiva e intensa, pode sinalizar algum desequilíbrio no desenvolvimento normal das microcepas de *E. benthamii* provocado em maior ou menor escala quando os tratamentos foram aplicados. Podendo, ainda, ser o momento para tomada de decisões, antes que essa manifestação se torne prejudicial à cultura.

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, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.

- AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; SHARMA, J.; REDDY, M.S. Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm, **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 521-529, 2012.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, A.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442p.
- ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 10, p. 1757-1764, 2009.
- ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação in vitro de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K. D. Hill & L.A.S. Johnson**. 2012. 106p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V.; GRANER, E.M.; BRONDANI, G.E.; DE ABREU-TARAZI, M.F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 31, n. 8, p.1495-1515, 2012.
- ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.
- ANDREOTE, F D.; ROCHA, U.N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; OVERBEEK, L.S. van. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 97, n. 4, p. 389-399, 2010.
- ARDANOV, P.; SESSITSCH, A.; HAGGMAN, H.; KOZYROVSKA, N.; PIRTILÄ, A.M. *Methylobacterium*-induced Endophyte Community Changes Correspond with Protection of Plants against Pathogen Attack. **Plos One**, Alabama, v. 7, n. 10, p. 1-8 (e46802), 2012.
- BACCARIN, F.J.B. **Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**. 2012. 78p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- BASSAN, J.S.; REINIGER, L.R.S.; ROCHA, B.H.G.; SEVERO, C.R.P.; FLORES, A.V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento in vitro de canafístula (*Peltophorumdubium* (Spreng.) Taub.). **CiênciaFlorestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BILLARD, C.E.; LALLANA, V.H. Multiplicación in vitro de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, Entre Ríos, v.16, n.30, p.199-216, 2005.
- BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.D.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C. Multiplicação in vitro de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 173-182, 2011.

BRAVO, C.D.V.; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; VENCovsky, R. Controle genético da regeneração in vitro em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2181-2185, 2008.

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

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Establishment, multiplication and elongation in vitro of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage×*Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A.; ARAUJO, M.A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii*×*Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.

BROOKER, M.I.H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, Melbourne, v. 13, n. 1, p. 79-148, 2000.

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-CNPq, 1998. 1 v. p. 87-132.

CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 21-26, 1991.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.

COOK, D.; GARDNER, D.R.; RALPHS, M.H.; PFISTER, J.A.; WELCH, K.D.; GREEN, B. T. Swainsonine concentrations and endophyte amounts of *Undifilum oxytropis* in different plant parts of *Oxytropis sericea*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 10, p. 1272-1278, 2009.

COOK, D.; SHI, L.; GARDNER, D.R.; PFISTER, J.A.; GRUM, D.; WELCH, K.D.; RALPHS, M.H. Influence of Phenological Stage on Swainsonine and Endophyte Concentrations in *Oxytropis sericea*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 38, n. 2, p. 195-203, 2012.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis*×*Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 48, n. 49, p. 107-116, 1995.

DAI, Z. W.; MEDDAR, M.; RENAUD, C.; MERLIN, I.; HILBERT, G.; DELROT, S.; GOMÈS, E. Long-term in vitro culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n.16, p. 4665-4677, 2014.

DAVITT, A.J.; CHEN, C.; RUDGERS, J.A. Understanding context-dependency in plant–microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, n. 2, p. 137-145, 2011.

DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEUR, R. Masspropagation of globe artichoke (*Cynarascolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 53, p. 181-187, 1981.

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

DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; TEIXEIRA, M.A.; ASSUMPÇÃO, L.C.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.

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

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; WYK, G van. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. 312p.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, Lawrence, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

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

ESPOSITO-POLESI, N.P.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Avaliação histoquímica de espécies de microplantas hospedeiras de endófitos. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 19, n. 2, p. 61-71, 2013.

FLORIANI, M.M.P.; STEFFENS, C.A.; CHAVES, D.M.; do AMARANTE, C.V.T.; PIKART, T.G.; RIBEIRO, M.S. Relação entre concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e tolerância ao frio em diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 165-174, 2013.

GAGNE-BOURGUE, F.; ALIFERIS, K.A.; SEGUIN, P.; RANI, M.; SAMSON, R.; JABAJI, S. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 114, n. 3, p. 836-853, 2013.

GAGO, J.; MARTÍNEZ-NÚÑEZ, L.; LANDÍN, M.; FLEXAS, J.; GALLEGU, P. P. Modeling the Effects of Light and Sucrose on In Vitro Propagated Plants: A Multiscale System Analysis Using Artificial Intelligence Technology. **Plos One**, Alabama, v. 9, n. 1, p. 1-9 (e85989), 2014.

GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 29-64.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema*×*Eucalyptus stricklandii* Cv. 'Urrbae Gem'. In **Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 42, n. 2, p. 139-143, 2006.

GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). In **Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 39, n. 3, p.316-321, 2003.

GONZALEZ, R.; TREASURE, T.; WRIGHT, J.; SALONI, D.; PHILLIPS, R.; ABT, R.; JAMEEL, H. Exploring the potential of *Eucalyptus* for energy production in the Southern United States: Financial analysis of delivered biomass. Part I. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 755-766, 2011.

GRAÇA, M.E.C.; KALIL FILHO, A.N.; MEDEIROS, A.C.D.S.; TAVARES, F.R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron na multiplicação in vitro de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 107-112, 2001.

GRANER, E.M. Avaliação histocitológica, histoquímica e morfofisiológica da habituação e senescência em pupunheiras mantidas in vitro. 2013. 197p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

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

GREENWOOD, M.S.; HUTCHISON, K. W. Maturation as a developmental process. In: AHUJA, M.R.; LIBBYW. J. (Ed.). **Clonal forestry: genetics and biotechnology**. Budapest: Springer-Verlag, 1993. p. 14-33.

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

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

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

ISLAM, S.M.A.; MATH, R.K.; KIM, J.M.; YUN, M.G.; CHO, J.J.; KIM, E.J.; LEE, Y.H.; YUN, H.D. Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. **Current Microbiology**, New York, v. 61, n. 4, p. 346-356, 2010.

JO, E.A.; TEWARI, R.K.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, p. 307-315, 2009.

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

KUBEŠ, M.; DRÁŽNÁ, N.; KONRÁDOVÁ, H.; LIPAVSKÁ, H. Robust carbohydrate dynamics based on sucrose resynthesis in developing Norway spruce somatic embryos at variable sugar supply. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 50, n. 1, p. 45-57, 2014.

LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação in vitro de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 13-19, 2006.

LIMA, M.M.; GONÇALVES, A.N. Efeito do Thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 53, p. 49-56, 1998.

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

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

MORICCA, S.; GINETTI, B.; RAGAZZI, A. Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, n. 3, p. 587-598, 2012.

MUJIU, L.; ARNOLD, R.; BOHAI, L.; MINSHENG, Y. Selection of cold-tolerant eucalypts for Hunan Province. In: TURNBULL, J.W. (Ed.). **Eucalyptus in Asia: proceedings of an international conference held in Zhanjiang, Guangdong, people's Republic of China**. Canberra: Elect Printing, 2003. p. 107-116. (ACIAR. Proceedings, 111).

MULLER, B.; PANTIN, F.; GÉNARD, M.; TURC, O.; FREIXES, S. PIQUES, M.; GIBON, Y. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 1715-1729, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

NISSINEN, R.M.; MÄNNISTÖ, M.K.; ELSAS, J.D. Endophytic bacterial communities in three arctic plants from low arctic fell tundra are cold-adapted and host-plant specific. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 82, n. 2, p. 510-522, 2012.

NUGENT, G.; CHANDLER, S.F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T.W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 37, n. 3, p. 388-391, 2001.

OSTROLUCKÁ, M.G.; LIBIAKOVÁ, G.; ONDRUŠKOVÁ, E.; GAJDOŠOVÁ, A. In vitro propagation of *Vaccinium* species. **Acta Universitatis Latviensis, ser. Biology**, Latvia, n. 676, p. 207-212, 2004.

PALAVAN-UNSAL, N.; ARISAN, E.D. Evidences for the presence of caspase-like activities in plants. **Fen Bilimleri Dergisi**, Istanbul, v. 23, n. 2, p. 57-69, 2011.

PARVEEN, S.; SHAHZAD, A. Factors affecting in vitro plant regeneration from cotyledonary node explant of *Senna sophora* (L.) Roxb.—A highly medicinal legume. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 13, n. 3, p. 413-422, 2014.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L.F.; FINOTTI, D.R.; CHAGAS, E.A. Cultivo in vitro de embriões imaturos de tangerina ‘Poncã’: concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 49, n. 282, p. 181-189, 2002.

PIOTTO, K.D.B. **Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento in vitro de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. 2013. 157p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PULLMAN, G.S.; JOHNSON, S. Loblolly pine (*Pinustaeda*) female gametophyteand embryo pH changes during seed development. **Tree Physiology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 829-836, 2009.

QUISEN, R.C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. 2007. 125p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RADMANN, E.B.; BIANCHI, V.J.; SOUZA, T.M.; FACHINELLO, J.C.; OLIVEIRA, R.P. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. ‘GXN-9’. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 95-101, 2009.

ROCKWOOD, D.L.; RUDIE, A.W.; RALPH, S.A.; ZHU, J.Y.; WINANDY, J.E. Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 8, p. 1361-1378, 2008.

SCHUCH, M.W.; DAMIANI, C.R.; SILVA, L.C.; ERIG, A.C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar climax. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008.

SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 511-518, 2000.

SHINOZAKI, K.; DENNIS, E.S. Cell signalling and gene regulation: global analyses of signal transduction and gene expression profiles. **Current Opinion in Plant Biology**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 405-409, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 410-417, 2003.

- SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.
- SILVA, I.M.D.C.D.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B.; BIANCHI, V.J. Resposta diferencial ao uso do Thidiazuron na regeneração in vitro de marmeleiros, cvs. ADAMS E MC. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 3-4, p. 375-382, 2011.
- SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. Sacarosee período de cultivo in vitro na aclimatização ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffiaglomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004.
- SMEEKENS, S.; MA, J. K.; HANSON, J.; ROLLAND, F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. **Current Opinion in Plant Biology**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 274-279; 2010.
- SOUZA, F.V.D.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; COSTA, M. A.P.C. Micropropagação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 38-52.
- SUKUMAR, P.; LEGUE, V.; VAYSSIERES, A.; MARTIN, F.; TUSKAN, G.A.; KALLURI, U.C. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 909-919, 2013.
- SULICHANTINI, E.D.; SUTISNA, M.; SUKARTININGSIH, S.; RUSDIANSYAH, R. Clonal Propagation of Two Clones *Eucalyptus Pellita* F. Muell By Mini-Cutting. **International Journal of Science and Engineering**, Semarang, v. 6, n. 2, p. 112-116, 2014.
- 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, n. 2, p. 173-179, 2004.
- THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, n.1, p. 469-474, 2010.
- TSAY, H.S.; LEE, C.Y.; AGRAWAL, D.C.; BASKER, S. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 42, n. 5, p. 445-449, 2006.
- WATT, M.P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. In vitro field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.
- WERNER, E.T.; MILANEZ, C.R.D.; MENGARDA, L.H.G.; VENDRAME, W.A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botânica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa: Editora UFV, 2009. 272p.

4 COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA ASSOCIADA A DUAS FONTES DE EXPLANTE DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN & CAMAGE

Resumo

A micropropagação tem sido aplicada no resgate e rejuvenescimento de matrizes de essências florestais adultas, mas a necessidade de muitos subcultivos na fase de multiplicação, visando à reversão à juvenilidade, tem trazido a tona questões sobre a microbiota endofítica associada às plantas. Assim, objetivou-se avaliar a comunidade bacteriana endofítica associada ao cultivo *in vitro* prolongado de diferentes fontes de explante e a dinâmica dessas comunidades ao longo dos subcultivos e nas diferentes fases da micropropagação. Para tanto, realizou-se a extração do DNA bacteriano total de minicepas (*in vivo*) provenientes de megaestaca de ramos da base da copa e também do anelamento da base do tronco, oriundas de uma única planta matriz de *Eucalyptus benthamii* com 13 anos de idade, bem como das microcepas geradas no cultivo *in vitro* dessas fontes de explantes. O estabelecimento *in vitro* se deu em duas épocas e a avaliação das comunidades bacterianas endofíticas procedeu-se em amostras *in vivo* e *in vitro*: nos 10º, 13º e 16º subcultivos e também com material alongado e enraizado, por meio de PCR-DGGE baseada na região V6 do gene ribossomal 16S rDNA. Os perfis de bandas mostraram diferenças nas comunidades entre as amostras *in vivo* e *in vitro*, bem como flutuações nas comunidades ao longo dos subcultivos e nas amostras alongadas e enraizadas. Todavia, observou-se a predominância de bandas exclusivas entre as amostras de megaestaca, e o oposto para as de anelamento. Tais resultados podem indicar uma colonização bacteriana endofítica diferencial, havendo predominância de endófitos obrigatórios em anelamento, e oportunistas em megaestaca.

Palavras-chave: Micropropagação; Explantes; Subcultivos Sucessivos; Eucalipto

Abstract

Micropropagation has been applied in the adult tree recovery and rejuvenation, and it has required various subcultures in the multiplication phase, aiming at reversing the juvenility. This strategy has brought questions about the endophytic microbiota associated with plants. Therefore the aimed of this study was to evaluate endophytic bacterial community associated with prolonged *in vitro* culture of two explants sources and the bacterial community dynamic along the subcultures in different micropropagation stages. In this context, the bacterial DNA was extracted from samples of the mini-stumps (*in vivo*) from mega-cuttings of the treetop base and girdling of the trunk base and in micro-stumps produced by *in vitro* culture from these explants sources, both originated from one single matrix plant of *Eucalyptus benthamii* with 13 years old. *In vitro* establishment occurred in two dates and the evaluation of endophytic bacterial communities was made *in vivo* and *in vitro* samples (on 10º, 13º and 16º subcultures), with elongated shoots and rooted. Analysis was performed by PCR-DGGE based on the V6 region of ribosomal gene 16S rDNA. Bands profiles showed differences in communities between *in vivo* and *in vitro* samples, and communities fluctuations along the subcultures and elongated and rooted samples. However, there was a predominance of exclusive bands to the detriment of shared bands between the samples of mega-cuttings and the opposite for girdling. These results may indicate a differential colonization of the endophytic bacterial according to the explants sources, with predominance of obligate endophytes in girdling samples and opportunistic in mega-cuttings samples.

Keywords: Micropropagation; Explants; Successive Subcultures; Eucalyptus

4.1 Introdução

O uso da cultura de tecidos como uma técnica eficiente para o rejuvenescimento de plantas adultas é conhecido, especialmente para espécies do gênero *Eucalyptus* (BACCARIN, 2012; BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). No entanto, para que a reversão à juvenilidade seja completa e as respostas morfogênicas sejam reestabelecidas, é necessário um número maior de sucessivos subcultivos na fase de multiplicação, cerca de 10 (ALFENAS et al., 2004; BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). No entanto, este procedimento, tem ocasionado no meio de cultivo, a manifestação de microrganismos endofíticos latentes, que se desenvolvem em resposta ao estresse ocasionado pelo tempo excessivo de multiplicação do material vegetal, ou ainda devido às variações microambientais (THOMAS, 2004; THOMAS; KUMARY, 2010). O que levanta questões sobre como os microrganismos endofíticos são afetados durante todo o processo de micropropagação, desde a escolha do explante, passando pela introdução do material in vitro, multiplicação até o alongamento, enraizamento e aclimatização.

Estudos têm mostrado que as plantas abrigam uma vasta gama de microrganismos, que formam uma comunidade biológica complexa (MENGONI; SCHAT; VANGRONSVELD, 2010; PINI et al., 2012; RYAN et al., 2008). Dependendo da região colonizada da planta, essa comunidade microbiana pode ser classificada como epifítica (habitam a superfícies de folhas ou hastes) ou endofítica (microrganismos que em alguma etapa de seu desenvolvimento colonizam a endosfera, ou interior dos tecidos vegetais) (IKEDA et al., 2010; PINI et al., 2012).

Independentemente das condições de cultivo aplicada e das características do vegetal, pelo menos parte dessa microbiota pode colonizar o seu interior (AZEVEDO et al., 2000; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004). Neste mesmo contexto, no cultivo in vitro, diferentes espécies de plantas micropropagadas possuem uma microbiota específica, a qual de certa forma, pode favorecer o processo de cultivo (ABREU-TARAZI et al. 2010; ALMEIDA et al. 2005, 2009; DIAS et al. 2009; ESPOSITO-POLESI, 2011; POLESI, 2010; THOMAS et al. 2008, 2007).

Segundo Pirttilä et al. (2008), o genótipo da planta e a composição de espécies endofíticas, aliados às condições de cultivo in vitro, representam um fator chave para a obtenção de culturas com alta capacidade de regeneração. Muitos estudos sugerem que os endófitos auxiliam a microplanta no ajuste osmótico, no desenvolvimento produzindo

fitormônios, na absorção de nutrientes e na proteção contra ação de patógenos, além de favorecer o crescimento e sobrevivência das microplantas na fase de aclimatização e na rapidez da produção de biomassa (ABREU-TARAZI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2005, 2009; DIAS et al., 2009; THOMAS; SOLY, 2009). Adicionalmente, alguns endófitos podem aumentar a tolerância ao estresse resultante dos subcultivos (LATA et al., 2006).

Um ponto importante que deve ser considerado, além das implicações dos endófitos no cultivo in vitro, são as consequências deste tipo de cultivo nas comunidades endofíticas. Isto significa que o processo de micropropagação, ao envolver condições ambientais tão restritas, passa a ser o responsável por alterações significativas na comunidade bacteriana associada ao vegetal, criando um ambiente exclusivo, de modo a selecionar grupos bacterianos benéficos ou neutros, mais ou menos adaptados ao ambiente in vitro (FANG; HSU, 2012; QUAMBUSCH et al., 2014).

Outro aspecto que pode causar variações na estrutura da comunidade endofítica associada à planta micropropagada é a escolha quanto ao tipo de explante a ser introduzido. Além da capacidade de estabelecimento e multiplicação in vitro (BORGES et al., 2011; HARTMANN et al., 2011; SILVA et al., 2011), o explante selecionado apresenta uma comunidade endofítica que varia em decorrência do local (ou órgão) de onde foi retirado, devido, principalmente, à diferenciação na oferta nutricional, tipo de tecido, arranjo celular e composição química, selecionando algumas espécies que sobrevivem melhor nesse tipo específico de substrato (HUANG et al., 2008; IZUMI et al., 2008; GONG; GUO, 2009).

Neste contexto o presente estudo objetivou avaliar a variação na comunidade bacteriana endofítica associada ao cultivo in vitro prolongado de diferentes fontes de explante de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage, bem como a dinâmica dessas comunidades ao longo dos subcultivos e das diferentes fases de desenvolvimento (estabelecimento, multiplicação e alongamento).

