



Artigo de Revisão / Review Paper

Contaminação *versus* manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas

Contamination versus endophytic manifestation: implications in plant in vitro culture

Natalia Pimentel Esposito-Polesi^{1,2,3}

Resumo

A cultura de tecidos vegetais é imprescindível à propagação e multiplicação uniforme de plantas, à conservação de germoplasma, a programas de melhoramento e à transformação genética. Essa técnica tem exigido, cada vez mais, estudos que colaborem com o entendimento dos mecanismos envolvidos no crescimento dos microrganismos nos meios de cultivo, bem como as relações que eles estabelecem com a planta hospedeira. Dessa maneira, a presente revisão pretende esclarecer esses questionamentos e promover a distinção entre contaminação e manifestação endofítica que ocorrem no cultivo *in vitro* por diferentes causas. Tal distinção permite diminuir o pânico que se instala quando do seu aparecimento, além de auxiliar na adoção de medidas de prevenção e/ou controle desses eventos sem que haja descartes desnecessários de material de alto valor comercial e genético.

Palavras-chave: cultura de tecidos, descarte desnecessário, endófitos, microrganismos.

Abstract

Plant tissue culture is essential to the uniform propagation and multiplication of plants, to the germplasm conservation, to the genetic improvement programs and genetic transformation. This technique has been required more studies for the understanding of the mechanisms involved in microbial growth in culture media. As well as the relationships established with the host plant. Therefore, the present revision intends to clarify these questionings and to promote the distinction between contamination and endophytic manifestation which occur *in vitro* culture for different causes. This distinction allows to reduce the panic installed when the microorganisms appear, besides helping to adopt measures of prevention and /or control of these events avoiding unnecessary discards of material with high commercial and genetic value.

Key words: plant tissue culture, unnecessary discard, endophytes, microorganisms.

Introdução

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta amplamente utilizada como alternativa à propagação de espécies, por essa razão estudos e pesquisas nessa área nunca se esgotam. No entanto, têm-se verificado uma tendência de trabalhos com enfoque nos microrganismos dentro do cultivo *in vitro*. Isso se deve ao fato de que os microrganismos podem representar perdas significativas na micropropagação e por esse motivo sua simples

presença gera preocupação. Dessa maneira, inúmeros trabalhos atribuem a todo microrganismo, que cresce no meio de cultivo em qualquer momento do processo, o título de contaminação ou contaminante. Na sequência a esse surgimento o destino do material é, na grande maioria das vezes, o descarte, independentemente do tempo e dinheiro gastos, do valor genético e comercial do material. Porém, muitas pesquisas têm mostrado que nem todo microrganismo que aparece no frasco, oferece

¹ Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Depto. Ciências Biológicas, Av. Pádua Dias 11, C.P. 9, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

² ORCID: <<https://orcid.org/0000-0003-4868-8417>>

³ Autor para correspondência: esposito.polesi@gmail.com

perigo ou riscos ao desenvolvimento da espécie a ser micropropagada (Almeida *et al.* 2005; Thomas *et al.* 2006, 2008; Esposito-Polesi 2011; Esposito-Polesi *et al.* 2015, 2017).

Essas pesquisas tem trazido à discussão a urgência em se estudar e entender como os microrganismos se distinguem. O que já se sabe, em linhas gerais, é que existe uma diferença entre os microrganismos que podem causar perdas e danos e aqueles que tem efeito neutro e em muitos casos até benéfico dentro do cultivo *in vitro*. Dessa maneira, a atribuição arbitrária de contaminação a todo microrganismo que cresce no meio de cultivo tem representado gastos e perdas desnecessárias.

A contaminação normalmente ocorre em razão do crescimento de microrganismos que não foram eliminados por completo, durante a desinfestação do material vegetal ou por falhas de assepsia de ferramentas, equipamentos, meios de cultivo, operador, etc. (Panicker *et al.* 2007; Thomas & Aswath 2013). Já o aparecimento de microrganismos em decorrência de outros mecanismos que não se relacionam a erros durante o processo de cultivo *in vitro* tem sido denominado de manifestação endofítica (Almeida *et al.* 2009; Abreu-Tarazi *et al.* 2010; Esposito-Polesi *et al.* 2015, 2017).

Sendo assim, a presente revisão objetiva esclarecer de que maneira as manifestações podem ocorrer, como evitá-las e combatê-las, bem como os mecanismos ecológicos que justificam e apoiam a distinção entre “contaminação” e “manifestação endofítica”, fornecendo subsídios para o entendimento desses novos conceitos dentro da cultura de tecidos.

Cultivo *in vitro* de plantas

O cultivo *in vitro* de plantas é uma técnica de propagação assexuada que ocorre em condições assépticas e controladas, se baseia na totipotencialidade das células em gerar uma nova planta inteira e geneticamente idêntica à ancestral, a partir de um explante (célula ou qualquer fragmento de tecido ou órgão) (Torres *et al.* 2000; Palma *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2011). A micropropagação se destaca como o método mais utilizado dentro do cultivo *in vitro*, principalmente para multiplicação de espécies de difícil propagação, limpeza clonal, conservação e intercâmbio de germoplasma, além de programas de melhoramento genético (Torres *et al.* 1998; Lima & Moraes 2006; Carvalho *et al.* 2007; Palma *et al.* 2011).

A microrpropagação permite, ainda, 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 (Davey & Anthony 2010; Brondani *et al.* 2012), produzindo mudas livres de doenças, independentemente da época e condições meteorológicas (Lima & Moraes 2006; Chandra *et al.* 2010; Xiao *et al.* 2011). Apresenta como vantagens o aumento da taxa de multiplicação de clones valiosos, ganhos genéticos rápidos e maiores rendimentos de plantações, devido ao aumento da produtividade (Aggarwal *et al.* 2012; Navroski *et al.* 2014).

Adicionalmente, esta técnica tem se despontado como uma ferramenta eficaz para reverter a maturação de material adulto utilizado como fonte de explante (como é o caso de espécies arbóreas), restituindo as características de juvenilidade do material, num processo conhecido como rejuvenescimento/revigoramento, refletindo, dentre outras coisas, no potencial de enraizamento, perdido com a maturidade da espécie (Grattapaglia & Machado 1998; Dutra *et al.* 2009; Wendling *et al.* 2014).

O processo de micropropagação (cultivo dos explantes em meio nutritivo e sob condições assépticas) inclui a seleção, desinfestação, multiplicação dos propágulos em sucessivos subcultivos e a indução de raízes adventícias das partes aéreas em meio de enraizamento com subsequente aclimatização em ambiente *ex vitro* (Murashige 1974; Dutra *et al.* 2009). Inúmeros são os fatores que influenciam o sucesso desse processo, 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 um destes fatores pode culminar em alterações morfofisiológicas nocivas ao desenvolvimento da planta (Palma *et al.* 2011).

