

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**CAMILA HEUSER**

**Identificação molecular de comunidades microbianas presentes em  
plântulas cultivadas sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro***

**Piracicaba  
2013**



**CAMILA HEUSER**

**Identificação molecular de comunidades microbianas presentes em  
plântulas cultivadas sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro***

**Dissertação apresentada ao Centro de  
Energia Nuclear na Agricultura da  
Universidade de São Paulo, para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na  
Agricultura e no Ambiente**

**Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pinheiro  
Martinelli**

**Piracicaba**

**2013**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Heuser, Camila

Identificação molecular de comunidades microbianas presentes em plântulas cultivadas sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro* / Camila Heuser; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli. - Piracicaba, 2013.

115 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bactérias 2. Bioinformática 3. Biologia molecular 4. Bromeliaceae  
5. Cana-de-açúcar 6. Micropropagação vegetal 7. Sequência do DNA I. Título

CDU 631.532/.535 : 561.23

### *Dedico...*

*Aos meus pais, Telmo e Teresinha, pelo amor, formação do meu caráter e educação.*

*Ao meu tio Egídio pelo carinho, paciência e ensinamentos.*

*Às minhas irmãs, Márcia e Sheila, por abrirem meu caminho, pelo apoio e por acreditarem em mim.*

*À minha segunda família: todas com as quais convivi em minha república (Mansão Forfé) durante esses anos e que fizeram de cada dia que passamos juntas uma obra-prima.*

*Ofereço*



## *Agradecimentos*

A Deus pela graça da vida;

Aos meus pais, Telmo e Teresinha, Tio Egídio pelo amor, dedicação, exemplo de perseverança e de caráter, pelos valores passados, educação, compreensão, apoio, paciência e tantas vezes, pelo pulso firme. Às minhas irmãs, Márcia e Sheila, por me passarem confiança e coragem, por mostrarem as pedras em meu caminho, pelo cuidado e carinho sempre;

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Pinheiro Martinelli, pela oportunidade de realização deste curso, pela confiança em mim depositada. À coorientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Siu Mui Tsai, pela colaboração e auxílio na elaboração e condução deste projeto e por me acolher em seu laboratório. Ambas, pela compreensão, ensinamentos repassados, atenção, discussões, incentivo, ideias e investimentos. Especialmente pelo reconhecimento e motivação e por contribuírem enormemente para a minha formação como pesquisadora, me ensinando sempre a olhar à frente e sem esquecer-se de ter os pés no chão;

Ao CNPq por financiar os primeiros seis meses do meu mestrado (Processo 130177/2011-3) e à FAPESP pelos 18 meses restantes (Processo 2011/05080-7);

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela estrutura fornecida para a condução deste trabalho. Ao programa em Ciências onde cursei o mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente. Um especial agradecimento à bibliotecária Marília pela revisão desta dissertação e seriedade em seu trabalho. A todos os funcionários seriamente comprometidos no funcionamento desta casa. Especialmente à equipe do apoio acadêmico e pós-graduação do CENA: Daiane, Fábio, Neuda e Sônia;

Aos colegas do laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas: “C-gredo”, Fernando, Luana, Priscilla, Renan e Sandra por todas as discussões, trocas de experiência e aprendizados (profissionais e pessoais), além dos momentos de distração no nosso dia-a-dia. Em especial à Karina, pela amizade e companheirismo, e ao Hilo pela sua motivação contagiante, apoio e exemplo, bem como à técnica em microscopia, Mônica, pelo companheirismo e por sua dedicação ao laboratório. E à Suzineide pela prestatividade e apoio;

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia Vegetal: Bianca, Carol, Eveline, Fabiana, Isabela, Leonardo, Perla, e especialmente aos técnicos Marcelo e Renatinha, por repassarem seus conhecimentos práticos e teóricos, pela dedicação ao trabalho, motivação, paciência e compreensão das dificuldades por mim encontradas;

A todos os orientados da Prof<sup>a</sup> Tsai e “agregados” do Laboratório de Biologia Celular e Molecular pela convivência e troca de experiências: Acácio, Aline, Andressa, Bia, Bruna, Caio, Carol, Clóvis, Dennis, Enéas, Fernanda, Gustavo, Jane, João, Letícia, Lucas Mendes, Lucas Palma, Maju, Marcela, Marília, Marina, Milena, Naissa, Patrícia, Paula e Rosineide. Especialmente às pós-doutorandas Fabi e Dani pela orientação sobre as técnicas e disponibilidade para tirar minhas dúvidas. Aos técnicos do laboratório Fábio e Wagner pelo suporte. E à Ludmila pelo apoio prestado e pelos momentos de diversão;

Ao técnico do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Elias, pela competência em seu trabalho, pela dedicação e boa vontade em repassar seus ensinamentos práticos e teóricos. Por me mostrar o caminho nos momentos em que eu não via mais saída, por me acompanhar e ensinar as técnicas utilizadas para as análises moleculares até meados deste mestrado, quando então se aposentou;

Ao Prof. Paulo Hercílio Viegas por me encorajar e acompanhar nos primeiros passos da vida de mestranda;

Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves por me receber em seu laboratório e ao seu então orientado, Gilvano, pelos primeiros aprendizados práticos das técnicas de cultura de tecidos de plantas;

Ao Prof. João Lúcio Azevedo, pela motivadora disciplina ministrada, “Evolução das Interações Microrganismos-Hopedeiros” (CEN5777-1/1);

Ao Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald por fornecer as culturas de cana-de-açúcar utilizadas na instalação dos experimentos, bem como permitir a minha visita em seu laboratório, UFSCAR, Araras, SP;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clarice Garcia Borges Demétrio e ao seu aluno de doutorado, Rodrigo, pelo auxílio no delineamento dos experimentos de micropropagação e nas análises estatísticas envolvidas nos mesmos;

À Prof<sup>a</sup> Helaine Carrer por permitir o uso dos sistemas de biorreatores do CEBTEC. Um especial agradecimento ao Enio, técnico do CEBTEC, por repassar seus conhecimentos de cultura de tecidos, pelas diversas trocas de ideias e pelo

reconhecimento do meu trabalho. Bem como à toda sua equipe de estagiários, em especial Giovanna, Lucimara e Flávio, pelo comprometimento, interesse, maturidade e dedicação no acompanhamento de meus experimentos. Ainda no CEBTEC, o auxílio de Gabriel, que me acompanhou na instalação e condução dos experimentos com cana-de-açúcar em biorreatores.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, NAP/MEPA, ESLAQ/USP, pelo suporte e permissão do uso do microscópio eletrônico de varredura;

Aos grandes amigos e todos os familiares que me acompanharam ao longo desta jornada, pela amizade, reflexões, e momentos de alegria os quais foram tão importantes para meu equilíbrio emocional e crescimento pessoal;

Obrigada a todos!

“If I have seen a little further, it is by standing on the shoulders of giants.”