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material vegetal

Segmentos nodais de minicepas cultivadas sob condições de casa de vegetação (umidade relativa do ar >80%, temperatura entre 26 a 30 °C, crescendo em vasos com areia lavada) foram utilizados como fontes de explantes. Essas minicepas, estabelecidas em minijardim clonal por Baccarin (2012), foram obtidas a partir de brotos ou brotações epicórmicas de duas regiões distintas (megaestaca da base da copa e de anelamento da base do

tronco), provenientes de uma única matriz selecionada de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage com 13 anos de idade.

4.2.2 Estabelecimento in vitro

O estabelecimento in vitro do material ocorreu em duas datas: 20/12/2011 e 20/02/2012. Na primeira data o objetivo, foi avaliar os perfis de bandas das comunidades bacterianas endofíticas ao longo dos subcultivos, a partir do qual se recomenda para o rejuvenescimento de espécies do gênero (ou seja, acima de 10 subcultivos), bem como avaliar possíveis alterações nesses perfis, quando o material multiplicado é destinado à fase de alongamento in vitro. Já na segunda data, o objetivo, foi avaliar possíveis alterações nos perfis de bandas das comunidades bacterianas endofíticas ao retirar o material da condição de casa de vegetação e introduzi-lo no cultivo in vitro, e ao longo dos subcultivos sucessivos.

Cabe ressaltar que para ambas as datas o protocolo de estabelecimento e as condições de cultivo foram os mesmos. Dessa maneira, antes da coleta, para reduzir a incidência de contaminações na fase de introdução, fez-se a aplicação do fungicida Orthocide 500[®] (Captan 50% como princípio ativo) a 2,4 g L⁻¹.

Após a coleta, os explantes foram imersos em água deionizada e transportados ao laboratório de cultura de tecidos vegetais, no qual, foram lavados em água corrente durante vinte e cinco minutos com duas gotas de Tween 20 e logo após procedeu-se a lavagem em água deionizada autoclavada. Em seguida, os explantes foram colocados em solução de fungicida contendo 2,4 g L⁻¹ de Orthocide[®], por 15 minutos, e posteriormente lavados três vezes com água deionizada autoclavada. Posteriormente, os explantes foram imersos em solução de NaOCl 1% (v/v) Brilhante[®] por 5 minutos, adicionados de três gotas Tween 20. Ao final desse período os mesmos foram conduzidos à câmara de fluxo laminar para proceder a tríplice lavagem com água deionizada autoclavada.

Após assepsia, os explantes de *E. benthamii* provenientes de brotações de minicepas de megaestaca da base da copa e de anelamento da base do tronco foram introduzidos in vitro utilizando-se meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilamino purina), sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (4,5 g L⁻¹). O meio de cultura foi preparado com água deionizada, pH ajustado para 5,8 (± 1) com HCl (1M) e NaOH (1M), e autoclavado por 20 minutos a 121°C.

Os explantes foram cultivados por 40 dias em sala de crescimento com condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (16 horas) e luminosidade ($42 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes, branca fria.

4.2.3 Multiplicação in vitro

Para ambas as datas de introdução in vitro (20/12/2011 e 20/02/2012) o protocolo de multiplicação e as condições de cultivo foram os mesmos.

As brotações originadas na fase de estabelecimento in vitro foram isoladas e transferidas, sob condições assépticas, para frascos de vidro transparente ($\varnothing = 5,0$ cm e 8,0 cm de altura) contendo no meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6-benzil amino purina), $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ANA (ácido 1-naftalenoacético), 30 g L^{-1} de sacarose e $4,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar. A cada 20 dias, procederam-se os subcultivos das microcepas (conjunto de cerca de 10 brotações axilares) para novo meio de cultura de igual composição.

4.2.4 Alongamento e enraizamento in vitro

Como mencionado anteriormente, parte do material que foi introduzido em 20/12/2011 e multiplicado por 16 subcultivos sucessivos, com intervalos de 20 dias, foi destinado à fase de alongamento e enraizamento in vitro. Para tanto, as microcepas de *E. benthamii* de cada fonte (megaestaca da base da copa e anelamento da base do tronco), foram transferidas, sob condições assépticas, para frascos de vidro transparente ($\varnothing = 5,0$ cm e 8,0 cm de altura) contendo 30 mL de meio de cultura WPM com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (ácido 3-indol butírico), 30 g L^{-1} de açúcar e 4,5 g de ágar.

A figura 1 ilustra a metodologia utilizada no presente trabalho.

Figura 1 - Metodologia aplicada ao trabalho. Detalhamento do tipo de material utilizado (segmentos nodais de minicepas de *E. benthamii*, estabelecidas por Baccarin (2012), cultivadas em condição de casa de vegetação, provenientes de megaestaca da base da copa e anelamento da base do tronco), bem como as fases de cultivo in vitro em que o material foi submetido (introdução, multiplicação, alongamento e enraizamento in vitro). As caixas com linhas tracejadas indicam os pontos em que as amostras foram coletadas, para a extração do DNA bacteriano total (três repetições para cada amostra)

4.2.5 Avaliação da Comunidade Bacteriana Endofítica

As comunidades bacterianas endofíticas foram avaliadas por meio de PCR-DGGE baseada na região V6 do gene ribossomal 16S DNAr, utilizando como material o DNA bacteriano total extraído das diferentes amostras. Na tabela 1 estão representados os tipos de amostras utilizadas na extração de DNA, bem como as quantidades (repetições) de cada material e as condições das amostras no momento da coleta.

Tabela 1 - Características das amostras coletadas, quantidade e condições de cultivo das amostras no momento da coleta

DATA DE INTRODUÇÃO	FASE DO CULTIVO	AMOSTRAS	REPETIÇÃO	CONDIÇÕES
20/12/2011	MULTIPLICAÇÃO IN VITRO	Microcepas no 10º subcultivo (após 220 dias de cultivo in vitro)	3 para MEGAESTACA	Condições Assépticas de Sala de Crescimento (temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$; fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de $42 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes, branca fria).
			3 para ANELAMENTO	
		Microcepas no 13º subcultivo (após 280 dias de cultivo in vitro)	3 para MEGAESTACA	
			3 para ANELAMENTO	
		Microcepas no 16º subcultivo (após 340 dias de cultivo in vitro)	3 para MEGAESTACA	
			3 para ANELAMENTO	
	ALONGAMENTO IN VITRO	Microcepas alongadas (Parte Aérea) (após 380 dias de cultivo in vitro)	3 para MEGAESTACA	
			3 para ANELAMENTO	
		Microcepas alongadas (Sistema Radicular) (após 380 dias de cultivo in vitro)	3 para MEGAESTACA	
			3 para ANELAMENTO	
20/02/2012	INICIAL	Brotações das Minicepas (Material in vivo)	3 para MEGAESTACA	Casa de Vegetação climatizada (umidade relativa do ar $>80\%$, temperatura entre 26 a 30°C). Matrizes em vasos com areia lavada.
			3 para ANELAMENTO	
	MULTIPLICAÇÃO IN VITRO	Microcepas no 10º subcultivo (após 220 dias de cultivo in vitro)	3 para MEGAESTACA	Condições Assépticas de Sala de Crescimento (temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$; fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de $42 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes, branca fria).
			3 para ANELAMENTO	
		Microcepas no 13º subcultivo (após 280 dias de cultivo in vitro)	3 para MEGAESTACA	
			3 para ANELAMENTO	
		Microcepas no 16º subcultivo (após 340 dias de cultivo in vitro)	3 para MEGAESTACA	
			3 para ANELAMENTO	

4.2.6 Extração de DNA total

Amostras frescas dos explantes foram trituradas em N_2 líquido até a obtenção de material homogêneo e fino. Aproximadamente 200 mg de cada amostra foi então submetida a

extração do DNA total utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O produto da extração de DNA foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0%, seguido de coloração com brometo de etídeo e fotodocumentação em luz ultra-violeta (transluminador, Storm 845 - GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, USA).

4.2.7 Amplificação do gene 16S rRNA de Bacteria

A amplificação do fragmento contendo a região V6 do gene 16S rRNA para o grupo das bactérias foi realizada com os primers 799F (5'AAC MGG ATT AGA TAC CCK G 3') (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) 1492R (5'TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (LANE, 1991). As condições de amplificação do gene foram: 2,5 µL de tampão para PCR 10 X, 0,1 mM de cada dNTP (0,25 µL), 2,5 mM de MgCl₂ (0,75 µL), 5 pmol de cada oligonucleotídeo (1 µL), 5U Taq DNA Polimerase (Fermentas) (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 reação foi realizada em termociclador modelo Veriti® (Applied Biosystems, Waltham, USA) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 s, anelamento a 53 °C por 40 s e extensão a 72 °C por 40 s, extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Com o objetivo de obter mais cópias do fragmento-alvo e especificar a região-alvo que apresenta alta variabilidade entre os organismos (V6), 1 µL do produto da primeira reação foram utilizados como DNA molde para a reação uma segunda reação *NESTED-PCR*, para este fim utilizou-se os primers F968/GC (5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3') (NÜBEL et al., 1996) e R1378 (5'GGG CGG TGA GTA CCA GGC 3')CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') (HEUER et al., 1997). A reação de PCR-DGGE foi preparada usando 5 µL de tampão para PCR (10x), 4 µL de dNTP (2,5 mM), 0,2 µL de cada primer (100 mM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (Fermentas), com 5 µL MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL formamida e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 2 min; e 72 °C por 10 min.

4.2.8 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A análise DGGE foi realizada usando o sistema phorU2 (Ingeny, Goes, Holanda). Os produtos amplificados na segunda reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de

poliacrilamida 6 % (p/v) com gradiente desnaturante 45-65 % (onde 100 % de desnaturação significa 7 M de uréia e 40 % de formamida). O gel foi submetido à eletroforese vertical por 16 h a 100 V em temperatura constante de 60 °C.