Neste contexto a contaminação microbiana se configura como um importante ponto de controle e cuidado, dentro da cultura de tecidos, sendo responsável por perdas consideráveis de material vegetal (Thomas *et al.* 2007, 2008; Thomas & Soly 2009; Thomas & Kumari 2010; Moreno-Vázquez *et al.* 2014; Thomas & Aswath 2014).

Contaminações microbianas

A contaminação microbiana pode ocorrer por diversos fatores, como por exemplo, o uso de explantes contaminados, ambientes laboratoriais limpos inadequadamente, técnicas de cultura de tecidos incorretas, ou ainda, uso de instrumentos contaminados durante a manipulação das culturas (Lata *et al.* 2006; Thomas *et al.* 2011; Thomas & Aswath 2014). Além disso, 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 (Dutra *et al.* 2009).

Os contaminantes, em sua grande maioria, crescem imediatamente após a introdução das plantas *in vitro*. Os fungos filamentosos e leveduras, por exemplo, raramente permanecem latentes *in vitro* (Danby *et al.* 1994; Leifert *et al.* 1994). Já no caso de bactérias, segundo Leifert & Cassells (2001), o crescimento diferencial pode indicar falhas em diferentes pontos críticos de controle 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.

Os danos causados pela contaminação microbiana são inúmeros pelo fato de competirem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, além de liberarem metabólitos tóxicos que podem ocasionar a morte da planta (Grattapaglia & Machado 1998; Pereira *et al.* 2003, 2014).

Para minimizar os efeitos desses contaminantes ou eliminá-los da superfície da planta, tem sido utilizado diferentes procedimentos de desinfestação durante a iniciação ou introdução dos explantes no cultivo *in vitro* (Fang & Hsu 2012). O método mais empregado, para este fim é a lavagem ou imersão do material vegetal em hipoclorito de sódio (0,1 a 0,5% de cloro ativo), e/ou em álcool (70 a 80%), pelo alto potencial germicida, além de um ótimo surfactante, facilitando a ação de outros produtos (Grattapaglia & Machado 1998; Dutra *et al.* 2009; Thomas 2012; Pereira *et al.* 2014).

A dificuldade de desinfestação dos explantes está intimamente relacionada à origem dessas plantas doadoras, ou seja, se o material for proveniente de árvores mantidas em ambientes protegidos a desinfestação será mais fácil e eficiente do que para os materiais cultivados em condições de campo (McComb & Bennett 1986; Dutra *et al.*

2009). Sendo assim, com o objetivo de minimizar as contaminações, 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 *et al.* 2006). Além disso, a manutenção nutricional e sanitária das matrizes fornecedoras dos explantes é imprescindível (Oliveira *et al.* 2013).

Contaminação versus manifestação

A contaminação tem sido muito confundida na literatura com manifestação endofítica. Para melhor compreender este conceito e a distinção desses eventos, faz-se necessário entender que as plantas, assim como os animais (extensivamente estudados), abrigam uma vasta gama de microrganismos que formam uma comunidade biológica complexa (microbioma) (Ryan *et al.* 2008; Pini *et al.* 2012; Jimtha *et al.* 2014). Dependendo da região da planta que coloniza, essa comunidade microbiana pode ser classificada como epifítica (quando habitam a superfícies de folhas ou hastes) ou endofítica (quando colonizam a endosfera, ou interior dos tecidos vegetais) (Ikeda *et al.* 2010; Pini *et al.* 2012).

Dessa forma, quando a comunidade epifítica cresce no meio de cultivo, o evento se denomina contaminação, devido, principalmente, à velocidade com que acontece (poucos dias após o estabelecimento *in vitro*) e aos danos que provoca, podendo indicar falhas no processo de iniciação das culturas (Panicker *et al.* 2007; Thomas & Aswath 2013). Entretanto, quando é a comunidade endofítica que cresce no meio de cultura esse evento se classifica como manifestação endofítica, por ser um evento de caráter mais restrito, menos danoso e, após, muito tempo de cultivo *in vitro* (Almeida *et al.* 2009; Abreu-Tarazi *et al.* 2010; Esposito-Polesi *et al.* 2015, 2017).

Portanto, a manifestação endofítica ocorre de maneira muito mais lenta e surge até anos após a introdução do material, em razão de alterações ambientais e estresses físicos e/ou químicos (Thomas & Soly 2009; Thomas & Kumari 2010). Em outras palavras, significa dizer que pequenas alterações nas condições ambientais (temperatura, pH, luminosidade, composição do meio, ou a transferência para a estufa) podem induzir um desequilíbrio da relação de convivência harmônica entre o endófito e seu hospedeiro e desencadear uma rápida manifestação endofítica no meio de cultura,

mesmo depois de muito tempo em multiplicação (Leifert & Cassells 2001; Thomas & Kumari 2010; Esposito-Polesi *et al.* 2015, 2017).

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/revigoramento de espécies adultas (Dutra *et al.* 2009; Brondani *et al.* 2012; Wendling *et al.* 2014), tem sido apontado como um promotor da manifestação endofítica (Esposito-Polesi *et al.* 2015).

A manifestação endofítica pode atingir níveis variados de extensão. Quando ocorre em níveis aceitáveis sem prejudicar o desenvolvimento da planta (a grande maioria das vezes) recomenda-se manter o subcultivo das microplantas, realizando uma limpeza ou troca de meio (Piotto 2013), de modo a não descartar o material desnecessariamente. Em recente estudo com *E. benthamii* cultivado *in vitro*, Piotto (2013) constatou que na maioria dos casos em que houve o crescimento repentino no meio de cultivo (após meses de subcultivos = manifestação endofítica), o desenvolvimento das microcepas ou não sofreu alteração ou foi beneficiado com incremento no número de brotações e massa seca.

Em outros casos, porém, quando ultrapassam o limite aceitável (Fig. 1) e prejudicam o desenvolvimento das espécies, tornando-se vitropatogênicas (produzindo sintomas visíveis nas plantas e/ou com crescimento visível e de grande extensão no meio de cultura) (Thomas

& Prakash 2004; Thomas 2006; Thomas *et al.* 2006, 2007; Moreno-Vázquez *et al.* 2014), o mais recomendável é o descarte do material, desde que não seja imprescindível mantê-lo. Nesse último exemplo, quando a manutenção é necessária, podem ser feitos tratamentos curativos adicionando ao meio de cultivo antibióticos (antibioticoterapia), como ampicilina sódica, agrimicina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, gentamicina e cefazolina, por períodos que variam de dias a meses (Pereira *et al.* 2003, 2014; Thomas 2011; Leone *et al.* 2016).