**Issac Newton**



## RESUMO

HEUSER, C. **Identificação molecular de comunidades microbianas presentes em plântulas cultivadas sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro***. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Nos últimos anos, diversos protocolos e tecnologias têm sido propostos a fim de viabilizar ou otimizar a micropropagação de diversas culturas, bem como reduzir custos de produção. Dentre eles, tem ganhado destaque, o uso do meio de cultura líquido e do sistema de biorreator de imersão temporária (BIT). No entanto, observam-se diferenças de resposta entre espécies e metodologias, sendo necessários maiores estudos para um melhor conhecimento dos fatores que afetam os sistemas de micropropagação. Estudos recentes, baseados em técnicas moleculares, têm revelado que as culturas *in vitro* não são axênicas, como se acreditava, apresentando comunidades endofíticas onipresentes. Sabendo-se da importância desses microrganismos em plantas a campo, passou-se a questionar o papel destes no desenvolvimento e multiplicação de plantas *in vitro*. Diante deste cenário, este trabalho se propôs a comparar o desempenho de culturas *in vitro* em diferentes condições de cultivo: meio semissólido, meios líquido estático, sob agitação e, avaliando-se o crescimento/ multiplicação das plântulas e, naqueles onde houve diferença no desempenho, foram realizadas análises moleculares para a caracterização da comunidade microbiana presente na parte aérea das plantas. Foram utilizadas culturas de bromeliáceas e cana-de-açúcar, buscando sistemas que permitissem as avaliações pretendidas. Para isto foram instalados experimentos com *Ananas comosus* var. *comosus* ('Imperial' e 'Pérola') e *Aechmea nudicaulis*, sob cultivo em meio líquido estático e sob agitação; e com *Vriesea hieroglyphica* E. Morren, sob cultivo em meio líquido estático, sob agitação e em BIT. Para a gramínea, cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., variedade SP80-3280), foram avaliados o cultivo em meio líquido estático e em BIT. Foram também realizadas análises moleculares de plântulas de *Dyckia distachya*, que haviam sido cultivadas em meios de culturas semissólido, líquido sob agitação e estático. As culturas que apresentaram diferenças de desempenho entre os sistemas avaliados foram *D. distachya*, (sendo o melhor tratamento o meio líquido sob agitação) e cana-de-açúcar (melhor tratamento foi BIT) e estas foram consideradas como sistemas adequados para o estudo de como diferentes sistemas de cultivo *in vitro* podem influenciar na comunidade bacteriana das plantas. A caracterização da comunidade bacteriana de *D. distachya* foi realizada por T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) e mostrou que o tratamento meio líquido sob agitação, o qual teve a maior produção de brotos em relação aos demais, diferiu quanto à abundância relativa das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) encontradas. Para cana-de-açúcar foram realizadas a construção de bibliotecas de clones do gene 16S rRNA e PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Estas análises mostraram não haver diferença significativa entre as bibliotecas dos tratamentos avaliados, no entanto, BIT apresentou 3,54 vezes mais cópias do gene 16S rRNA em relação ao tratamento meio líquido estático, nos permitindo inferir que também possui uma maior número de bactérias. Este estudo apresenta fortes indícios de que o sistema de cultivo *in vitro* utilizado influencia a comunidade microbiana presente nas plantas.

**Palavras-chave:** Biorreator de imersão temporária. Bactérias endofíticas. Cana-de-açúcar. Bromeliaceae. qPCR. T-RFLP. 16S rRNA.



## ABSTRACT

HEUSER, C. **Molecular identification of microbial communities in plants cultured under different *in vitro* culture system.** 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

In recent years, several protocols and technologies have been proposed for feasibility and optimization of micropropagation of different cultures as well as to reduce production costs. Among these, the use of liquid culture medium and the temporary immersion bioreactor system (TIB) have gained special attention. However, differences are observed among species and methodologies, being necessary more detailed studies for a better knowledge of the factors that affect the micropropagation systems. Recent studies, based on molecular techniques, have revealed that *in vitro* cultures are not axenic, as thought, presenting ubiquitous endophytic community. Knowing the importance of these microorganisms to field plants we would like to know more about their role in *in vitro* plants. In this scenario, this work proposes to compare the performance of *in vitro* cultures under different culture conditions: semisolid medium culture, liquid static and liquid medium under agitation, and where differences in *in vitro* performance were observed comparative molecular analysis of microbial community in the plantlets was performed. Bromeliads and sugarcane cultures were used seeking for model systems for these analyses. These experiments were conducted with *Ananas comosus* var. *comosus* ('Imperial' and 'Pérola') and *Aechmea nudicaulis* cultured under liquid static medium and liquid under agitation, and with *Vriesea hieroglyphica*, we compared liquid static medium, liquid medium under agitation and TIB. For sugarcane (*Saccharum* spp. variety SP80-3280), liquid static medium and TIB was compared. Molecular analyses of *Dyckia distachya* plantlets, which had been grown in semisolid medium liquid static and liquid medium under agitation, were also carried out. Cultures that showed differences in performance among the systems evaluated were *D. distachya*, (with liquid medium under agitation as the best condition) and sugarcane (best treatment was BIT) and these were considered adequate to study the differences in the bacterial community of plants when grown in different *in vitro* conditions. The characterization of the microbial community of *D. distachya* was performed by T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) and showed that the liquid medium under agitation, which had the highest number of shoots compare to the other culture conditions, also differed as to the relative abundance of Operational Taxonomic Units (OTUs). For sugarcane 16S rRNA gene clone libraries, as well as real-time PCR (qPCR) were performed. These analyses showed no significant differences between the libraries of the two treatments, however, BIT showed 3.54 times more copies of the 16S rRNA gene compared to cultures from static liquid medium, allowing us to infer a higher number of bacteria. This study provides strong evidence that the *in vitro* system used influences the microbial community present in plants.

**Keywords:** Temporary immersion bioreactor; bacterial endophytes; sugarcane; Bromeliaceae, qPCR; T-RFLP, 16S rRNA.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
3.1. Micropropagação .....	19
3.2. Micropropagação em sistemas de cultivo em meio líquido .....	20
3.3. Bromeliaceae e a micropropagação .....	22
3.4. Cana-de-açúcar e a micropropagação .....	25
3.5. Interações plantas-microrganismos.....	27
3.6. Microrganismos e cultura de tecidos .....	29
3.7. O uso de análises moleculares no estudo da composição microbiana de amostras ambientais .....	30
3.7.1. Construção de biblioteca genômica .....	32
3.7.2. <i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)</i> .....	33
3.7.3. PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	34
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1. Micropropagação de <i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i> e <i>Aechmea nudicaulis</i> em meio líquido sob agitação e estático .....	35
4.2. Micropropagação de <i>Vriesea hieroglyphica</i> em diferentes sistemas de cultivo .....	37
4.3. Análise por T-RFLP da comunidade bacteriana de culturas <i>in vitro</i> de <i>Dyckia distachya</i> .....	40
4.3.1. Extração do DNA genômico total .....	41
4.3.2. Amplificação do gene 16S rRNA de bactéria .....	42
4.3.3. Separação dos fragmentos de interesse por eletroforese .....	44
4.3.4. Digestão com enzimas de restrição e precipitação .....	45
4.3.5. Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) .....	46
4.3.6. Processamento dos dados de T-RFLP.....	46