Após a eletroforese os géis foram corados com SYBR Green I (Invitrogen, Breda, The Netherlands), e fotodocumentados (Storm 845, General Electric). As imagens resultantes foram analisadas com o auxílio do software *ImageQuant TL unidimensional* (Amersham Biosciences, Amersham, UK, v.2003) (MCCAIG; GLOVER; PROSSER, 2001).

4.2.9 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa Past Statistics 1.90 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), no qual realizou-se a análise de coordenadas principais (PCoA), utilizando o algoritmo de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957), para observar a distribuição das amostras.

4.3 Resultados

4.3.1 Desenvolvimento das plantas

De maneira geral, as microcepas provenientes de megaestaca independentemente da data de introdução apresentaram desenvolvimento ligeiramente superior do que as microcepas provenientes de anelamento (Figura 2). Ao serem cultivadas sob as mesmas condições ambientais e meio de cultura com mesma composição, verificou-se nas análises visuais, maior tamanho das microcepas de megaestaca, ou seja, maior multiplicação das brotações, a aparência das microcepas, também foi melhor em megaestaca, nas quais, a coloração das brotações aproximou-se do esperado (folíolos verdes, sem amarelecimento ou avermelhamento).

Figura 2 - Análise visual de aparência. A – Microcepas provenientes de Megaestaca da base da copa. B – Microcepas provenientes de Anelamento da base do tronco. Destaque à aparência superior da microcepa de megaestaca comparada à de anelamento, que apresentaram avermelhamento dos folíolos

4.3.2 Variações na comunidade bacteriana entre os tratamentos avaliados

Os resultados apresentados nas figuras 3 e 4 demonstram as variações das comunidades bacterianas endofíticas, bem como as explicações das variâncias contidas em cada amostra. Ao se observar os géis de DGGE (Figuras 3A e 4A) foi possível verificar os perfis de bandas de cada amostra, com a existência de bandas comuns (setas vermelhas), ou exclusivas (setas amarelas) a uma amostra ou a um grupo de amostras. Quando esses perfis foram analisados com relação à PCoA, essas discrepâncias ficaram ainda mais evidentes, permitindo observar uma variação entre as amostras, com significativas diferenças entre a diversidade das comunidades oriundas de cada material.

Dentre todas as comparações, as maiores diferenças ocorreram quando foram comparadas, no gel 1 (introdução em 20/12/2011) amostras provenientes de anelamento multiplicadas no 10º e 16º subcultivos, ou seja, as microcepas do 10º subcultivo apresentaram diversidade de táxons diferente da encontrada nas amostras do 16º subcultivo (120 dias depois). No gel 2 (introdução em 20/02/2012), por sua vez, a variação ocorreu em maior grau ao se comparar amostras provenientes de megaestaca in vivo (amostras iniciais) e as multiplicadas no 13º subcultivo.

Ao realizar a análise para as amostras introduzidas em 20/12/2011, tem-se que, a análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 3B) indicou uma explicação de 39,3% no total de variância contida nos perfis (23,43% na PCo1 e 15,87% na PCo2), na qual é possível

observar a distribuição da estrutura da comunidade bacteriana, sem, no entanto, haver dissimilaridade entre as amostras de diferentes fontes de explantes (anelamento e megaestaca). Especificamente, observou-se um gradiente formado entre as amostras oriundas de microcepas de megaestaca ao longo dos subcultivos em relação ao eixo “*PCo1*”. De forma diferente, houve uma maior similaridade na estrutura das comunidades bacterianas endofíticas para as amostras provenientes de anelamento ao longo dos subcultivos.

Na fase de alongamento e enraizamento *in vitro*, observou-se uma partição das comunidades bacterianas endofíticas, de modo que ocorreram diferenças significativas nas análises de diversidade dos perfis da parte aérea e do sistema radicular da mesma fonte de explante. Contudo, o comportamento das comunidades bacterianas endofíticas foi distinto nas amostras de microcepas alongadas de megaestaca e de anelamento, havendo maior diversidade para as microcepas alongadas provenientes de megaestaca na parte aérea do que no sistema radicular e inversamente para as microcepas alongadas oriundas de anelamento, nas quais a maior diversidade ocorreu para o sistema radicular, comparativamente à parte aérea.

Porém, da mesma maneira como observado nos demais subcultivos, as microcepas oriundas do anelamento, e submetidas à fase de alongamento, apresentaram maiores valores com relação à diversidade, quando comparadas às de megaestaca, independentemente da região, parte aérea ou sistema radicular.

Nas análises realizadas para as introduções de 20/02/2012 (Figura 4), observou-se um comportamento das comunidades bacterianas endofíticas semelhante às análises anteriores, apresentando, com o teste de coordenadas principais *PCoA* (Figura 4B), uma explicação de 46,71% do total da variância contida nos perfis, 27,87% no *PCo1* e 18,84% no *PCo2*, não apresentando uma dissimilaridade “característica” entre o tipo de cultivo e a fonte de explante, contudo, pôde-se observar que as amostras *in vivo* apresentaram alta dissimilaridade entre si. A dinâmica, ao longo dos subcultivos entre as amostras introduzidas em 20/12/2011, foi similar às amostras introduzidas em 20/02/2012, com tendência de maior similaridade entre as amostras de microcepas provenientes de anelamento ao longo dos subcultivos, quando comparada à dinâmica das amostras oriundas de megaestaca.

Figura 3 - Resultados baseados no perfil da comunidade de bactérias endofíticas totais (gene 16S rRNA) presentes em microcepas provenientes de megaestaca e de anelamento da base do tronco de *E. benthamii*, introduzidas in vitro em 20/12/2011. Em fase de multiplicação nos 10°, 13° e 16° subcultivos e em fase alongamento e enraizamento. A: Gel de DGGE, no qual verifica-se os perfis da comunidade bacteriana endofítica de cada amostra, bem como a presença de bandas comuns a maioria das amostras (setas vermelhas) e bandas exclusivas a uma ou poucas amostras (setas amarelas). B: Análise das Coordenadas Principais (PCoA) para a matriz de similaridade Bray-Curtis, com a obtenção de grupos de amostras (círculos). Sendo MEGA. = microcepas de megaestaca da base da copa; ANEL = microcepas de anelamento da base do tronco; 10°, 13° e 16° = subcultivos em que as amostras foram coletadas; Along. = brotações alongadas in vitro e Raiz = sistema radicular oriundo do cultivo in vitro

Figura 4 - Resultados baseados no DGGE para comunidades de bactérias endofíticas totais (gene 16S rRNA) presentes em explantes (in vivo) e em microcepas provenientes de megaestaca e de anelamento da base do tronco de *E. benthamii*. In vivo cultivadas em condições de casa de vegetação e posteriormente introduzidas in vitro em 20/02/2012. Amostras in vitro todas em fase de multiplicação nos 10°, 13° e 16° subcultivos. A: Gel de DGGE, no qual verifica-se os perfis da comunidade bacteriana endofítica de cada amostra, bem como a presença de bandas comuns a maioria das amostras (setas vermelhas) e bandas exclusivas a uma ou poucas amostras (setas amarelas). B: Análise das Coordenadas Principais (PCoA) para a matriz de similaridade Bray-Curtis, com a obtenção de grupos de amostras (círculos). Sendo MEGA. = microcepas de megaestaca da base da copa; ANEL = microcepas de anelamento da base do tronco; 10°, 13° e 16° = subcultivos em que as amostras foram coletadas; In vivo = minicepas coletadas para extração de DNA, pouco antes da introdução in vitro

Outro aspecto importante ocorreu em relação à dinâmica quantitativa de táxons presentes nas diferentes amostras. Dessa maneira, verificou-se no material de procedência de

megaestaca da base da copa e também no material de procedência de anelamento da base do tronco, ambos estabelecidos *in vitro* em 20/12/2011 e em 20/02/2012, grupos específicos (bandas) nas amostras do 10º, 13º e 16º subcultivos (Figura 5) com compartilhamento de táxons. De maneira geral tem-se uma similaridade na quantidade de táxons revelados no DGGE das amostras de megaestaca e anelamento introduzidas *in vitro* em 20/12/2011, enquanto que no material introduzido *in vitro* em 20/02/2012, houve maior ocorrência de táxons nas amostras de megaestaca (90) em relação às de anelamento (78).

Ao avaliar-se o material introduzido em 20/12/2011 tem-se que em microcepas provenientes de megaestaca (Figura 5A) o número de bandas comuns a todas as amostras foi de 5, enquanto que nas microcepas oriundas de anelamento este número foi de 14 (Figura 5B). O número de bandas exclusivas, porém, foi maior para megaestaca (10 no 10º subcultivo, 20 no 13º e 10 no 16º) do que para anelamento (8 no 10º subcultivo, 6 no 13º e 5 no 16º). Outro dado interessante foi a diminuição do número de táxons comuns à medida que os subcultivos avançaram, para megaestaca, por exemplo, o compartilhamento de bandas do 10º para o 13º subcultivo foi de 15, do 13º para o 16º diminuiu para 7, e apenas 4 bandas comuns no 10º e 16º subcultivos. O mesmo ocorreu com as microcepas provenientes de anelamento, em que houve compartilhamento de 28 bandas do 10º para o 13º subcultivo, de 6 bandas do 13º para o 16º, e apenas 3 bandas comuns no 10º e 16º subcultivos.