Sendo assim, a distinção entre os conceitos e mecanismos de “contaminação” e “manifestação endofítica” é fundamental para evitar prejuízos, além de se considerar que a interação entre os microrganismos endofíticos e as plantas não se finda no cultivo *in vitro*, como verificado em diversos trabalhos com microplantas consideradas axênicas, podendo trazer inúmeros benefícios nos processos morfogênicos. (Almeida *et al.* 2009; Dias *et al.* 2009; Abreu-Tarazi *et al.* 2010; Esposito-Polesi *et al.* 2013, 2015, 2017).

Microrganismos endofíticos

O entendimento sobre os microrganismos endofíticos ou endófitos, subsidia a compreensão de sua importância para a manutenção da vida vegetal, mesmo dentro do cultivo *in vitro*, e para quebrar o paradigma de que a existência de microrganismos na cultura de tecidos sempre será sinal de falhas no processo.

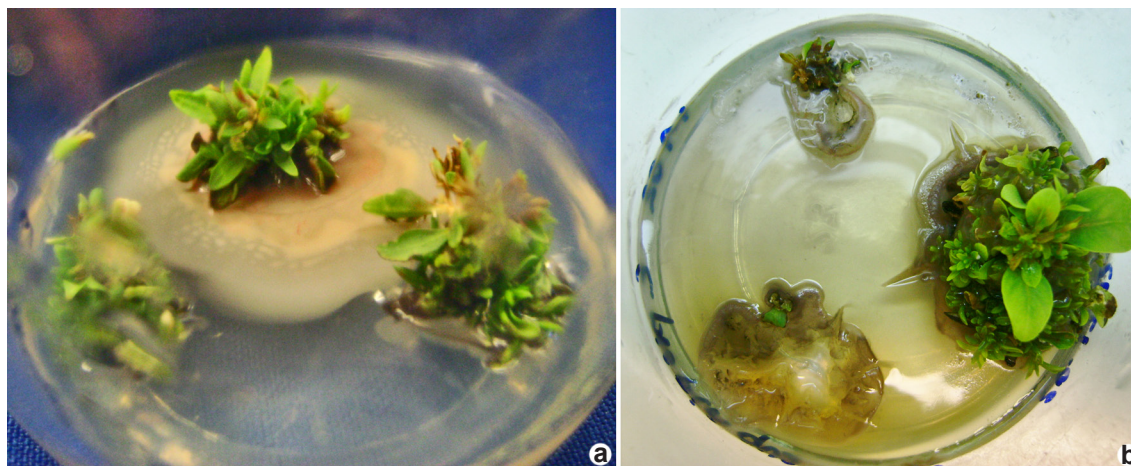


Figura 1 – Cultivo *in vitro* de *Eucalyptus propinqua* evidenciando a manifestação bacteriana endofítica acima do aceitável, prejudicando o desenvolvimento da microplanta e com crescimento intenso por sobre o meio de cultura.

Figure 1 – *Eucalyptus propinqua* *in vitro* cultivation with intense endophytic manifestation (a and b). This high bacterial growth above the culture medium harms the microplant development and multiplication.

Sendo assim, os 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 *et al.* 2008; Qin *et al.* 2011). 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 *et al.* 2006; Sheng *et al.* 2011). São transmitidos matematicamente (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 três décadas, perguntas básicas sobre a origem evolutiva, especiação e papel ecológico dos endofíticos permanecem sem resposta (Saikkonen *et al.* 2004). Sabe-se que dentre, aproximadamente, 300.000 espécies de plantas existentes na terra hospedam pelo menos um microrganismo endofítico (Saikkonen 2007; Guo *et al.* 2008), e que na maioria dos casos estabelece uma relação (endófito/planta hospedeira) de

simbiose e provavelmente mutualística (Guo *et al.* 2008; Ardanov *et al.* 2012). 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, os endófitos 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). Em se tratando das plantas hospedeiras os benefícios são inúmeros, a citar o controle biológico de plantas, promoção de crescimento e mecanismos de defesa, bem como, produção de metabólitos com interesse biotecnológico e farmacológico (Fig. 2) (Ryan *et al.* 2008; Sheng *et al.* 2011; Duan *et al.* 2013; Gagne-Bourgue *et al.* 2013; Ikeda *et al.* 2013).

Dentro do controle biológico de doenças o uso de microrganismos endofíticos tem

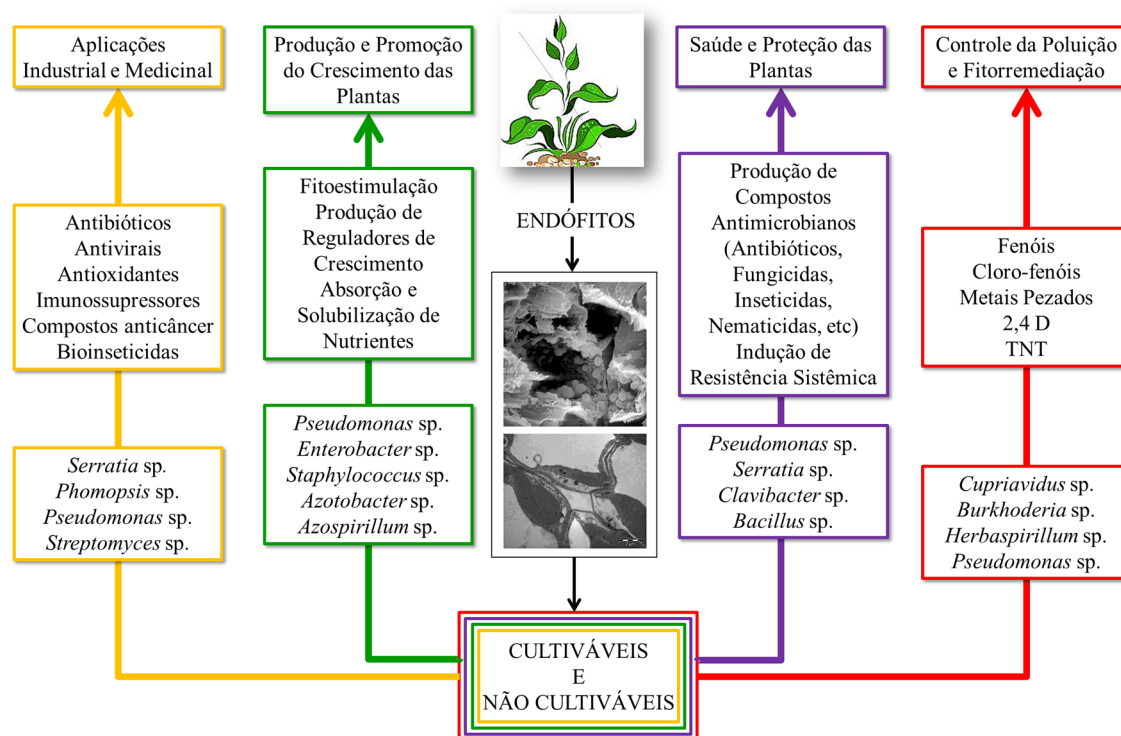


Figura 2 – Usos e aplicações dos endófitos nos mais variados setores. Adaptado de Ryan *et al.* (2008).