4.4. Micropropagação de cana-de-açúcar em BIT e em meio líquido estático e análise da comunidade bacteriana .....	47
4.4.1. Análises por microscopia de luz .....	49
4.4.2. Análises por microscopia eletrônica de varredura .....	50
4.4.3. Análise por T-RFLP da comunidade bacteriana de culturas <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar .....	50
4.4.4. Construção de biblioteca de clones com amostras de culturas <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar .....	51
4.4.5. PCR quantitativo em tempo real para o gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> .....	56
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
5.1. Micropropagação de <i>Ananas comosus var comosus</i> e <i>Aechmea nudicaulis</i> em meio líquido sob agitação e estático .....	59
5.2. Micropropagação de <i>Vriesea hieroglyphica</i> em diferentes sistemas de cultivo .....	61
5.3. Análise por T-RFLP da comunidade bacteriana em culturas <i>in vitro</i> de <i>Dyckia distachya</i> .....	64
5.3.1. Processamento dos dados de T-RFLP .....	65
5.4. Micropropagação de cana-de-açúcar BIT e em meio líquido estático e análise da comunidade bacteriana .....	69
5.4.1. Análise por microscopia de luz e eletrônica de varredura .....	72
5.4.2. Análises moleculares da comunidade bacteriana .....	73
5.4.2.1 Análise por T-RFLP da composição bacteriana das culturas de cana-de-açúcar .....	74
5.4.2.2 Construção de biblioteca de clones com amostras de culturas <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar .....	75
5.4.2.3 PCR quantitativo em tempo real para o gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> .....	87
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A micropropagação é atualmente a melhor técnica para a obtenção de mudas de qualidade, de forma rápida e eficiente, para diversas espécies. A micropropagação apresenta grande potencial na multiplicação de bromélias e cana-de-açúcar, permitindo a produção de mudas em larga escala de forma eficiente. Ambas as culturas apresentam grande importância em diferentes setores da economia brasileira, a primeira por ser uma espécie ornamental, de importância ecológica e sob risco de extinção e a segunda por ser matéria-prima do setor sucroalcooleiro.

Mesmo tendo inúmeras vantagens em relação aos meios convencionais de propagação, a micropropagação pode apresentar custos elevados e taxas de multiplicação insatisfatórias (ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

A substituição do meio de cultura semissólido pelo líquido tem sido considerada uma alternativa para a redução de custos de produção e permitir a automação. Por outro lado, pode trazer problemas como falta de oxigenação e hiperidricidade (ROELS et al., 2005). Visando solucionar esses problemas e sem abrir mão dos benefícios do seu uso, alternativas têm sido testadas com o uso de agitação, suportes mecânicos e o uso de biorreatores de imersão temporária (BIT). No entanto, nem todas as espécies respondem a esses sistemas igualmente, sendo necessária a otimização para cada caso.

Os BITs têm sido citados como sistemas de grande potencial por apresentarem altas taxas de multiplicação das culturas, no entanto, dificuldades podem ser encontradas para a sua otimização (DEBIASI, 2011). Além da composição do meio de cultura, o tempo de imersão, a duração e a frequência são os parâmetros mais decisivos para a eficiência do sistema (ETIENNE; BERTHOULY, 2002), por isso, muitos estudos se propõem a determinar os melhores valores para esses parâmetros para diversas culturas. Como fruto desses estudos, diversas culturas apresentam melhor desempenho em BIT quando comparado aos protocolos tradicionais, entre elas estão as bromélias (ESCALONA et al.; 1999; SCHERER et al., 2013) e a cana-de-açúcar (LORENZO et al., 1998; ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

O sucesso da cultura de tecidos vegetais é dependente de vários fatores e independentemente da metodologia utilizada, a contaminação microbiana dos

explantes é sem dúvida o mais severo transtorno que pode ocorrer (KNEIFEL; LEONHARDT, 1992), sendo a principal responsável por perdas em laboratórios de pesquisa e biofábricas. Microrganismos encontrados naturalmente associados às plantas podem causar grandes perdas econômicas em plantas cultivadas *in vitro*, desta forma, vários procedimentos têm sido desenvolvidos buscando a sua “eliminação” ou o seu manejo. No entanto, estudos recentes, baseados em técnicas independentes de cultivo, têm revelado a existência de comunidades microbianas em plantas *in vitro* consideradas axênicas (livres de microrganismos) e aparentemente saudáveis e sem causar perdas econômicas (PIRTTILÄ et al., 2000; ALMEIDA; YARA; ALMEIDA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2009; PODOLICH et al., 2009).

As técnicas de identificação de microrganismos independentes de cultivo apresentam um grande avanço no estudo de comunidades microbianas, por permitirem o acesso às mesmas excluindo-se os problemas e limitações ocasionados pela baixa culturabilidade de muitas bactérias. Muitos destes estudos são feitos baseando-se nas diferenças de composição das regiões variáveis do gene 16S ribossomal (16S rRNA). Dentre as vantagens do uso deste gene estão: o fato de estar presente em praticamente todas as bactérias; possuir a função do gene conservada ao longo do tempo e a existência de diversos bancos de dados gratuitos disponíveis para a análise das sequências deste gene.

Utilizando-se destas técnicas, estudos demonstram que em plantas a campo, diversos fatores, tais como: genótipo da planta, estágio de crescimento, condição fisiológica, condições ambientais, manejos agrícolas, dentre outros, influenciam e determinam a comunidade microbiana das mesmas (HALLMANN; BERG, 2006; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). Isto nos levou a questionar se os ajustes feitos com o objetivo de se melhorar o desempenho das plantas micropropagadas, podem também influenciar a comunidade microbiana presente nas plantas *in vitro*, e conseqüentemente influenciar o desempenho das mesmas.

Considerando-se que na literatura há relatos de que bromélias e cana-de-açúcar cultivadas em BIT podem apresentar maiores rendimentos na micropropagação e a hipótese de que alterações no ambiente de cultivo das plantas podem influenciar a microbiota e conseqüentemente o seu desempenho, este trabalho utilizou-se de técnicas de cultura de tecidos e moleculares para elucidar os objetivos propostos.

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar como os diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de plantas podem influenciar na comunidade de bactérias presentes nas plantas, gerando informações que possam contribuir para o entendimento da influência dessas comunidades durante o cultivo *in vitro*. Para isso, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar os parâmetros de produção de espécies de bromélias e cana-de-açúcar sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro*;
2. Identificar a população microbiana em sistemas de cultivo *in vitro* já estabelecidos e relacionar os parâmetros de produção com esta comunidade;
3. Caracterizar, através da construção de bibliotecas de clones do gene 16S rRNA bacteriano e da técnica de T-RLFP, as comunidades microbianas presentes em ambos os sistemas;
4. Quantificar a comunidade bacteriana total presente nos sistemas utilizando-se PCR quantitativo em tempo real para o gene 16S rRNA bacteriano.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Micropropagação

Na agricultura comercial, quando um genótipo de interesse é obtido, é interessante que se obtenham novos indivíduos idênticos a ele. Isso pode ser feito pela propagação vegetativa/ clonal. A propagação clonal é realizada via macropropagação, a qual envolve métodos vegetativos tradicionais como a individualização de brotos laterais, ou via micropropagação, utilizando-se ferramentas da cultura de tecidos (AHUJA, 1993). A micropropagação de plantas teve seus estudos iniciados no início do século passado e comercialmente na década de 60 (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Seu embasamento teórico foi proposto pelo alemão Gottlieb Haberlandt, em 1902, em seus experimentos com cultura de células e tecidos somáticos de várias espécies em solução nutritiva (THORPE, 2007).