O material introduzido em 20/02/2012 também apresentou elevado número de bandas totais (90 para megaestaca e 78 para anelamento), com dinâmica populacional muito semelhante ao verificado no material introduzido em dezembro. Dos quais, as microcepas provenientes de megaestaca (Figura 5C) apresentaram 13 bandas comuns à todas as amostras, enquanto que nas microcepas provenientes de anelamento foram 20 bandas (Figura 5D). As bandas exclusivas somaram, em megaestaca, 9 no 10º subcultivo, 21 no 13º e 11 no 16º), enquanto que em anelamento foram 7 no 10º subcultivo, 10 no 13º e 15 no 16º. O número de táxons compartilhados também diminuiu ao longo dos subcultivos, sendo que para as microcepas oriundas de megaestaca, o número de bandas comuns do 10º para o 13º subcultivo foi de 17, do 13º para o 16º subcultivo, o número diminuiu para 11, e 8 bandas comuns foram encontradas no 10º para o 16º subcultivos. Para as microcepas provenientes de anelamento, o mesmo ocorreu, com compartilhamento de 11 bandas do 10º para o 13º subcultivo, de 9 bandas do 13º para o 16º, e de 6 bandas comuns no 10º e 16º subcultivos.

Figura 5 - Diagramas de Venn comparando as amostras dos 10° (círculo preto), 13° (círculo vermelho) e 16° (círculo azul) subcultivos de cada fonte de explante. Sendo A e C = microcepas provenientes de megaestaca da base da copa. B e D = microcepas provenientes de anelamento da base do tronco

Na figura 6 verifica-se que a multiplicação *in vitro* englobou todos os subcultivos (do 10° ao 16°, círculo preto) e foi comparada ao processo de alongamento e enraizamento *in vitro*, no qual se dividiu a raiz (círculo vermelho) da parte aérea (círculo azul). Destacando-se que o número de bandas exclusivas na fase de multiplicação foi superior nas microcepas de megaestaca (27 bandas na Figura 6A) em relação às de anelamento (18 bandas na Figura 6B). Quando o perfil das comunidades bacterianas endofíticas de raiz e parte aérea foi comparado, verificou-se diferenças entre as microcepas de megaestaca e as de anelamento, nos quais, a raiz de megaestaca não apresentou bandas exclusivas, todas foram compartilhadas entre as

amostras de multiplicação e as da parte aérea. Nas amostras de anelamento, porém, isso foi diferente, com a presença de bandas exclusivas (8) no sistema radicular. Com relação à parte aérea, o número de bandas exclusivas de megaestaca e de anelamento foram muito próximas, 4 e 6, respectivamente.

Figura 6 - Diagramas de Venn comparando as amostras introduzidas in vitro em 20/12/2011 em fase de multiplicação (círculo preto), alongamento (círculo azul, brotação alongadas) e o enraizamento (círculo vermelho, raízes) Sendo, A = microcepas oriundas de megaestaca da base da copa; B = microcepas oriundas de anelamento da base do tronco. Ressaltando a dinâmica das populações bacterianas endofíticas ao longo do tempo, bem como a possível partição dessa comunidade quando do processo de alongamento e enraizamento in vitro

As bandas compartilhadas entre todas as amostras foram iguais em quantidade (24), para as microcepas provenientes de megaestaca e de anelamento, porém, quando comparadas duas a duas, observa-se uma tendência de diminuição do compartilhamento, ou seja, da multiplicação para o alongamento o número de bandas comuns, em megaestaca, foi 9 (Figura 6A) e em anelamento foi 14 (Figura 6B); da multiplicação para o enraizamento verificou-se o mesmo número de bandas comuns para ambas às fontes. Já para as amostras alongadas comparadas às amostras radiculares tem-se o compartilhamento de poucas bandas, 3 para megaestaca e 5 para anelamento.

A figura 7 ilustra de maneira numérica a dinâmica da comunidade bacteriana endofítica quando exposta a um novo sistema de cultivo, comparando-se as amostras in vivo (pouco antes da introdução in vitro) com as amostras in vitro dos 10º (quando as microcepas atingiram níveis ótimos de desenvolvimento e multiplicação, ou seja, após 220 dias) e

16º subcultivos (final do processo de multiplicação, após 340 dias). Sendo assim, obteve-se amostras provenientes de megaestaca, 7 bandas exclusivas in vivo, 18 no 10º subcultivo e 20 no 16º, no caso específico de anelamento o número de bandas foi de 20 exclusivas in vivo, 6 no 10º e 12 no 16º, subcultivos.

Figura 7 - Diagramas de Venn comparando as amostras introduzidas in vitro em 20/02/2012. Amostras in vivo (minicepas coletadas pouco antes da introdução in vitro) representadas pelo círculo preto, amostras do 10º (círculo vermelho) e do 16º (círculo azul) subcultivos. Sendo, A = microcepas provenientes de megaestaca da base da copa; B = microcepas provenientes de anelamento da base do tronco. Ressaltando a dinâmica das populações bacterianas endofíticas quando a planta hospedeira foi introduzida in vitro, e ao longo da multiplicação nesse sistema de cultivo

O compartilhamento foi diferente para as microcepas provenientes de megaestaca comparada às de anelamento. Para as amostras de megaestaca in vivo obteve-se o compartilhamento de 8 bandas com as amostras do 10º subcultivo e somente 2 com o 16º subcultivo, já as amostras do 10º subcultivo compartilharam 13 bandas com as do 16º. Em contraposição, para as de anelamento o compartilhamento de táxons se manteve praticamente constante entre as amostras, sendo 11 bandas entre in vivo e as do 10º subcultivo e de 12 bandas com as do 16º, bem como 10 bandas entre as amostras do 10º e as do 16º.

4.4 Discussão

A falta de estudos que enfatizem a dinâmica populacional bacteriana endofítica na micropropagação dificulta sobremaneira as discussões a respeito de como o cultivo e as

condições *in vitro* interferem nas comunidades endofíticas, e em última análise no desenvolvimento e no potencial morfogênico dessas microplantas.

Neste contexto, ao se comparar as duas fontes de explante obteve-se para as microcepas de megaestaca desenvolvimento superior com relação às de anelamento (Figura 2), isso pode ser explicado pelo fato de que diferentes fontes de explante apresentam comportamentos distintos no cultivo *in vitro*, relacionados, principalmente, ao estado fisiológico da planta-matriz e à época de coleta (BORGES et al., 2011; HARTMANN et al., 2011; SILVA et al., 2011). Pode-se ainda sugerir que isso ocorra devido ao fato de que a região basal ou tronco (anelamento) sofre em menor intensidade com as alterações ambientais, comparativamente à megaestaca, que, ao contrário, é constantemente perturbada por essas variações, podendo, dessa forma, lançar mão de uma ampla gama de respostas, garantindo-lhe uma maior sobrevivência e aclimação em diferentes condições de cultivo (SHINOZAKI; DENNIS, 2003; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SEKI, 2003). Estas características adaptativas refletem no cultivo *in vitro*, o que demonstra claramente a necessidade em se escolher a melhor fonte de explante para o cultivo *in vitro*. Porém, o que se desconhece é se essa aptidão *in vitro* pode também ser modulada pela comunidade endofítica presente nesses explantes.

A comparação entre os perfis das comunidades bacterianas endofíticas das amostras, mostrou a presença de bandas comuns a todas, ou pelo menos grande parte das amostras, nos perfis de DGGE de ambos os géis, podendo indicar um mesmo grupo bacteriano, evidenciando, possivelmente, a habilidade que certos grupos de endófitos possuem em colonizar diferentes regiões da planta hospedeira, pois ao se comparar amostras de microcepas provenientes de megaestaca (copa da árvore) e de anelamento (base do tronco), compara-se indiretamente diferentes regiões de colonização da planta matriz, até mesmo diferentes nichos de ocupação. O compartilhamento de bandas entre diferentes regiões da mesma planta, foi verificado em outros trabalhos, com pupunha (ALMEIDA et al., 2009) e abacaxi (ABREU-TARAZI et al., 2010), ambas micropropagadas, ou seja, em ambiente *in vitro*.

A presença ou a ausência de bandas, por outro lado, mostra a especificidade de alguns grupos em colonizar apenas uma região, tecido ou até mesmo célula da planta hospedeira. Isso ocorre porque as condições bioquímicas e fisiológicas das células, estabelecidas pelo organismo hospedeiro, podem influenciar de forma distinta, levando a uma seleção diferencial de microrganismos associados (ANDREOTE et al., 2009b; IZUMI et al., 2008; PAMPHILE; AZEVEDO, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005).

De qualquer maneira, o resultado mais importante obtido foi que o compartilhamento e/ou a especificidade alteraram-se ao longo dos subcultivos na mesma amostra. Ou seja, amostras de microcepas provenientes de megaestaca e de anelamento, apresentaram diferenças nos perfis das comunidades do 10º para o 13º e do 13º para o 16º subcultivos, em ambas as datas de introdução (Figuras 3A e 4A), para as amostras provenientes de megaestaca, essa diferença nos perfis entre os subcultivos foi ainda mais pronunciada, havendo uma maior pressão de seleção entre os grupos bacterianos, de forma que as amostras apresentaram baixa correlação entre si, o que não se observou nas amostras oriundas de anelamento. Variações na composição da comunidade bacteriana foram verificadas, de maneira mais clara, nos diagramas de Venn (Figura 5).

Isso pode ser explicado pelo fato de que as relações estabelecidas entre os endófitos e seu hospedeiro são, de maneira geral, frágeis e estão constantemente sofrendo a ação de fatores externos que modulam as populações microbianas. De acordo com Pamphile e Azevedo (2002), a especificidade da associação, endófito e planta hospedeira, é influenciada por um ou mais fatores ambientais, além de fatores genéticos da planta. Por se tratar de um ambiente rigorosamente controlado, as questões macroambientais são desconsideradas, como estresse hídrico, balanço nutricional, por exemplo. Porém, alguns aspectos microambientais podem influenciar drasticamente a manutenção e diversidade endofítica, como alta taxa metabólica (material em intensa multiplicação) e uso de reguladores de crescimento e de sacarose (LEIFERT; CASSELLS, 2001; THOMAS; KUMARI, 2010). Segundo Fang e Hsu (2012), o ambiente *in vitro* pode selecionar apenas espécies bacterianas específicas, em detrimento da supressão de outras, além disso, cada espécie, cultivar ou clone é capaz de criar um ambiente *in vitro* exclusivo, permitindo a multiplicação de espécies endofíticas mais adaptadas.