Figure 2 – Endophyte applications in the different productive sectors and human activity. Adapted from Ryan *et al.* (2008).

gerado bons resultados (Aravind *et al.* 2010). 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).

Estudos revelam que endófitos podem melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas, de forma direta ou indireta (van der 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 (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006; Hernandez *et al.* 2009; Jimtha *et al.* 2014). 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 (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006; Singh *et al.* 2008; van der Lelie *et al.* 2009).

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 os fotossistemas através de uma rede de sinais e melhorar a 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 (Guo *et al.* 2008; Qiu *et al.* 2010; Aly *et al.* 2011; Katoch *et al.* 2014).

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 (Newman & Reynolds 2005; Esposito-Polesi 2011; Li *et al.* 2011; Ma *et al.* 2011; Gutiérrez-Ginés *et al.* 2014).

Distribuição nas plantas (nichos de colonização)

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, conseqüentemente, a ideia geralmente aceita é 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 comprovada 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).

Dessa maneira, para que a colonização ocorra e o “endofitismo” se estabeleça, o microrganismo deve ser capaz de: (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).

Diversos estudos 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, ou por meio de pêlos radiculares ou em junções epidérmicas. Por essa razão acredita-se que as maiores densidades de endófitos se localizam na rizosfera e diminuem progressivamente a partir das raízes passando pelo caule chegando até as folhas (densidade é menor) (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006; Compant *et al.* 2011). Uma vez que as exigências devem ser cada vez maiores e devidamente atendidas pelos endófitos.

Uma vez no interior das raízes, os endófitos se espalham sistematicamente, na planta (raízes, caules, folhas, flores, sementes, frutos, tubérculos e também dentro de nódulos de leguminosas)

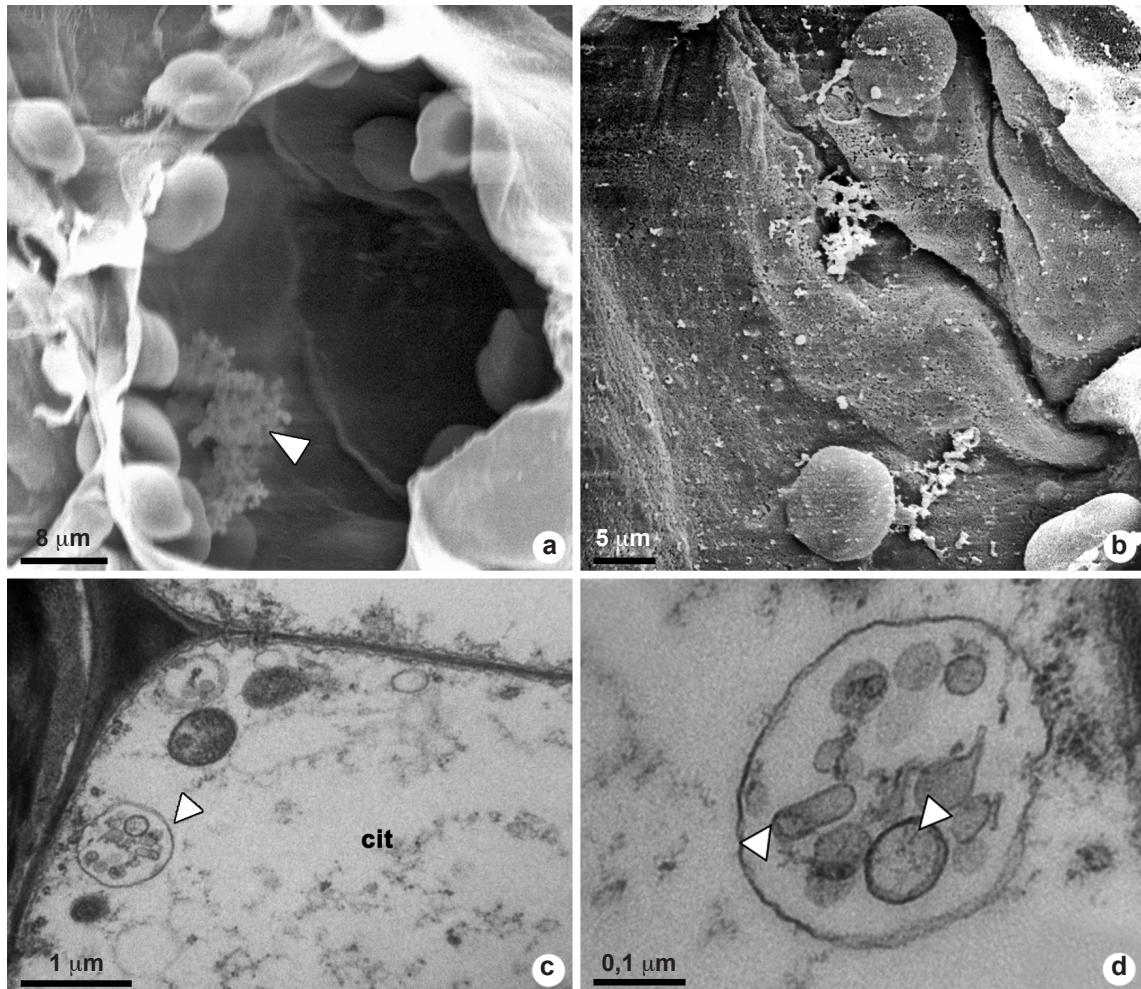


Figura 3 – a-d. Fotomicrografias em microscopia eletrônica de varredura em a-b e de transmissão em c-d, do terço médio da lâmina foliar de microplantas assintomáticas de violeta (*Viola odorata*). Com destaque às bactérias (setas brancas) presentes nas células parenquimáticas do mesofilo e da bainha do feixe vascular – a,b. microscopia eletrônica de varredura; c,d. microscopia eletrônica de transmissão (cit = citoplasma de células parenquimáticas, espaço intracelular).

Figure 3 – Electron micrographs from leaf blades of asymptomatic violet microplants (*Viola odorata*) – a-b. scanning electron microscopy; c-d. transmission electron microscopy (cit = cytoplasm of parenchymal cells, intracellular space). With emphasis on bacteria (white arrows) present in the parenchymal cells of the mesophyll and the vascular bundle sheath

pela migração através do sistema vascular ou do apoplasto. (McCully 2001; Rosenblueth & Martínez-Romero 2006; van der Lelie *et al.* 2009; Piccolo *et al.* 2010; Compant *et al.* 2011; Qin *et al.* 2011), colonizando os espaços inter e intracelulares (Fig. 3) de diferentes tecidos como parênquima, epiderme, bainha do feixe vascular, xilema e floema (Almeida *et al.* 2009; Piccolo *et al.* 2010; Sheng *et al.* 2011; Thomas & Reddy 2013; Esposito-Polesi *et al.* 2017).