Tipicamente, a micropropagação envolve quatro etapas: estabelecimento *in vitro*; multiplicação; enraizamento e aclimatização (BUNN; TAN, 2002). A fase de estabelecimento é iniciada com a introdução do explante *in vitro* e a regeneração pode ocorrer por duas vias principais: organogênese ou embriogênese somática (SNYMAN et al., 2011). Uma vez estabelecidos, os explantes são cultivados em condições assépticas sob baixa intensidade luminosa, em frascos contendo meio de cultura composto por sacarose, sais minerais, vitaminas e reguladores vegetais, em concentrações que excedem os níveis encontrados em condições naturais de desenvolvimento das plantas (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995), e são mantidos em condições controladas de umidade, temperatura e luz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Entre as vantagens da micropropagação estão: a necessidade de um espaço reduzido; maiores taxas de multiplicação em relação aos sistemas convencionais de propagação; uniformidade das plantas; produção de mudas livres de patógenos; controle das condições ambientais locais e sazonais para a produção de mudas, dentre outros (GEORGE, 2008; GARCIA-GONZALES et al., 2010; SENGAR; SENGAR; GARG et al., 2011; SNYMAN et al., 2011). Dentre as desvantagens estão o custo elevado, especialmente devido à demanda por mão-de-obra, que pode ser responsável por 40 a 60% dos custos envolvidos (ETIENNE; BERTHOULY, 2002),

baixa taxa de sobrevivência das plantas quando levadas a campo (GEORGE; DEBERGH, 2008) e a contaminação, com perdas estimadas ao redor de 10% (COSTA; SCHERWINSKI-PEREIRA; OTONI, 2010).

Diante deste cenário, estudos têm sido realizados com objetivo de otimizar esta técnica para diversas culturas, entre elas bromeliáceas (ESCALONA et al., 1999; ARRABAL et al., 2002; ALVES, DAL VESCO; GUERRA, 2006; BERTALAN et al., 2009) e cana-de-açúcar (KHAN et al., 2006; MORDOCCO; BRUMBLEY; LAKSHMANAN, 2009; PANDEY et al., 2011), objetos do presente estudo.

### **3.2 Micropropagação em sistemas de cultivo em meio líquido**

O sistema mais comumente utilizado para a micropropagação é a proliferação de brotos utilizando meio de cultura semissólido (MEHROTRA et al., 2007), utilizando um agente geleificante, por exemplo, o ágar, adicionado ao meio de cultura (GEORGE, 2008). No entanto, em muitas culturas, o uso do meio líquido apresenta resultados superiores em relação ao meio solidificado com ágar (PREIL, 2005).

Visando diminuir os custos da micropropagação, aumentar a eficiência do processo e reduzir as perdas associadas à contaminação por manipulação, o uso de meio de cultura líquido tem sido apresentado como uma alternativa eficiente ao meio semissólido tradicionalmente utilizado (GARCIA-GONZALES et al., 2010). Entre as vantagens do meio de cultura líquido são citadas: a possibilidade de renovação e substituição do meio de cultura no próprio frasco de cultivo; a esterilização do meio pode ser realizada por ultrafiltração ao invés de autoclavagem; menor espaço utilizado; maior uniformidade das condições de cultivo; possível utilização de frascos maiores; a limpeza dos frascos contendo meio líquido é mais fácil em relação ao meio semissólido; e a possibilidade de melhor absorção de nutrientes pelo fato de todo o explante ficar em contato com o meio de cultura e, conseqüentemente, um melhor desempenho das plantas (ESCALONA et al., 1999; ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

No entanto alguns problemas podem surgir devido ao seu uso, tais como: problemas de oxigenação; hiperidricidade (vitrificação); e a necessidade de equipamentos mais complexos (ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

Para conciliar os benefícios do meio de cultura semissólido e do líquido, surgiram os biorreatores de imersão temporária – BIT (ETIENNE; BERTHOULY, 2002; MURCH et al., 2004; ZHAO et al., 2012). Os biorreatores foram inicialmente desenvolvidos para o cultivo de microrganismos, sendo também amplamente utilizados para a produção em escala industrial de metabólitos secundários de plantas e de animais (TAKAYAMA; AKITA, 2006). São basicamente constituídos de frascos de cultivo, motor elétrico conectado a um eixo que se estende até o interior do frasco e bomba compressora de ar. A primeira aplicação de um biorreator para a propagação de plantas foi relatada em 1981 com a cultura de begônia utilizando-se um biorreator de coluna e bolha (TAKAYAMA; AKITA, 2006). Estes equipamentos podem ser utilizados para a cultura de embriões, gemas e também hastes caulinares, com o objetivo de produção de mudas em larga escala.

O objetivo do uso de biorreatores é o aprimoramento das condições ótimas de crescimento pelo controle dos parâmetros químicos e físicos para atingir tanto uma elevada produtividade como alta qualidade de propágulos, além de manter os custos de produção o mais baixo possível, utilizando-se um sistema automatizado (PREIL, 2005).

Em sistema de BIT, os explantes não ficam em contato permanente com o meio de cultura e sim sofrem imersões em intervalos pré-determinados. O tempo de imersão e a frequência são, provavelmente, os parâmetros mais decisivos para a eficiência desse sistema (ALVARD; COTE; TEISSON, 1993). Dentre os principais parâmetros envolvidos na diminuição do custo de produção pelo sistema BIT estão: redução da área de estantes e número de frascos utilizados; melhor rendimento biológico e redução drástica de mão-de-obra envolvida (ETIENNE; BERTHOULY, 2002), que pode ser responsável por 40 a 60% dos custos de micropropagação (CHU, 1995).

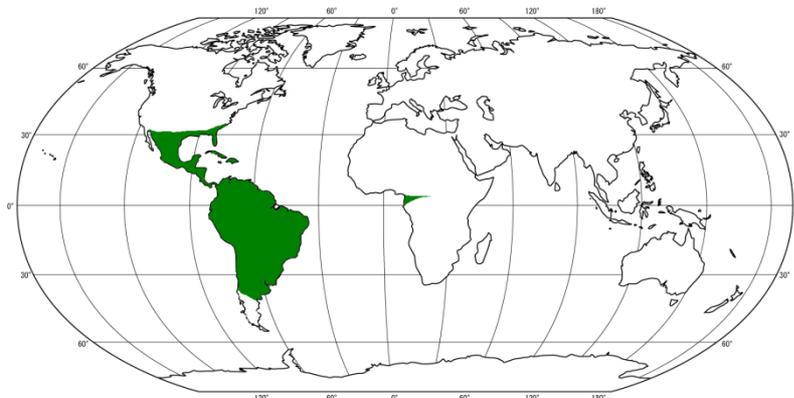
Trabalhos avaliando os sistemas BIT apontam sua eficiência na redução dos custos de produção e na melhoria das taxas de multiplicação em relação ao convencional meio semissólido em bromeliáceas (ESCALONA et al., 1999; SCHERER et al., 2013), na cultura de cana-de-açúcar (LORENZO et al., 1998; MORDOCCO; BRUMBLEY; LAKSHMANAN, 2009; NKWANYANA; SNYMAN; WATT, 2010), e em diversas outras espécies (LEMOS, et al., 2001; MURCH et al., 2004; ZOBAYED et al., 2004; ROELS et al., 2005; THAKUR et al., 2006).

Com o objetivo de se entender melhor a eficiência destes sistemas, estudos têm sido conduzidos com avaliando-se os efeitos do ambiente de cultivo no crescimento e no desenvolvimento de plantas micropropagadas (ZHAO et al., 2012). Feuser et al. (2003), comparando a fidelidade genotípica de plantas de abacaxi micropropagadas em sistemas de imersão temporária e em meio de cultura estático, constataram significativa diminuição na frequência de variantes somaclonais no primeiro sistema.

Estudos no sentido de se reduzir ainda mais o custo desta tecnologia e investigar os seus possíveis efeitos nas plantas assim cultivadas, são de extrema importância e tem recebido a atenção de diversos pesquisadores ao longo dos últimos anos (ESCALONA et al., 1999; MURCH et al., 2004; PAEK, CHAKRABARTY; HAHN, 2005; ROELS et al., 2005; NKWANYANA, SNYMAN; WATT, 2010; ZHAO et al., 2012; HUI et al., 2013; SCHUMANN et al., 2013).