Outro resultado que deve ser ressaltado é a diferença existente nos perfis das comunidades, diversidade de grupos bacterianos, ilustrados nos diagramas de Venn, quando se comparou o material *in vivo* com o material *in vitro* (Figura 7), obtendo-se, dessa forma, como resultado a manutenção da diversidade após o estabelecimento *in vitro* (nos 10º e 16º subcultivos) para microcepas provenientes de megaestaca, com leve aumento no cultivo *in vitro* (Figura 7A) e a redução da diversidade para as amostras de oriundas de anelamento quando introduzidas *in vitro* (Figura 7B). Ulrich, Stauber, e Ewald (2008) compararam a comunidade bacteriana endofítica de plantas de *Populus* sp., oriundas de campo e de micropropagação, e constataram que o número de táxons diminuiu quando o material do

campo foi introduzido *in vitro*, e tal como no presente estudo, verificaram diferenças na composição das comunidades.

Essas diferenças nas comunidades bacterianas endofíticas observadas entre as fontes de explante mostram uma nítida sensibilização dos grupos microbianos de anelamento ao se iniciar um processo de cultivo *in vitro*. Em megaestaca, no entanto, esse processo de cultivo promoveu uma maior diversidade endofítica, o que pode servir como um forte indicativo da resiliência e plasticidade que a comunidade bacteriana endofítica de megaestaca possui.

O objetivo final da micropropagação é formar uma planta inteira (muda) que será aclimatizada e levada a campo para ser cultivada, por essa razão, mesmo tendo escolhido diferentes fontes de explante e, conseqüentemente, uma microbiota endofítica distinta, aqueles microrganismos que permaneceram no material durante todo o cultivo *in vitro*, quando em fase de alongamento, tem a chance de se redistribuir na microplanta, fato este evidenciado pelo perfil de DGGE (Figura 3A), num fenômeno claro de especialização dessas bactérias endofíticas.

A especialização é um mecanismo biótico que depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos, como: a concorrência, parasitismo, reforço de barreiras reprodutivas, resistência do hospedeiro e co-evolução de características correspondentes (MORICCA; RAGAZZI, 2008; MORICCA; GINETTI; RAGAZZI, 2012). A co-evolução restringe os endófitos, mesmo que tenham a disposição incontáveis recursos e hospedeiros, a um seletivo grupo de hospedeiros, ou a uma única espécie, ou a um único indivíduo e até mesmo a certos órgãos de um mesmo indivíduo (MORICCA; GINETTI; RAGAZZI, 2012; COOK et al., 2009, 2012; SUKUMAR et al., 2013).

Esse fenômeno pode ser evidenciado com os diagramas de Venn (Figura 6), nos quais a baixa taxa de compartilhamento de bandas entre as amostras de raiz com as da parte aérea, para ambas as fontes de explante, mostra significativamente, uma predileção ou aptidão de determinados grupos a habitarem nichos diferenciados dentro do mesmo hospedeiro, uma vez que do processo de multiplicação as microcepas foram transferidas para meio específico de alongamento, no qual após dois subcultivos ocorreu a diferenciação celular em parte aérea completamente expandida e sistema radicular bem desenvolvido. Nesse processo de diferenciação, sugere-se que os grupos de endofíticos, coabitando anteriormente a microcepa (mesma região), passam a se distribuir de acordo com as regiões a que são mais adaptados co-evolutivamente (nichos de colonização).

Ressalta-se que as condições ambientais foram diferenciadas nas amostras de microcepas destinadas ao alongamento e enraizamento *in vitro* e nas plantas *in vivo*, onde no

primeiro as condições foram mantidas as mesmas que na fase de multiplicação, mas com alteração no balanço hormonal do meio de cultivo, já no segundo as condições de casa de vegetação se diferenciam das da sala de crescimento, a começar pelo cultivo asséptico que é ausente neste sistema (Tabela 1). No entanto, apesar de as condições ambientais serem consideradas por muitos estudos como um fator de grande responsabilidade na alteração da diversidade das comunidades endofíticas (ANDREOTE et al., 2010; HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008), neste estudo não foram fatores importantes para explicar as diferenças nas comunidades bacterianas endofíticas, visto que, no primeiro perfil (Figura 3D) não ocorreu separação entre as comunidades das amostras de anelamento, tanto em fase de multiplicação, quando em alongamento e no segundo perfil (Figura 4D) as amostras in vivo e in vitro de anelamento foram agrupadas.

Outro fator usualmente mencionado na alteração das comunidades bacterianas endofíticas é o genótipo da planta (ANDREOTE et al., 2009a; HARDOIM et al., 2011; HARTMANN et al., 2009; SESSITSCH et al, 2002; ZUL et al, 2007), mas que não se aplica no estudo, por se tratar da mesma planta. O fato de se utilizar fontes distintas de explante (anelamento e megaestaca) também não foi responsável pela formação dos agrupamentos, uma vez que, amostras de megaestaca e anelamento foram agrupadas em ambos os perfis. Nos diagramas de Venn, no entanto, foi possível perceber diferenças entre as duas fontes (Figuras 5, 6 e 7), uma vez que houve variação no número de compartilhamentos, de megaestaca com proeminente prevalência de bandas exclusivas em detrimento de bandas compartilhadas entre as amostras, já as de anelamento, embora sob as mesmas condições, apresentaram comportamento da comunidade bacteriana endofítica distinto, com uma predominância do compartilhamento dos táxons em detrimento de bandas isoladas.

4.5 Conclusões

Como conclusões, ressalta-se que todos os resultados indicam que a comunidade bacteriana endofítica presente em megaestaca tende a ter uma diversidade menor, porém, mais variável, em ambas as datas de introdução do material, quando comparado com as amostras de anelamento, mostrado pela análise da PCoA, tanto na dinâmica (presença ou ausência), quanto na abundância de grupos. Esta constante flutuação pode indicar uma colonização de grupos menos específicos ou oportunistas, enquanto que em anelamento esses grupos são mais específicos ou obrigatórios. Ou seja, por estar presente no alto das árvores a megaestaca pode abrigar uma grande diversidade de endófitos, devido à alta taxa de alterações ambientais

e bióticas a que é submetida, dessa forma, ao se pressionar ainda mais as condições de convívio (cultivo in vitro) e realizar subcultivos sucessivos, as populações podem ser drasticamente afetadas ou até mesmo extintas num claro processo de especificação de grupos microbianos.

De qualquer maneira, embora, haja muito empenho em se eleger uma causa nas flutuações das comunidades bacterianas endofíticas, pouco se sabe a este respeito, ainda. Existem fatores dos quais não foram levantados e que possivelmente, também, não irão comprovar por completo este fenômeno. O que se sabe é que existe uma rede complexa de fatores, como em todo sistema biológico, que interfere em maior e menor grau, dependendo de muitas outras variáveis e que isoladamente não podem ser responsabilizadas por causarem alterações na dinâmica e diversidade da comunidade bacteriana endofítica. Por essa razão estudos devem ser feitos de modo a adicionar novas peças a este intrigante quebra-cabeça.

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, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.

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

ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 10, 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, n. 5, p. 467-470, 2005.

ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; ELSAS, J.D. van; da ROCHA, U.N.; OVERBEEK, L.S. van. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n.11, p. 3396-3406, 2009a.

ANDREOTE, F.D.; ROCHA, U N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; OVERBEEK, L.S. van. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 97, n. 4, p. 389-399, 2010.

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, n. 6, p. 1065-1073, 2009b.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JÚNIOR., 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.

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

BACCARIN, F.J.B.; BRONDANI, G.E.; ALMEIDA, L.V. VIEIRA, I.G. OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, Dordrecht, 2015. DOI 10.1007/s11056-015-9472-x. In press.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.D.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C. Multiplicação in vitro de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 173-182, 2011.

BRAY, J.R.; CURTIS, J.T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, New York, v. 27, n. 4, p. 325-349, 1957.

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

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, n.3, p.252-263, 2001.

COOK, D.; GARDNER, D.R.; RALPHS, M.H.; PFISTER, J.A.; WELCH, K.D.; GREEN, B. T. Swainsonine concentrations and endophyte amounts of *Undifilum oxytropis* in different plant parts of *Oxytropis sericea*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 10, p. 1272-1278, 2009.

COOK, D.; SHI, L.; GARDNER, D.R.; PFISTER, J.A.; GRUM, D.; WELCH, K.D.; RALPHS, M.H. Influence of Phenological Stage on Swainsonine and Endophyte Concentrations in *Oxytropis sericea*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 38, n. 2, p. 195-203, 2012.

DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; TEIXEIRA, M.A.; ASSUMPÇÃO, L.C.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.

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

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

FANG, J.Y.; HSU, Y.R. Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micropropagated *Aglaonema* cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, n. 1, p. 53-62, 2012.

GONG, L.J.; GUO, S.X. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 8, n. 5, p. 731-736, 2009.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, New York, v. 4, n. 1, 9 p., 2001.

HARDOIM, P.R.; ANDREOTE, F.D.; REINHOLD-HUREK, B.; SESSITSCH, A.; van OVERBEEK, L. S.; van ELSAS, J.D. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 77, n. 1, p.154-164, 2011.

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

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; TUINEN, D. van; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, n. 1-2, p. 235-257, 2009.