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 *et al.* 1992; Freckleton & Jetz 2009). 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). As populações endofíticas também podem ser influenciadas pela idade da planta, estágio de desenvolvimento, status fisiológico, práticas agrícolas, além de condições ambientais como temperatura, oferta de água e nutrientes (Hardoim *et al.* 2008; Barros *et al.* 2010; Compant *et al.* 2010; Islam *et al.* 2010; Davitt *et al.* 2011; Ardanov *et al.* 2012; Gagne-Bourgue *et al.* 2013).

A arquitetura da planta, estrutura e distribuição etária da folhagem, topografia da superfície foliar, nutrientes presentes na superfície das folhas e o microclima estabelecido (Saikkonen 2007; Mukhtar *et al.* 2010), bem como a presença de patógenos, ou ainda o resultado de processos estocásticos não explicados, podem também interferir na estrutura da comunidade endofítica (Liu *et al.* 2012, 2013; Hollants *et al.* 2013; Mejía *et al.* 2014).

Cabe salientar, porém, que independentemente dos fatores externos aos endófitos, 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 (Hardoim *et al.* 2008). 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 *et al.* 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 (Moricca & Ragazzi 2008; Mejía *et al.* 2014; Moricca *et al.* 2012). Este processo de adaptação leva à restrição de nicho, e pode favorecer a convivência duradoura de espécies de endófitos no mesmo hospedeiro (Moricca *et al.* 2012). Por essa razão os microrganismos endofíticos obrigatórios estão filogeneticamente estruturados e 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).

A coevolução, também, faz com que mesmo que os endófitos tenham a disposição incontáveis recursos e hospedeiros, fiquem restritos a um seletivo grupo de espécies vegetais, 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 *et al.* 2012; Sukumar *et al.* 2013). 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 (Errasti *et al.* 2010; Ardanov *et al.* 2012; Prasanna *et al.* 2012; Bodenhausen *et al.* 2013). Devido, primeiramente, às diferenças existentes na estrutura interna dos órgãos da planta e os diversos tecidos do mesmo órgão, e, posteriormente, devido à constituição química do tecido vegetal e ao estado nutricional oferecido para que os microrganismos possam crescer. Tais condições estabelecem uma especificidade desses microrganismos em sobreviver dentro de um determinado substrato (tecido diferente, textura e composição química) (Izumi *et al.* 2008; Gong & Guo 2009; Mejía *et al.* 2014).

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, 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.

Endófitos e a manifestação

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) e com relações ecológicas mais diversas e complexas (Hardoim *et al.* 2008; Barros *et al.*

2010; Compant *et al.* 2010; Islam *et al.* 2010; Davitt *et al.* 2011; Ardanov *et al.* 2012; Gagne-Bourgue *et al.* 2013).

Mas como essas populações se comportam no ambiente *in vitro*, nos quais as condições são rigorosamente controladas (nutrição, fonte de carbono, luz, água, temperatura e pH) e os aspectos macroambientais são desconsiderados (estresse hídrico, balanço nutricional, por exemplo) tem sido o objeto de estudo de muitas pesquisas. A determinação dos fatores que induzem a manifestação endofítica, apesar de bem teorizada, não está totalmente elucidada havendo a necessidade de mais estudos que avaliem como ela se inicia, e qual momento certo de atuar para que haja uma convivência “amigável” sem descartes desnecessários, ou em que circunstâncias esse convívio passa a ser prejudicial à planta, levando à eliminação do material.

No entanto, o que já se sabe é que nesses ambientes 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). Sendo assim, quando o meio de cultura é modificado, por exemplo, altera-se a composição, balanço hormonal, estimula-se uma maior exsudação por parte das plantas, resultando no crescimento endofítico no meio de cultura. Do mesmo modo, a alteração na temperatura pode promover tanto o crescimento microbiano pelo estabelecimento de uma temperatura ótima ao desenvolvimento, quanto pelo aumento da exsudação, por parte da planta (Leifert & Cassells 2001).

Outro aspecto importante a ser ressaltado é o fato de que as pressões ocasionadas por um sistema de cultivo tão restritivo têm gerado uma redução em número de espécies, isto significa que as comunidades endofíticas são bem menores (em diversidade) nas microplantas, quando comparadas às plantas do campo (Pirttilä *et al.* 2008; Almeida *et al.* 2009; Dias *et al.* 2009; Abreu-Tarazi *et al.* 2010; Esposito-Polesi *et al.* 2015, 2017).

Ulrich *et al.* (2008) ao compararem a comunidade bacteriana endofítica de plantas de *Populus sp.* oriundas de campo e de micropropagação observaram redução no número de espécies quando o material do campo foi introduzido *in vitro*. Segundo Fang & 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 vegetal pode gerar um ambiente *in vitro* único e exclusivo, de modo a permitir a colonização de espécies mais adaptadas. Dessa maneira, como mencionado anteriormente por Hollants *et al.* (2013), majoritariamente são os endófitos obrigatórios que conseguem resistir às alterações microambientais, devido a uma história ecológica evolutiva e, por essa razão, dificilmente tenderão a crescer fora da planta (isto é, no meio de cultivo), já a minoria de facultativos poderá, eventualmente, se manifestar no meio de cultura.

Esse fenômeno foi recentemente observado por Esposito-Polesi *et al.* (2015), no qual ao utilizar diferentes fontes de explantes oriundos de uma mesma planta matriz de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage observaram um comportamento distinto dessas fontes, no tocante à manifestação endofítica. Esses mesmos autores afirmaram por meio de análises moleculares que as populações endofíticas mais variáveis em estrutura ao longo dos subcultivos proporcionaram maiores taxas de manifestação, em contrapartida, as populações mais intimamente relacionadas e pouco variáveis não manifestaram.

Neste contexto, aliado a capacidade de estabelecimento e multiplicação *in vitro*, a escolha de um tipo de explante acarreta, invariavelmente, na “escolha” de uma comunidade endofítica diversa em estrutura de táxons, em decorrência do local de onde foi retirado (copa, base, ramos jovens ou adultos, gemas, rizomas, etc.) e por essa razão, dependendo das relações ecológicas que estabelece com seus endófitos, o explante será mais ou menos propenso a induzir manifestações no meio de cultura (Esposito-Polesi *et al.* 2015).