### 3.3 Bromeliaceae e a micropropagação

A família *Bromeliaceae* Juss é composta por 58 gêneros e 3.352 espécies (LUTHER, 2012). As bromélias são plantas tropicais com vasta distribuição nas florestas tropicais, desertos e áreas costeiras, apresentando grande importância do ponto de vista ecológico e mantendo importantes interações com a fauna (GUERRA; DAL VESCO, 2009). São nativas das Américas com exceção de *Pitcairnia feliciana* (A.Chev.) Harms & Mildbr que é nativa da África (MARTINELLI, 2000; POREMBSKI; BARTHLOTT, 1999) (Figura 1).



**Figura 1** - Distribuição geográfica das bromélias no mundo (Fonte: Adaptado de REITZ, 1983)

Esta família era tradicionalmente subdividida em três subfamílias, Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (SMITH; DOWNS, 1974, 1977, 1979), sendo que, recentemente, foi proposta uma nova divisão composta por oito subfamílias Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae, com base em análises moleculares baseadas na variação nucleotídica do gene *ndhF* (GIVNISH et al., 2011).

Estima-se que 40% das espécies de *Bromeliaceae* pertencentes a 40 gêneros, estão distribuídas no Brasil e muitas delas são endêmicas e encontradas principalmente no bioma da Mata Atlântica (SOUZA; LORENZI, 2005; WANDERLEY et al., 2006). Estimativas indicam que restam apenas 7,5% deste bioma (MYERS et al., 2000) e, associado a esse processo de devastação, observa-se uma redução da biodiversidade, incluindo a flora epífita (COFFANI-NUNES, 2002).

Muitas bromélias, devido à disposição de suas folhas, formam tanques onde armazenam água, em alguns casos, em grande quantidade, como *Alcantarea imperialis* Harms, cujo volume de água pode chegar a 30 litros, desempenhando importante papel no ciclo da água e nutrientes (MARTINELLI, 2000). Associados a esse microhabitat e dependente dele, pesquisadores já encontraram mais de 900 tipos de organismos, entre insetos, aracnídeos, anfíbios, crustáceos e anelídeos. Em contrapartida, essas criaturas são alimento para pássaros (MARTINELLI, 2000) e pequenos primatas como o mico-leão-dourado, espécie ameaçada de extinção (OLIVEIRA et al., 2011).

Além da importância ecológica, as bromélias têm despertado grande interesse como plantas ornamentais por apresentarem folhas e flores de coloração intensa e variada (MARTINELLI, 2000). Sendo que, um grande número dessas plantas é coletado ilegalmente nas florestas para serem comercializadas. O desenvolvimento de tecnologia para a produção eficiente de mudas destas espécies é uma maneira de amenizar a extração ilegal das mesmas do seu habitat.

A propagação das bromélias pode ocorrer de forma sexuada ou assexuada. No entanto, a produção de sementes é demorada e, em algumas espécies, apenas a maturação das mesmas, pode levar até um ano após a polinização (STRINGHETA et al., 2005). Por outro lado, a propagação assexuada, que é feita por separação de brotos é pouco produtiva, pois os mesmos são produzidos apenas após o florescimento e em pequeno número, devido à forte dominância apical. Por esses

motivos, nas últimas décadas, os horticulturistas têm utilizado métodos de micropropagação como estratégia de propagação massal para diversas espécies de bromélias (ARRABAL et al., 2002; RECH FILHO et al., 2005; ALVES, DAL VESCO; GUERRA, 2006; ARANDA-PERES et al., 2009; HUANG et al., 2011).

Dentre as espécies mais utilizadas para a produção de híbridos e cultivo comercial, encontram-se as espécies de *Vriesea*, pertencentes à subfamília Tillandsioideae (BENZING, 2000). As plantas deste gênero possuem tamanho variável e a maioria é epífita, suas folhas arranjadas em rosetas podem ser pêndulas ou eretas, totalmente verdes ou com manchas, esparsa ou densamente cobertas por tricomas (COSTA, 2002) e de ocorrência em ambientes sombreados (MARTINELLI, et al., 2008). O crescimento lento da *Vriesea* spp. *in vitro*, quando comparado a outras bromeliáceas, foi observado em experimentos em nosso laboratório e esforços têm sido realizados para melhorar a eficiência na propagação de espécies desse gênero.

*Aechmea nudicaulis* Griseb. pertence à subfamília Bromelioideae e encontra-se listada como espécie vulnerável (RS, 2002), apresentando hábitos tanto epífito, como terrestre, sendo no Brasil encontrada nos cerrados, florestas costeiras, restingas e mangues (WENDT, 1997).

O abacaxizeiro, *Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus* Coppens & F. Leal, pertence à subfamília Bromelioideae, apresenta grande importância econômica para o Brasil, sendo cultivado em praticamente todo o país. O Brasil colheu no ano de 2011, 2.318.120 toneladas, sendo o segundo maior produtor da cultura no mundo, perdendo apenas para a Tailândia (FAO, 2013). Além da importância econômica, apresenta ainda importância social pela geração de empregos diretos e indiretos (MATOS; HEINHARDT, 2009). A região de maior produção é o Nordeste, com 38,7% da produção em 2011 (IBGE, 2013).

A cultivar Pérola é a mais comercializada em todo o país, apesar de ser suscetível à fusariose (*Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*), principal doença que ataca a cultura. A cultivar Imperial é um híbrido desenvolvido pela Embrapa Mandioca de Fruticultura e apresenta-se como uma boa alternativa no controle da fusariose por ser tolerante à mesma além de não possuir espinhos em suas folhas, o que facilita o manejo e colheita (MATOS; HEINHARDT, 2009).

Além da fusariose, outros problemas afetam a produção comercial do abacaxi no Brasil como a falta de mudas de boa qualidade e a baixa taxa de multiplicação

pelos métodos convencionais de propagação vegetativa (RUGGIERO et al., 1994). A necessidade de se contornar estes problemas levaram ao desenvolvimento de protocolos de micropropagação para o abacaxizeiro (ALMEIDA et al., 2002).

### 3.4 Cana-de-açúcar e a micropropagação

A cana-de-açúcar, pertence ao gênero *Saccharum* L., família Poaceae, é uma planta alógama (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO; 2005), que se reproduz predominantemente de forma assexuada por toletes ou rizomas e menos comumente de maneira sexuada, por sementes (BAKKER, 1999). Foi primeiramente cultivada no sudeste asiático e na Índia ocidental e atualmente é cultivada em áreas localizadas entre as coordenadas 36,7° de latitude norte e 31,9° de latitude sul (SUGARCANECROPS, 2010).

As cultivares modernas de cana-de-açúcar são derivadas de cruzamentos interespecíficos realizados há aproximadamente um século (SNYMAN et al., 2011) entre a espécie produtora de açúcar *S. officinarum* L. e a espécie selvagem *S. spontaneum* L., seguidas de uma série de retrocruzamentos com *S. officinarum* (MUDGE et al., 2009). Cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. barbieri*, *S. sinense* e raramente com *S. robustum*, também são citados (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO; 2005).