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

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M. Analysis of *Actinomyce* communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n.8, p. 3233-3241, 1997.

HUANG, W.Y; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 tradicional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 33, n.1, p. 61-75, 2008.

IKEDA, S.; OKUBO, T.; ANDA, M.; NAKASHITA, H.; YASUDA, M.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; EDA, S.; MOMIYAMA, A.; KIMIHIRO TERASAWA, K.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Community- and Genome-Based Views of Plant-Associated Bacteria: Plant-Bacterial Interactions in Soybean and Rice. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, n. 9, p. 1398-1410, 2010.

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, n. 3, p. 173-179, 2008.

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. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n.12, p. 1244-1251, 2004.

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

LATA, H.; LI, X. C.; SILVA, B.; MORAES, R.M.; HALDA-ALIJA, L. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated *Echinaceae* plants using 16S rRNA sequencing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, n. 3, p. 353-359, 2006.

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

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

MCCAIG, A.E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4554-4559, 2001.

MENGONI, A.; SCHAT.H.; VANGRONSVELD, J. Plants as extreme environments? Niresistant bacteria and Ni-hyper accumulators of serpentine flora. **Plant and Soil**, The Hague, v. 331, n. 1/2, p. 5-16, 2010.

MORICCA, S.; GINETTI, B.; RAGAZZI, A. Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, n. 3, p. 587-598, 2012.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: A lesson from *Discula quercina*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 4, p. 380-386, 2008.

NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, n. 19, p.5636-5643, 1996.

PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*. L). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 18, n. 5, p. 391-396, 2002.

PINI, F.; FRASCELLA, A.; SANTOPOLO, L.; BAZZICALUPO, M.; BIONDI, E. G.; SCOTTI, C.; MENGONI, A. Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 78, p. 1-10, 2012.

PIRTTILÄ, A.M.; PODOLICH, O.; KOSKIMÄKI, J.J.; HOHTOLA, E.; HOHTOLA, A. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 1, p. 47-55, 2008.

POLESI, N.P.E. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. 2010. 120p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

QUAMBUSCH, M.; PIRTTILÄ, A.M.; TEJESVI, M.V.; WINKELMANN, T.; BARTSCH, M. Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. **Tree Physiology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 524-533, 2014.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Oxford, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

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**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 23-32, 2002.

SHINOZAKI, K.; DENNIS, E.S. Cell signalling and gene regulation: global analyses of signal transduction and gene expression profiles. **Current Opinion in Plant Biology**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 405-409, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 410-417, 2003.

SILVA, I.M.D.C.D.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B.; BIANCHI, V.J. Resposta diferencial ao uso do Thidiazuron na regeneração in vitro de marmeleiros, cvs. ADAMS E MC. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 3/4, p. 375-382, 2011.

SUKUMAR, P.; LEGUE, V.; VAYSSIERES, A.; MARTIN, F.; TUSKAN, G.A.; KALLURI, U.C. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 909-919, 2013.

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, n. 2, p. 173-179, 2004.

THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, n.1, p. 469-474, 2010.

THOMAS, P.; KUMARI, S.; SWARNA, G.K.; GOWDA, T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 3, p. 380-390, 2007.

THOMAS, P.; SOLY, T. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n.4, 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, n.1, p. 55-63, 2008.

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, n. 3, p. 347-351, 2008.

ZUL, D.; DENZEL, S.; KOTZ, A.; OVERMANN, J. Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: implications for the determinants of bacterial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n.21, p. 6916-6929, 2007.

5 CORRELAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO, DE DIFERENTES FONTES DE EXPLANTES DE *Eucalyptus benthamii* MULTIPLICADAS IN VITRO, COM AS COMUNIDADES BACTERIANAS ENDOFÍTICAS

Resumo

O presente capítulo tem como principal objetivo correlacionar os resultados apresentados nos terceiro e quarto capítulos, de modo a integrar os conceitos e promover uma interação entre os resultados, que a priori podem parecer desconexos, mas que se relacionam e participam de uma intrínseca rede de fatores, que podem interferir no desenvolvimento do material vegetal, na frequência e intensidade de manifestação endofítica, bem como refletir o status da microbiota bacteriana desse material, durante o processo de micropropagação. Neste contexto, todos os resultados apresentados no conjunto da obra e aqui relacionados, permitem estabelecer algumas inferências, e dentre elas citar, que a manifestação endofítica pode ocorrer em maior ou menor intensidade dependendo da fonte de explante selecionada e das condições em que a planta está submetida; e ainda, que a citada manifestação pode ser um reflexo do estado ou condições da planta no processo de micropropagação, bem como do tipo de relação que a planta estabelece com sua microbiota endofítica; e que em última análise, o desenvolvimento das microcepas, pode estar ligado a essa comunidade bacteriana endofítica, além dos aspectos genéticos e de totipotencialidade inerente a cada material.

Palavras-chave: Megaestaca; Anelamento; Correlação; Capítulo 3; Capítulo 4

Abstract

This chapter aims to correlate the results in the third and fourth chapters, in order to integrate the concepts and promote interaction between the results, which a priori may seem unconnected, but which are related and participated in a intrinsic network which may interfere in explant development, in frequency and intensity of the endophytic manifestation, besides reflect the status of the bacterial microbiota of micro-stumps during the micropropagation process. In this context, all results shown in the body of work and related here, allow us to establish some inferences, and among them mention that endophytic manifestation may occur to a greater or lesser extent in dependence of the explant source selected and the conditions under which the plant are cultured; and further, that the endophytic manifestation can be a response of the plant conditions during the in vitro culture process and the relationship type that the plant establishes with their endophytic microbiota; which can, in the final analysis, the micro-stumps development can be linked to the bacterial endophytic community and genetic aspects of totipotentiality own of the each material.

Keywords: Micropropagation; Explants Sources; Successive Subcultures; Molecular Analysis

5.1 Introdução

Sabe-se que os endófitos participam, juntamente com a planta hospedeira, de um processo co-evolutivo, sem o qual, acredita-se não ser possível a vida do vegetal. Estudos têm avançado neste sentido, tornando cada vez mais evidente que os mesmos são onipresentes, independentemente, do processo de cultivo a que a planta é submetida, inclusive na cultura de tecidos ou micropropagação.

No entanto, muitas questões, ainda são levantadas a este respeito, principalmente no que tange ao desenvolvimento das microplantas. Como por exemplo: uma vez no interior dos tecidos vegetais, os endófitos que resistiram a todo processo de desinfestação e ao processo de estabelecimento *in vitro*, podem prejudicar ou melhorar o desenvolvimento das microplantas? Dependendo da fonte de explante essa comunidade bacteriana endofítica persistente, poderá ser diferente e, portanto, permitir respostas diferentes no desenvolvimento das microplantas?

A comparação de resultados aparentemente tão distintos pode ser ousada, mas ao mesmo tempo, permite algumas inferências no tocante ao desenvolvimento das plantas durante o processo de cultivo *in vitro* e às comunidades endofíticas que abrigam. Neste contexto, o presente capítulo teve por objetivo avaliar e comparar os resultados obtidos no terceiro e quarto capítulos, de modo a correlacionar o desenvolvimento *in vitro* de microcepas de *Eucalyptus benthamii*, provenientes de megaestaca da base da copa e anelamento da base do tronco, com seus perfis bacterianos endofíticos.

5.2 Desenvolvimento

Ao utilizar-se uma única planta matriz de *E. benthamii* com 13 anos de idade, foi possível avaliar o desenvolvimento *in vitro*, durante a multiplicação, de duas fontes distintas de explantes (megaestaca da base da copa e anelamento da base do tronco), bem como os perfis das comunidades bacterianas endofíticas que hospedam.

No capítulo 3 o desenvolvimento *in vitro* baseado na seleção de duas fontes de explantes foi avaliado, levando-se em consideração os aspectos morfofisiológicos, massa seca e oxidação, havendo uma tendência em se escolher a megaestaca como a melhor fonte de explante para a multiplicação *in vitro* de *E. benthamii*. Isso porque quando submetida aos diferentes tratamentos aplicados (diferentes meios, concentrações de sacarose e pH), seu desenvolvimento, mostrou-se um pouco melhor (Figura 1).

Como extensivamente discutido nos capítulos 2 e 3, um dos fatores que determinam o sucesso da micropropagação, está relacionado a escolha do explante mais adequado, dessa

maneira regiões distintas da planta respondem de maneira diferenciada quando cultivadas in vitro, devido principalmente ao potencial morfogênico e a totipotencialidade de cada fonte de explantes.

Figura 1 - Valores médios do aspecto morfológico de vigor das microcepas de *E. benthamii* provenientes de anelamento do tronco e megaestaca da copa, multiplicadas in vitro, com destaque às microcepas de megaestaca. Letras minúsculas iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. B – C Análise visual da aparência das microcepas, sendo B – microcepa de megaestaca com melhor desenvolvimento que C – microcepa de anelamento. Barra: 0,5cm

A manifestação endofítica, foi outro parâmetro avaliado no capítulo 3 e quando presente ocorreu em maior ou menor intensidade, principalmente, devido à fonte de explante. Sendo assim, podemos relacionar o melhor desenvolvimento das microcepas com a maior manifestação no meio de cultivo, independentemente do tratamento aplicado, como verificado em microcepas procedentes de megaestaca (Figura 2).

Figura 2 - Valores médios de manifestação endofítica de *E. benthamii* avaliadas em relação à fonte de explante, com destaque à maior ocorrência para as microcepas procedentes de megaestaca. Letras minúsculas iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A manifestação endofítica é um evento que ocorre com frequência durante o processo de micropropagação, principalmente, para culturas mantidas e subcultivadas por anos no sistema de cultivo *in vitro*, porém, a consagração do termo ainda é recente, visto que nos trabalhos de pesquisa esse, dificilmente, é um parâmetro avaliado. A manifestação endofítica foi durante muito tempo confundida com contaminação microbiana e por essa razão, sua avaliação nunca fora bem aceita, tão pouco, quantificada, pelo contrário, o descarte era iminente.