Benefícios dos endófitos no cultivo *in vitro*

Segundo Thomas *et al.* (2007) o cultivo *in vitro* livre de patógenos e seguros do ponto de vista fitossanitário é uma exigência a ser respeitada para essa técnica, o que não significa um cultivo asséptico ou estéril (plantas axênicas). Estudos recentes têm combatido e refutado a existência de plantas axênicas, uma vez que todas elas abrigam endófitos em seu interior (onipresentes) sem lhes causar danos, dentre esses trabalhos podemos citar os com microplantas de crisântemo, uva, mamão, melão, banana, abacaxi, orquídea, eucalipto, morango, entre outros (Almeida *et al.* 2005, 2009; Thomas *et al.* 2007, 2008; Dias *et al.* 2009; Abreu-Tarazi *et al.* 2010; Esposito-Polesi 2011; Esposito-Polesi *et al.* 2013, 2015, 2017).

Dessa 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). A presença de tais microrganismos pode não representar problemas reais à cultura, e ainda ser positivo sua manutenção 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).

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, 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 (Almeida *et al.* 2005, 2009; Dias *et al.* 2009; Thomas & Soly 2009; Abreu-Tarazi *et al.* 2010). 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 (Trotsenko *et al.* 2001; Pirttilä *et al.* 2008). 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.* 2002, 2004, 2008).

Conclusão

Com base no exposto, fica claro que ainda há uma grande carência de estudos mais aprofundados a respeito da relação endófito e planta hospedeira. No cultivo *in vitro* essa necessidade é ainda maior. De qualquer modo, muito já foi feito, grupos de pesquisas nacionais e internacionais, buscam desvendar os mistérios nos mecanismos que desencadeiam essa manifestação. Além disso, já se sabe que as relações serão mais sólidas e menos propensas a desenvolver problemas na micropropagação (manifestações) quanto maior for a coevolução entre os grupos e, conseqüentemente, maior a obrigatoriedade de convivência (interdependência = endossimbiontes). E quanto mais facultativo o microrganismo for, mais sofrerá às pressões exercidas pelo sistema restrito de cultivo *in vitro*, levando ao crescimento no meio de cultura. Antever que o tempo de cultivo, o tipo de explante, mudanças abruptas nas condições de cultivo (como luz, temperatura, pH, por vezes ocasionada por quedas de energia nos ambientes onde essas plantas estão acondicionadas), uso indiscriminado de agentes químicos de controle (desinfestantes e antibióticos) e de reguladores de crescimento, podem induzir a manifestação repentina desses microrganismos, servirá como uma ferramenta essencial para evitar que esse evento ocorra e que o material seja descartado. Entretanto, se mesmo assim a manifestação ocorrer, ela poderá servir como um indicador de desequilíbrio, tornando-se um ponto de tomada de decisões no ajuste do protocolo de cultivo, na escolha do melhor método de controle e contenção desse crescimento (quando for requerida a manutenção *in vitro* do material) e, por fim, no descarte crítico, devidamente avaliado. Essa quebra de paradigma, do descarte imediato e desnecessário, retira do pesquisador a responsabilidade sobre o evento e lhe permite tempo para ponderar a melhor alternativa de acordo com o objetivo e o material cultivado *in vitro*.

Agradecimentos

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), ao Departamento de Ciências Biológicas (LCB/ESALQ/USP) e ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas com especial distinção ao professor Doutor Márcilio de Almeida e à Doutora Cristina Vieira de Almeida pelo apoio técnico/científico prestados ao longo do desenvolvimento das pesquisas.