Introduzida no Brasil em 1532, o sucesso desta cultura em muitas regiões do país se deve à boa adaptação às condições de clima e solo do nosso país e por utilizar a via C<sub>4</sub> da fotossíntese, altamente eficiente em condição tropical como a nossa (BALDANI et al., 2002; SOUZA; BUCKERIDGE, 2010). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, tendo produzido mais de 734 milhões de toneladas no ano de 2011 (FAO, 2013). O Estado de São Paulo é responsável com 58,2% da produção (427,4 mil toneladas), seguido por Minas Gerais com 9,2% (67,7 mil toneladas) e Goiás com 7,5% (54,9 mil toneladas) (IBGE, 2013). A cultura é também considerada a responsável pela base da independência do Brasil em relação aos combustíveis fósseis (LAWRENCE; WALBOT, 2007). O uso de energia renovável é uma das maneiras mais eficientes para se conseguir um desenvolvimento sustentável e, nesse aspecto, o modelo adotado pelo Brasil nos

anos 70 tem sido considerado um exemplo a ser seguido por outros países (GOLDEMBERG et al., 2007).

O interesse da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) em estudar o genoma da cana-de-açúcar e a implementação do programa SUCEST (VETTORE et al., 2003) também comprova a importância desta cultura para o país.

A cana-de-açúcar é talvez uma das culturas mais competitivas economicamente como fonte de álcool, podendo efetivamente contribuir para um meio ambiente mais limpo. Desta forma, maneiras de se melhorar a sua produtividade têm sido objeto de intensa investigação no Brasil (MAGNANI et al., 2010).

Por esses e outros motivos, a cana-de-açúcar está frequentemente inserida em programas de melhoramento, objetivando a introdução de características de interesse agrônomo (CIDADE et al., 2006) como resistência a doenças e pragas, melhor produção de biomassa e açúcar (SNYMAN et al., 2011).

Ao se obter um genótipo superior em um programa de melhoramento, há a necessidade de se multiplicar o material selecionado com rapidez e eficiência, e é nesta etapa que a micropropagação apresenta-se como uma alternativa com diversas vantagens em relação à propagação convencional (SNYMAN et al., 2011), como obtenção de maiores taxas de multiplicação e mudas com melhor qualidade e em tempo e espaço reduzidos (MALHOTRA, 1995; WANG et al., 1998).

Além da micropropagação de genótipos de interesse, o cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar trouxe outros resultados, como: a produção de materiais livres de doenças; intercâmbio internacional de germoplasma; rápida triagem por resistência a pragas e doenças e a conservação de germoplasma. Muitas destas metodologias têm sido rotineiramente utilizadas em conjunto para na tentativa de se reduzir a utilização de recursos, como mão-de-obra, terras e bem como o tempo para o desenvolvimento e liberação de novas cultivares que atualmente gira em torno de 10 a 14 anos (SNYMAN et al., 2011).

Durante os anos noventa, a busca por sistemas automatizados visando a redução de custos na micropropagação da cana-de-açúcar, ganhou considerável destaque, e dentre esses sistemas foi desenvolvido o uso de biorreator de imersão temporária (WALKER; HARRIS; GAUTZ, 1991; SCHAUFLEER; WALKER, 1994; 1995; WANG et al., 1998; WANG et al., 1999).

### 3.5 Interações plantas-microrganismos

As plantas e os animais naturalmente se associam de diversas maneiras aos microrganismos (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). No intestino de animais, bactérias desempenham importante papel no desenvolvimento da imunidade (HOOPER et al., 2001; HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012), em humanos estudos sobre essa relação levou à realização de grandes projetos como “Human Microbiome Project – HMP” (TURNBAUGH et al., 2007), além de estudos visando entender a relação entre a microbiota e aspectos da saúde humana, bem como os fatores que podem afetar a composição dessa microbiota durante nossas vidas (CHO; BLASER, 2012; NICHOLSON et al., 2012). De forma similar, as bactérias também estimulam respostas das plantas (CONRATH et al., 2006).

A maioria das bactérias associadas às plantas é proveniente do ambiente do solo (COMPANT; CLEMENT; SESSITSCH, 2010). Os componentes exudados pelas raízes, entre outros, incluem: íons, oxigênio livre, água, mucilagem, aminoácidos, açúcares, vitaminas, ácidos orgânicos, nucleotídeos e enzimas (GRUPTA; MUKERJI, 2002; BAIS et al., 2006). Tais exudatos podem tanto atrair, como repelir organismos, sendo que diferentes organismos (atraídos pelo mesmo exudato) podem resultar em diferentes respostas da planta (BAIS et al., 2006). Quando atraídos, eles podem migrar para a rizosfera (região que circunda as raízes das plantas), em seguida para o rizoplane de seus hospedeiros, podendo então penetrar nas raízes através de rachaduras e colonizar os espaços intercelulares (CHI et al., 2005), podendo também migrar para as partes aéreas através dos vasos do xilema (COMPANT et al., 2008), apresentando uma densidade de colonização decrescente em comparação com as populações que colonizam a rizosfera ou as raízes (COMPANT; CLEMENT; SESSITSCH, 2010). Foi demonstrado que quando as plantas são infectadas por alguns patógenos elas são capazes de selecionar os organismos de sua rizosfera. Essa seleção ocorre alterando a composição dos exudados de suas raízes com o objetivo de atrair microrganismos que possam protegê-la contra a agressão de determinado fitopatógeno (RUDRAPPA et al., 2008).

As plantas oferecem uma vasta gama de habitats que permitem o crescimento de comunidades microbianas, incluindo desde locais ricos em nutrientes e com alta umidade, como pobres em nutrientes e com condições ambientais

adversas (BEATTIE, 2007). Os microrganismos isolados do rizoplasma e do filoplasma são denominados epifíticos (ANDREWS; HARRIS, 2000), enquanto que aqueles que habitam os tecidos internos por pelo menos um período de seu ciclo de vida, e aparentemente não causam qualquer dano ao hospedeiro, são chamados microrganismos endofíticos (AZEVEDO, 1998).

Em comparação com as bactérias da rizosfera e da filosfera, as bactérias endofíticas possivelmente interagem mais diretamente com a planta hospedeira (WEYENS et al., 2009). Como uma definição universalmente aceita para bactérias endofíticas ainda não foi estabelecida, neste trabalho seguiremos a definição proposta por Hallmann et al. (1997) que definem bactérias endofíticas como aquelas que podem ser isoladas a partir de um tecido vegetal com superfície desinfestada, ou extraídas a partir do tecido interno de uma planta sem que estejam causando dano ao hospedeiro.

De acordo com a estratégia de vida adotada, os microrganismos endofíticos podem ser classificados em 'obrigatórios' ou 'facultativos'. Os 'obrigatórios' são aqueles estritamente dependentes da planta hospedeira para o seu crescimento e sobrevivência, sendo que a transmissão para outra planta ocorre verticalmente, ou por algum vetor. Os 'facultativos' apresentam um estágio de sua vida fora da planta hospedeira, sendo caracterizado como bifásico, alternando entre a planta e o meio ambiente (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008).