Com o passar dos anos e com avanços nas pesquisas dos grupos de pesquisas do Thomas e do Almeida, ocorreram diferenciações e ousou-se classificar os eventos como diferentes. Dessa maneira, o conceito de contaminações microbianas foi atribuído ao crescimento de microrganismos pouco tempo depois do estabelecimento *in vitro*, em razão de tratar-se de um processo de desinfestação ineficiente ou ainda, por falhas no processo de subculturas. Já o termo manifestação endofítica foi atribuído ao crescimento repentino, no meio de cultivo, de microrganismos endofíticos latentes, após longos períodos de cultivo em resposta a possíveis estresses ou desequilíbrios fisiológicos ocorridos na planta hospedeira.

Essa nova abordagem, no entanto, deve seguir alguns critérios, para estabelecer qual o ponto ideal, em que a convivência é aceita e inclusive benéfica, e qual ponto esta manifestação passa a competir com a microplanta, interferindo no seu desenvolvimento e prejudicando a micropropagação. Nesse contexto, pesquisas desenvolvidas, no Laboratório de

Morfogênese e Biologia de Plantas, objetivaram, em primeiro lugar, estabelecer limites de uma convivência harmônica entre as manifestações e a espécie cultivada *in vitro*, de tal modo que, muitos resultados apontaram como benéfica (em termos de desenvolvimento das microcepas) à micropropagação essa coexistência, ao invés do descarte (prática usual que pode acarretar em perdas de tempo, dinheiro e de material genético de alto valor). Em segundo lugar, uma vez ultrapassado o limite de convivência harmônica, determinar maneiras de se controlar essas manifestações a níveis aceitáveis sem prejudicar as microplantas, com o uso de antibióticos e antimicrobianos adequados. Para só então proceder com o descarte do material, caso nenhuma medida tenha sido eficiente.

Outro ponto, a ser ressaltado e que norteou a presente pesquisa, foi se essas manifestações eram capazes de indicar o estado de “saúde” da microplanta, ou ainda indicar mudanças nas relações que a microplanta estabelece com sua microbiota endofítica, frente às condições restritas de cultivo a que está submetida. O quarto capítulo, dentre outras coisas, tenta responder a essa questão, mostrando de maneira clara que dependendo da fonte de explante e do momento durante o cultivo *in vitro* (pré-cultivo, ou *in vivo*; 10°, 13°, 16°, alongamento e enraizamento) essa microbiota se altera sensivelmente, em predominância e compartilhamentos.

Portanto, todos os resultados obtidos e evidenciados no capítulo quatro, indicaram que a comunidade bacteriana endofítica presente em megaestaca tendeu a ter uma diversidade menor, porém, mais variável, em ambas as datas de introdução do material, quando comparado com as amostras de anelamento, tanto na dinâmica (presença ou ausência) quanto na abundância de grupos (Figura 3). Esta constante flutuação pode indicar que as relações estabelecidas entre os endófitos e seu hospedeiro são, de maneira geral, frágeis e estão constantemente sofrendo a ação de fatores externos que modulam as populações microbianas, ou ainda, o tipo de grupo que coloniza esses explantes, sendo que para explantes provenientes de megaestaca, estes podem ser caracterizados como menos específicos ou oportunistas, enquanto que em explantes provenientes de anelamento, esses grupos são mais específicos ou obrigatórios. Por essa razão, possivelmente, a quantidade de manifestações atribuídas às microcepas provenientes de anelamento, tenham sido menores, e menos intensas do que para as provenientes de megaestaca.

Figura 3 - Diagramas de Venn comparando as amostras introduzidas in vitro com as amostras in vivo (antes da introdução) representadas pelo círculo preto, amostras do 10º (círculo vermelho) e do 16º (círculo azul) subcultivos. A: microcepas de megaestaca. B: microcepas de anelamento. Ressaltando a dinâmica das populações bacterianas endofíticas quando a planta hospedeira foi introduzida in vitro, e ao longo desse sistema de cultivo

Cabe ressaltar que, como a figura 3 e os demais resultados do capítulo 4 mostram, a diversidade de grupos presentes em microcepas provenientes de anelamento foi maior (87) do que em megaestaca (76), no entanto, como o capítulo 3 descreveu, o desenvolvimento das microcepas de megaestaca foi levemente superior, podendo-se inferir que a seleção diferencial e involuntária de bactérias endofíticas, quando se escolhe o explante, pode, em algum grau, estar atrelada ao desenvolvimento e sucesso da micropropagação de uma determinada fonte de explante. Isso é demonstrado com a diferença existente nos perfis das comunidades bacterianas, quando se comparou o material in vivo e o material in vitro no capítulo 4, obtendo-se como resultado a manutenção e até mesmo o aumento da diversidade após o estabelecimento in vitro para microcepas provenientes de megaestaca e sensível redução da diversidade para as amostras provenientes de anelamento, mostrando uma nítida sensibilização dos grupos microbianos de anelamento ao se iniciar um processo de cultivo in vitro. Em megaestaca, no entanto, mesmo tendo uma diversidade bacteriana global menor, ao ser introduzida in vitro, houve aumento na diversidade endofítica, o que pode servir como um forte indicativo da resiliência e plasticidade que a comunidade bacteriana endofítica de megaestaca possui, refletindo no seu desenvolvimento.

5.3 Conclusão

Sendo assim, a manifestação endofítica pode indicar não somente um ponto de mudança das condições de cultivo (troca para novo meio, alteração no balanço hormonal, troca de frasco, etc.), visando minimizar o estresse da microplanta hospedeira, como também indicar a qualidade das relações existentes entre os endófitos e o seu hospedeiro, refletindo no seu desenvolvimento no sistema in vitro. Haja vista, que a possibilidade do ambiente (seja ela micro ou macro) alterar as relações endófito/planta será maior ou menor, na dependência do quão adaptado e dependente é o endófito do seu hospedeiro. Em outras palavras, quanto mais dependente ou íntima é a relação do endófito com o seu hospedeiro (obrigatório) menos propensa será sua existência na ausência dele, portanto, não se manifestam, em contrapartida, quanto menos dependente (facultativo), maiores serão as chances de crescerem no meio de cultivo na ocorrência de alterações microambientais desfavoráveis. Como consequência, a qualidade e desenvolvimento das microcepas, podem ser sensivelmente afetadas, tanto pela ocorrência de manifestação em si, quanto pela comunidade bacteriana endofítica mais ou menos sensível ao processo de micropropagação.

Bibliografia Consultada

ABREU-TARAZI, M.F.; NAVARRETE, A.A.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, C.V.; TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.

ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J. L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 10, 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, n. 5, p. 467-470, 2005.

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

ESPOSITO-POLESI, N.P.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M.. Avaliação histoquímica de espécies de microplantas hospedeiras de endófitos. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 19, n. 2, p. 61-71, 2013.

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

LEONE, G.F. **Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação in vitro de eucalipto**. 2013. 99p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PIOTTO, K.D.B. **Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento in vitro de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. 2013. 157p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

POLESI, N.P.E. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. 2010. 120p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

THOMAS, P. Intense association of non-culturable endophytic bacteria with antibiotic-cleansed in vitro watermelon and their activation in degenerating cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 12, p. 2313-2325, 2011.

_____ Long-term survival of *Bacillus* spores in alcohol and identification of 90% ethanol as relatively more spori/bactericidal. **Current Microbiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 130-139, 2012.

_____ Reemergence of covert bacteria *Bacillus pumilus* and *Brevibacillus* sp. in microbe-freed grape and watermelon stocks attributable to occasional autoclaving-defying residual spores from previous cycles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, n. 2, p. 155-165, 2006.

THOMAS, P.; ASWATH, C. Alcohol-mediated horizontal spread of *bacillus* spores and assessing the recurrent sterilization needs of culture-handling tools contaminated with hardy spores. **Proceedings National Academy of Sciences**, India, v. 83, n. 2. p.207-213, 2013.

_____ In vitro introduction of hardy alcohol resistant *bacillus* spp. through aseptically grown watermelon seedlings. **Advances in Microbiology**, New York, v.4, n.9, p. 504-510, 2014.

THOMAS, P.; GOPLAKRISHNAN, C.; KRISHNAREDDY, M. Soft rot inciting *Pectobacterium carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora*) is unlikely to be transmitted as a latent pathogen in micropropagated banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 3, p. 423-429, 2011.

THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, n. 4, p. 469-474, 2010.

THOMAS, P.; KUMARI, S.; SWARNA, G.K.; GOWDA, T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 3, p. 380-390, 2007.

THOMAS, P.; PRABHAKARA, B.S.; PITCHAIMUTHU, M. Cleansing the long-term micropropagated triploid watermelon cultures from covert bacteria and field testing the plants for clonal fidelity and fertility during the 7–10 year period in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, n.3, p. 317-329, 2006.

THOMAS, P.; PRAKASH, G.S. Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years in vitro. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 6, p. 603-607, 2004.

THOMAS, P.; REDDY, K.M. Microscopic elucidation of abundant endophytic bacteria colonizing the cell wall–plasma membrane peri-space in the shoot-tip tissue of banana. **AoB Plants**, Oxford, v. 5, n. plt011, p. 1-12, 2013.

THOMAS, P.; SOLY, T. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n.4, 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, n.1, p. 55-63, 2008.

THOMAS, P; SEKHAR, A.C. Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. **AoB Plants**, Oxford, v. 6, n. plu002, p. 1-12, 2014.