Referências

- Abreu-Tarazi MF, Navarrete AA, Andreote FD, Almeida CV, Tsai SM & Almeida M (2010) Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 555-560.
- Aggarwal D, Kumar A, Sharma J & Reddy MS (2012) Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 48: 521-529.
- Almeida CV, Andreote FD, Yara R, Tanaka FAO, Azevedo JL & Almeida M (2009) Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1757-1764.
- Almeida CV, Yara R & Almeida M (2005) Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 467-470.
- Aly AH, Debbab A, Clements C, Edrada-Ebel R, Orlikova B, Diederich M, Wray V, Lin W & Proksch P (2011) NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19: 414-421.
- Andreote FD, Rocha UN, Araújo WL, Azevedo JL & van Overbeek LS (2010) Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek* 97: 389-399.
- Aravind R, Eapen SJ, Kumar A, Dinu A & Ramana KV (2010) 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* 29: 318-324.
- Ardanov P, Sessitsch A, Haggman H, Kozyrovska N & Pirttilä AM (2012) *Methylobacterium*-induced Endophyte Community Changes Correspond with Protection of Plants against Pathogen Attack. *Plos One* 7: 1-8 (e46802).
- Bandara WMMS, Seneviratne G & Kulasoorya SA (2006) Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *Journal of Biosciences* 31: 645-650.
- Barros IA, Araújo WL & Azevedo JL (2010) The effect of different growth regimes on the endophytic bacterial communities of the fern, *Dicksonia sellowiana* hook (Dicksoniaceae). *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 956-965.
- Bodenhausen N, Horton MW & Bergelson J (2013) Bacterial Communities Associated with the Leaves and the Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 8: 1-9 (e56329).
- Borcard D, Legendre P & Drapeau P (1992) Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology* 73: 1045-1055.
- Brondani GE, Ondas HWD, Baccarin FJB, Gonçalves AN & Almeida M (2012) Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 48: 478-487.
- Burlak OP, De Vera JP, Yatsenko V & Kozyrovska N (2013) O. Putative mechanisms of bacterial effects on plant photosystem under stress. *Biopolymers and Cell* 29: 3-10.
- Carvalho DC, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ & Carvalho CR (2007) Regeneração de plantas após fusão de protoplastos de tangelo ‘Page’ e toranja ‘Lau Tau’. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29: 329-332.
- Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V & Chandra R (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32: 1199-1205.
- Chen Y, Gao X, Chen Y, Qin H, Huang L & Han Q (2014) Inhibitory efficacy of endophytic *Bacillus subtilis* EDR4 against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed. *Biological Control* 78: 67-76.
- Compant S, Clément C & Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 669-678.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H & Sessitsch A (2011) Endophytes of Grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology* 62: 188-197.
- Cook D, Gardner DR, Ralphs MH, Pfister JA, Welch KD & Green BT (2009) Swainsonine concentrations and endophyte amounts of *Undifilum oxytropis* in different plant parts of *Oxytropis sericea*. *Journal of Chemical Ecology* 35: 1272-1278.
- Cook D, Shi L, Gardner DR, Pfister JA, Grum D, Welch KD & Ralphs MH (2012) Influence of Phenological Stage on Swainsonine and Endophyte Concentrations in *Oxytropis sericea*. *Journal of Chemical Ecology* 38: 195-203.
- Crawford JM & Clardy J (2011) Bacterial symbionts and natural products. *Chemical Communications* 47: 7559-7566.
- Danby S, Berger F, Howitt DJ, Wilson AR, Dawson S & Leifert C (1994) Fungal contaminants of Primula, Coffea, Musa and Iris tissue cultures. *In: Lumsden PJ, Nicholas JR & Davies WJ (eds.) Physiology, growth and development of plants in culture.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 397-403.
- Davey MR & Anthony P (2010) Plant cell culture: essential methods. Wiley, Chichester. 358p.
- Davitt AJ, Chen C & Rudgers JA (2011) 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* 71: 137-145.
- Dias ACF, Costa FEC, Andreote FD, Lacava PT, Teixeira MA, Assumpção LC, Araújo WL, Azevedo JL & Melo IS (2009) Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 189-195.
- Donato VMTS, Andrade AG, Takaki GMC, Mariano RLR & Maciel GA (2005) Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. *Ciência e Agrotecnologia* 29: 134-141.
- Duan JL, Li XJ, Gao JM, Wang DS, Yan Y & Xue QH (2013) Isolation and identification of endophytic bacteria from root tissues of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and determination of their bioactivities. *Annals of Microbiology* 63: 1501-1512.
- Dutra LF, Wendling I & Brondani GE (2009) A micropropagação de eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira* 58: 49-59.
- Errasti A, Carmarán CC & Victoria-Novas M (2010) Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Diversity* 41: 29-40.
- Esposito-Polesi NP, Almeida CV & Almeida M (2013) Avaliação histoquímica de espécies de microplantas hospedeiras de endófitos. *Revista Biociências* 19: 61-71.
- Esposito-Polesi NP (2011) Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. *Revista Brasileira de Biociências* 9: 533-541.
- Esposito-Polesi NP, Abreu-Tarazi MF, Almeida CV, Tsai SM & Almeida M (2017) Investigation of endophytic bacterial community in supposedly axenic cultures of pineapple and orchids with evidence on abundant intracellular bacteria. *Current Microbiology* 74: 103-113.
- Esposito-Polesi NP, Andrade PAM, Almeida CV, Andreote FD & Almeida M (2015) Endophytic bacterial communities associated with two explant sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31: 1737-1746.
- Fang JY & Hsu YR (2012) Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micropropagated *Aglaonema* cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 110: 53-62.
- Freckleton RP & Jetz W (2009) Space versus phylogeny: disentangling phylogenetic and spatial signals in comparative data. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 21-30.
- Gagne-Bourgue F, Aliferis KA, Seguin P, Rani M, Samson R & Jabaji S (2013) Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *Journal of Applied Microbiology* 114: 836-853.
- Gong LJ & Guo SX (2009) Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology* 8: 731-736.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, Brasília. Pp. 183-260.
- Guo B, Wang Y, Sun X & Tang K (2008) Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44: 136-142.
- Gutiérrez-Ginés MJ, Hernández AJ, Pérez-Leblic MI, Pastor J & Vangronsveld J (2014) Phytoremediation of soils co-contaminated by organic compounds and heavy metals: bioassays with *Lupinus luteus* L. and associated endophytic bacteria. *Journal of Environmental Management* 143: 197-207.
- Hamilton CE, Gundel PE, Helander M & Saikkonen K (2012) Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Diversity* 54: 1-10.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS & Van Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16: 463-471.
- Hernandez JP, Bashana LE, Rodriguez DJ, Rodriguez Y & Bashana Y (2009) 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* 45: 88-93.
- Hollants J, Leliaert F, Verbruggen H, Willems A & De Clerck O (2013) Permanent residents or temporary lodgers: characterizing intracellular bacterial communities in the siphonous green alga *Bryopsis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 80: 1-8.
- Ikeda AC, Bassani LL, Adamoski D, Stringari D, Cordeiro VK, Glienke C, Steffens MBR, Hungria M & Galli-Terasawa LV (2013) Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microbial Ecology* 65: 154-160.
- Ikeda S, Okubo T, Anda M, Nakashita H, Yasuda M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Eda S, Momiyama A, Terasawa K, Mitsui H & Minamisawa K (2010) Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant and Cell Physiology* 51: 1398-1410.
- Islam SMA, Math RK, Kim JM, Yun MG, Cho JJ, Kim EJ, Lee YH & Yun HD (2010) Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their

- antimicrobial activities. *Current Microbiology* 61: 346-356.
- Izumi H, Anderson IC, Killham K & Moore ER (2008) Diversity of predominant endophytic bacteria in European deciduous and coniferous trees. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 173-179.
- Jimtha JC, Smitha PV, Anisha C, Deepthi T, Meekha G, Radhakrishnan EK, Gayatri GP & Remakanthan A (2014) Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118: 57-66.
- Katoch M, Salgotra A & Singh G (2014) Endophytic fungi found in association with *Bacopa monnieri* as potential producers of industrial enzymes and antimicrobial bioactive compounds. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57: 714-722.
- Lata H, Li XC, Silva B, Moraes RM & Halda-Alija L (2006) Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated Echinaceae plants using 16S rRNA sequencing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 353-359.
- Leifert C & Cassells AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37: 133-138.
- Leifert C, Morris CE & Waites WM (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139-183.
- Leone GF, Almeida CV, Abreu-Tarazi MF, Batagin-Piotto KD, Artioli-Coelho FA & Almeida M (2016) Antibioticoterapia em microplantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus*). *Ciência Rural* 46: 89-94.
- Li T, Liu MJ, Zhang XT, Zhang HB, Sha T & Zhao ZW (2011) 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* 409: 1069-1074.
- Lima JD & Moraes WS (2006) Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 36: 13-19.
- Liu Y, Zuo S, Zou YY, Wang JH & Song W (2012) Investigation on diversity and population succession dynamics of indigenous bacteria of the maize spermosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 391-396.
- Liu Y, Zuo S, Zou YY, Wang JH & Song W (2013) 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* 63: 71-79.
- Londe LN, Sousa CS, Vieira CU, Bonetti AM & Kerr WE (2007) Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). *Journal of Biosciences* 23: 94-100.
- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M & Freitas H (2011) Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* 29: 248-258.
- McComb JA & Bennett IJ (1986) Eucalypts (*Eucalyptus* spp.). *In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. Trees 1.* Springer-Verlag, Berlin. Pp. 340-362.
- McCully, ME (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Functional Plant Biology* 28: 983-990.
- Mejía LC, Herre EA, Sparks JP, Winter K, García MN, van Bael SA, Stitt J, Shi Z, Zhang Y, Gultinan MJ & Maximova SN (2014) Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-16.
- Moreno-Vázquez S, Larrañaga N, Uberhuaga EC, Braga EJB & Pérez-Ruiz C (2014) 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* 119: 533-541.
- Moricca S & Ragazzi A (2008) Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* 98: 380-386.
- Moricca S, Ginetti B & Ragazzi A (2012) Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 587-598.
- Mukhtar I, Mushtaq S, Ali A & Khokhar I (2010) Epiphytic and endophytic phyllosphere microflora of *Cassitha filiformis* L. and its hosts. *Ecoprint* 17: 1-8.
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- Navroski MC, Reiniger LRS, Araújo MM, Curti AR & Pereira MO (2014) *In vitro* establishment and multiplication of genotypes of *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Cerne* 20: 139-146.
- Newman L & Reynolds C (2005) Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology* 23: 6-8.
- Oliveira LS, Dias PC & Brondani GE (2013) Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira* 33: 439-453.
- Palma D, Schuelter AR, Stefanello S & Fortes AMT (2011) Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. *Current Agricultural Science and Technology* 17: 174-184.
- Panicker B, Thomas P, Janakiram T, Venugopalan R & Narayanappa SB (2007) Influence of cytokinin

- levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum “Arka Swarna” and activation of endophytic bacteria. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* - Plant 43: 614-622.
- Pereira GA, Boliari AC & Furlani Júnior E (2014) Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira ‘*Thap maeo*’. *Revista Ceres* 61: 299-305.
- Pereira JES, Mattos MLT & Fortes GDL (2003) Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 827-834.
- Piccolo SL, Ferraro V, Alfonso A, Settanni L, Ercolini D, Burruano S & Moschetti G (2010) Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. *Annals of Microbiology* 60: 161-167.
- Pileggi SAV (2006) Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 125f.
- Pini F, Frascella A, Santopolo L, Bazzicalupo M, Biondi EG, Scotti C & Mengoni A (2012) Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. *BMC Microbiology* 12: 1-10.
- Pini F, Galardini M, Bazzicalupo M & Mengoni A (2011) Plant-bacteria association and symbiosis: are there common genomic traits in Alphaproteobacteria? *Genes* 2: 1017-1032.
- Piotto KDB (2013) Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 157f.
- Pirttilä AM, Joensuu P, Pospiech H, Jalonen J & Hohtola A (2004) Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiol Plant* 121: 305-312.
- Pirttilä AM, Laukkanen H & Hohtola A (2002) Chitinase production in pine callus (*Pinus sylvestris* L.): a defense reaction against endophytes? *Planta* 214: 848-852.
- Pirttilä AM, Podolich O, Koskimäki JJ, Hohtola E & Hohtola A (2008) 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* 95: 47-55.
- Pirttilä AM, Pospiech H, Laukkane H, Myllylä R & Hohtola A (2005) Seasonal variations in location and population structure of endophytes in buds of Scots pine. *Tree Physiology* 25: 289-297.
- Prasanna R, Nain L, Pandey AK & Saxena AK (2012) Microbial diversity and multidimensional interactions in the rice ecosystem. *Archives of Agronomy and Soil Science* 58: 723-744.
- Qin S, Xing K, Jiang JH, Xu LH & Li WJ (2011) Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 457-473.
- Qiu M, Xie RS, Shi Y, Zhang H & Chen HM (2010) Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Annals of Microbiology* 60: 143-150.
- Rosenblueth M & Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 827-837.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ & Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Ecology* 278: 1-9.
- Saikkonen K (2007) Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews* 21: 67-74.
- Saikkonen K, Wali P, Helander M & Faeth SH (2004) Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* 9: 275-280.
- Sheng HM, Gao HS, Xue LG, Ding S, Song CL, Feng HY & An LZ (2011) Analysis of the composition and characteristics of culturable endophytic bacteria within subnival plants of the tianshan mountains, northwestern China. *Current Microbiology* 62: 923-932.
- Singh N, Pandey P, Dubey RC & Maheshwari DK (2008) 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* 24: 1669-1679.
- Sukumar P, Legue V, Vayssieres A, Martin F, Tuskan GA & Kalluri UC (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell and Environment* 36: 909-919.
- Thomas P & Aswath C (2013) 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* 83: 207-213.
- Thomas P & Aswath C (2014) *In vitro* introduction of hardy alcohol resistant *bacillus* spp. through aseptically grown watermelon seedlings. *Advances in Microbiology* 4: 504-510.
- Thomas P & Kumari S (2010) Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. *Scientia Horticulturae* 124: 469-474.
- Thomas P & Prakash GS (2004) Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* - Plant 40: 603-607.
- Thomas P & Reddy KM (2013) Microscopic elucidation of abundant endophytic bacteria colonizing the cell

- wall-plasma membrane peri-space in the shoot-tip tissue of banana. *AoB Plants* 5: plt011.
- Thomas P & Soly T (2009) Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host. *Microbial Ecology* 58: 952-964.
- Thomas P (2006) 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* 87: 155-165.
- Thomas P (2011) Intense association of non-culturable endophytic bacteria with antibiotic-cleansed *in vitro* watermelon and their activation in degenerating cultures. *Plant Cell Reports* 30: 2313-2325.
- Thomas P (2012) Long-term survival of *Bacillus* spores in alcohol and identification of 90% ethanol as relatively more spori/bactericidal. *Current Microbiology* 64: 130-139.
- Thomas P, Goplakrishnan C & Krishnareddy M (2011) 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* 105: 423-429.
- Thomas P, Kumari S, Swarna GK & Gowda TKS (2007) Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and host-endophyte interaction *in vitro* and *in vivo*. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 380-390.
- Thomas P, Prabhakara BS & Pitchaimuthu M (2006) 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* 85: 317-329.
- Thomas P, Swarna GK, Roy PK & Patil P (2008) 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* 93: 55-63.
- Torres AC, Caldas LS & Buso JA (1998) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, Brasília. 509p.
- Torres AC, Ferreira AT, Sá FG, Buso JA, Caldas LS, Nascimento AS, Brígido M & Romano E (2000) Glossário de biotecnologia vegetais. EMBRAPA Hortaliças, Brasília. 128p.
- Trotsenko YA, Ivanova EG & Doronina NV (2001) Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. *Microbiology* 70: 623-632.
- Ulrich K, Stauber T & Ewald D (2008) *Paenibacillus* - a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93: 347-351.
- van der Lelie D, Taghavi S, Monchy S, Schwender J, Miller L, Ferrieri R, Rogers A, Wu X, Zhu W, Weyens N, Vangronsveld J & Newman L (2009) Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. *Critical Reviews in Plant Sciences* 28: 346-358.
- Wendling I, Dutra LF & Grossi F (2006) Produção de mudas de espécies lenhosas. Documentos, 130. EMBRAPA Florestas, Colombo. 54p.
- Wendling I, Trueman SJ & Xavier A (2014) Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests* 45: 473-486.
- Xiao Y, Niu G & Kozai T (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 149-158.