A comunidade microbiana associada às plantas pode desenvolver importantes funções no desempenho das culturas, conferindo vantagens como: promoção do crescimento, pelo aumento da eficiência na aquisição de nutrientes do solo ou pela produção de fito-hormônios (DUAN et al., 2006; FENG; SHEN; SONG, 2006; TING et al., 2008; BERG, 2009); aumento da resistência a fito-patógenos (STURZ et al., 1999; REITER et al., 2002; AKELLO et al., 2008; SENTHILKUMAR et al., 2009); solubilização e assimilação de fosfato (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004), e fixação e assimilação de nitrogênio (BODDEY et al., 2003; SOE et al., 2012; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

O conhecimento sobre as interações planta-microrganismos e a nossa habilidade em manter, manipular e modificar populações de bactérias benéficas é o primeiro passo para possibilitar a utilização de microrganismos endofíticos e epifíticos na agricultura (HALLMANN et al., 1997). O estudo das associações planta-microrganismos, além de levar ao entendimento do seu papel ecológico e suas

interações com as plantas, também possibilita a aplicação biotecnológica dessas bactérias em favor de uma agricultura mais sustentável e eficiente (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

### 3.6 Microrganismos e cultura de tecidos

Na cultura de tecidos vegetais, após a escolha do explante, procedimentos para a desinfestação dos mesmos são realizados anteriormente ao estabelecimento com o objetivo de “eliminar” a população microbiana nele presente e assim permitir o cultivo *in vitro*. Na natureza as plantas coexistem com uma ampla gama de microrganismos presentes nos seus diversos órgãos, no entanto, na cultura de tecidos esses microrganismos podem levar indiretamente à morte dos explantes, devido à competição pelos nutrientes do meio de cultura e por, geralmente, excretarem substâncias tóxicas aos tecidos no meio de cultura (COSTA; SCHERWINSKI-PEREIRA; OTONI, 2010). Por isso, e pelo fato da contaminação microbiana ser a principal responsável pelas perdas em laboratórios de micropropagação, a presença de bactérias é comumente vista como contaminação, sendo que a cultura de tecidos sempre buscou a obtenção de plantas “axênicas”.

No entanto, nos últimos anos, o conceito de que as plantas devem ser “axênicas” para que seu cultivo *in vitro* seja possível, tem sido revisto, havendo estudos que comprovam a presença de comunidades microbianas em culturas visualmente saudáveis e mantidas *in vitro* por vários anos (ALMEIDA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2009; SCHERLING et al., 2009; ABREU-TARAZI et al., 2010). O fato de essas plantas apresentarem uma comunidade microbiana e serem visualmente saudáveis nos permite deduzir que pode existir uma convivência harmônica entre plantas cultivadas *in vitro* e microrganismos.

A eliminação dos microrganismos, algumas vezes endofíticos, na cultura de tecidos, por considerá-los contaminantes, pode em alguns casos se tornar um problema quando essas plantas “axênicas” são levadas a locais onde endofíticos importantes não são encontrados e resultar em perdas de vigor e surgimento de efeitos colaterais indesejados (AZEVEDO, 1998). Na cultura da batata, por exemplo, o uso de sistemas comerciais de micropropagação ocasionou a eliminação das bactérias endofíticas (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000), tanto as promotoras de

crescimento, como aquelas indutoras de resistência a doenças que habitavam seus tubérculos (STURZ, 1995). A eliminação dessas bactérias na busca por plantas “axênicas” pode provocar também o aumento do estresse biótico em plantas micropropagadas, ao serem transferidas para o campo, com conseqüente redução nas taxas de sobrevivência (GOSAL et al., 2010).

Diante desse contexto, diversos estudos investigaram os benefícios da inoculação artificial tanto de bactérias, como de fungos endofíticos, processo denominado “biotização”, comprovando seus benefícios (CANUTO et al., 2003; WEBER, et al., 2003; GOVINDARAJAN et al., 2006; AKELLO et al., 2008; SENTHILKUMAR et al., 2008; DIAS et al., 2009; GOSAL et al., 2010). Atualmente o processo de “biotização” é feito durante a fase de enraizamento *in vitro*, ou durante a aclimatização (GOSAL et al., 2010).

### **3.7 O uso de análises moleculares no estudo da composição microbiana de amostras ambientais**

Técnicas dependentes de cultivo e a identificação de isolados baseadas em testes bioquímicos e fisiológicos têm se caracterizado como abordagens clássicas no estudo de bactérias presentes em amostras ambientais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Estes métodos, no entanto, apresentam algumas limitações: não refletem de maneira acurada a estrutura da comunidade bacteriana e sim a seletividade do meio de cultura a certas bactérias; demandam tempo e não são representativos, pois apenas uma pequena fração (0,1 a 10%) das bactérias são cultiváveis pelos métodos atualmente disponíveis (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; THERON; CLOETE, 2000).

Experimentos realizados por Woese (1987), em 1985, mudaram radicalmente a maneira de como se via o mundo dos micróbios quando foi demonstrado que genes de rRNA (RNA ribossômico) funcionariam como relógios evolucionários. Na mesma época, Pace et al. (1986), destacaram a necessidade do desenvolvimento de técnicas não tradicionais para estudar os microrganismos pois a simples morfologia dos mesmos forneceria poucos subsídios para a sua identificação, além de que as características fisiológicas dos mesmos, muitas vezes são ambíguas.

As bactérias sintetizam três tipos de RNAs ribossômicos denominados 5S rRNA (~120 nucleotídeos), 16S rRNA (~1500 nucleotídeos) e 23S rRNA (~3000 nucleotídeos) (Figura 2), sendo que os eucariotos podem conter também um quarto rRNA, 5,8S (~160 nucleotídeos) (OLSEN et al., 1986). Os números 5, 5,8, 16 e 23 indicam o tamanho das moléculas medidas por análise de sedimentação (BROWN, 2002).



**Figura 2** - Organização do operon do rRNA ribossômico em bactérias (Adaptado de Brown, 2002)

Cada ribossomo é composto de duas subunidades principais. A primeira, 50S, denominada subunidade maior, é composta pelas moléculas de 23S RNA, 5S RNA, juntamente com 31 proteínas. A segunda, 30S, denominada subunidade menor, é composta pela molécula 16S RNA juntamente com 21 proteínas (WOODSON; LEONTIST, 1998).

Theron e Cloete (2000) relataram que os primeiros estudos de caracterização de amostras ambientais por meio de técnicas moleculares foram realizados utilizando-se moléculas de 5S rRNA, no entanto, os mesmos autores mencionaram que por se tratar de um fragmento relativamente pequeno, a variação nos nucleotídeos que o compõem não é suficiente em ecossistemas menos complexos. Desta forma, o gene 16S rRNA é hoje o mais utilizado em estudos de filogenia e taxonomia bacteriana.

Outras razões justificam a utilização deste gene: ele está presente em quase todas as bactérias, o que o torna um alvo universal para a sua identificação; a função deste gene não se alterou ao longo do tempo, sugerindo que alterações aleatórias em sua sequência (*Random Sequence Changes*) são mais acuradas para se medir evolução; este gene é longo o suficiente (~1500 pares de base) para análises por bioinformática (PATEL, 2001); e ainda há a disponibilidade de um imenso e crescente banco de dados de rRNA para a análise comparativa de sequências (MAIDAK et al., 1999; VAN DE PEER et al., 1999; LUDWIG et al., 2004).

As sequências de rRNA contém domínios altamente conservados, que são intercalados com regiões variáveis (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998). Através da comparação destas regiões variáveis, podem ser determinadas as relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos, permitindo a avaliação da diversidade em amostras ambientais bem como a detecção e quantificação de populações específicas (WEISBURG et al., 1991).

### 3.7.1 Construção de biblioteca genômica

Uma forma de se acessar a diversidade de comunidades complexas utilizando-se técnicas moleculares é pela construção de bibliotecas genômicas. Em linhas gerais, a construção de uma biblioteca genômica se inicia com a extração do DNA total da amostra, seguida da amplificação do fragmento de interesse, utilizando-se *primers* específicos. Os DNAs genômicos gerados, são ligados a vetores específicos, clonados e sequenciados. Utilizando-se ferramentas de bioinformática, as sequências são editadas para a remoção de bases de baixa qualidade (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998). Após a edição, podem ser comparadas com bancos de dados públicos e gratuitos (Ribossomal Database Project II; GenBank do NCBI; Ez Taxon-e Database; SILVA rRNA Database) contendo sequências previamente depositadas a fim de se identificar os indivíduos presentes naquela amostra (THERON; CLOETE, 2000).

Curvas de rarefação podem ser construídas para estimar o aumento do número de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) em função do número de clones sequenciados e inferir sobre a eficiência da amostragem. A estimativa da riqueza de filotipos da comunidade microbiana de amostras ambientais pode ser feita utilizando-se métodos paramétricos e não-paramétricos (BOHANNAN; HUGHES, 2003; SHEN; CHAO; LIN, 2003).

Dentre os métodos não-paramétricos mais utilizados estão os estimadores de riqueza baseado na frequência de UTOs raras como o estimador *Jackknife* (ZAHL, 1977), *ACE (Abundance-based Coverage Estimator)* (CHAO; MA; YANG, 1993) e *Chao1* (CHAO, 1984; CHAO; MA; YANG, 1993) que permitem estimativas também de acordo com o número de sequências. As medidas não-paramétricas de diversidade, foram inicialmente propostas por Simpson (1949), que sugeriu que a

diversidade é inversamente relatada pela probabilidade de que dois indivíduos escolhidos ao acaso pertencem à mesma espécie. O índice de *Shannon* ( $H'$ ) (SHANNON; WEANER, 1949) também tem sido muito utilizado como medida de diversidade e é considerada uma medida da incerteza de que duas sequências pertençam à mesma UTO, de forma que quanto maior o valor de  $H'$ , maior é a incerteza (KREBS, 1998).

### **3.7.2 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)**

Outra técnica molecular que tem sido muito utilizada é o *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP), a qual permite um rápido “fingerprint” de comunidades de microrganismos em amostras clínicas e ambientais. O T-RFLP é uma ferramenta sensível e apropriada para analisar as comunidades microbianas. Baseia-se na amplificação de ácidos nucléicos por Reação em Cadeira de Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e tem ganhado popularidade por permitir comparar diferentes comunidades de microrganismos derivadas de diferentes ambientes, por ser uma técnica rápida e de alta resolução (CONN; FRANCO, 2004).

Essa técnica foi originalmente desenvolvida por Avaniss-Aghajani et al. (1996) para a identificação de micobactérias em amostras clínicas. Liu et al. (1997) e Clement et al. (1998) demonstraram o potencial da técnica para analisar variações entre genes 16S amplificados de diferentes bactérias e obter informações sobre a estrutura de comunidades microbianas. Comparando o método de T-RFLP com DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), para fins de análise de comunidades complexas de planctons bacterianos marinhos. Moeseneder et al. (1999) obtiveram resultados similares, porém o T-RFLP foi capaz de detectar um maior número de UTOs.

A análise de T-RFLP determina o polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição terminal de um produto de amplificação por PCR digerido com enzimas de restrição. O DNA total da amostra é extraído e o gene 16S do rRNA bacteriano é amplificado por PCR, sendo um dos *primers* marcado com um fluoróforo (5-carboxyfluorescein). Os amplicons são então digeridos com enzimas de restrição e o comprimento dos fragmentos terminais marcados é determinado em

sequenciador automático. É um método muito sensível na detecção das mudanças na estrutura de comunidades bacterianas, além de possuir alta capacidade de processamento, podendo analisar muitas amostras em pouco tempo. O T-RFLP não é limitado apenas ao gene 16S rRNA, podendo ser usado como ferramenta para rápida visualização de diferenças entre comunidades baseando-se em qualquer gene (THIES; HOLMES; VACHOT, 2001).

### 3.7.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação de bactérias utilizando métodos dependentes de cultivo pode ser tendenciosa pelo fato destas poderem ser cultivadas somente se as suas demandas fisiológicas e metabólicas puderem ser reproduzidas *in vitro*. Além disso, o tempo para a obtenção dos resultados por essas técnicas pode torná-la inadequada quando é necessária uma resposta rápida (NADKARNI et al., 2002).

Essa quantificação, no entanto, também pode ser realizada por métodos moleculares. Mais recentemente, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), baseada na técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*), foi incorporada como mais uma ferramenta a ser usada para os estudos de comunidades bacterianas associadas às plantas (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAUJO, 2009).

Utilizando-se de sondas marcadas ou amplicons contendo moléculas fluorescentes, essa técnica permite o monitoramento do acúmulo destes em tempo real em uma PCR, permitindo o monitoramento e quantificação dos amplicons presentes na amostra. Essa técnica permite ainda, análises quantitativas e simultâneas de 2-3 genes, usando-se diferentes fluoróforos.

A técnica de qPCR tem sido comumente aplicada no estudo de amostras clínicas (BASSLER et al., 1995; PAHL et al., 1999), fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2002; DE BELLIS; SCHENA; CARIDDI, 2007) e bactérias e fungos endofíticos (LACAVA et al., 2006; QUECINE et al., 2012; SCHILIRO et al., 2012). Muitos destes estudos tiveram como objetivo o entendimento das respostas à inoculação de bactérias e fungos endofíticos a fim de se demonstrar seus benefícios e aplicações na agricultura.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Micropropagação de *Ananas comosus* var. *comosus* e *Aechmea nudicaulis* em meio líquido sob agitação e estático

Plantas *in vitro* de abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus* Coppens & F. Leal], cultivares Imperial e Pérola, utilizadas neste experimento, foram obtidas com a Dr<sup>a</sup> Fernanda Vidigal Duarte Souza da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. As mesmas foram provenientes de gemas da coroa e estavam no quinto subcultivo e meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,02 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido alfa-naftaleno acético). Enquanto as plantas *in vitro* de *Aechmea nudicaulis* Griseb foram obtidas no laboratório de Biotecnologia Vegetal do CENA/USP sendo provenientes da germinação *in vitro* de sementes e encontrando-se no quinto subcultivo. em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina).

Este experimento consistiu na comparação da multiplicação *in vitro*, dos materiais acima descritos, sob meio de cultura líquido estático e sob agitação. Em ambos os tratamentos, as plantas foram instaladas em frascos contendo 40 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de sacarose, BAP e ANA, nas concentrações acima apresentadas e pH 5,8 e autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

As culturas do tratamento em meio líquido sob agitação foram mantidas em agitador orbital (Innova™ 2300-New Brunswick Scientific) a 90 rpm. Ambos os tratamentos permaneceram em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Durante um período total de 105 dias, foram feitos dois subcultivos, aos 35 e 70 dias, realizados de maneira distinta para *An. comosus* var *comosus* e *Ae. nudicaulis*. Para a primeira espécie, as plantas com tamanho suficiente (~1 cm medido a partir da base até a folha mais expandida) eram cortadas ao meio, com auxílio de bisturi, com o objetivo de se quebrar a dominância apical e estimular a formação de novos brotos, enquanto as plantas com tamanho reduzido (menor que 1 cm) eram apenas individualizadas. Para as culturas de *Ae. nudicaulis*, os

agrupamentos de plantas eram cortados ao meio, pois as plantas apresentavam tamanho reduzido. Após a repicagem, o material vegetal obtido de cada frasco era dividido em duas partes iguais e cada parte transferida para um frasco contendo meio de cultura novo de mesma composição que o utilizado na instalação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por um frasco.

Para *An. comosus* var *comosus*, cada frasco foi instalado com 10 plantas cada, em ambos os tratamentos. No caso de *Ae. nudicaulis*, devido ao seu hábito de crescimento *in vitro* formando agrupamentos de plantas de tamanho reduzido, não foi possível a individualização das mesmas, utilizando-se 10 agrupamentos de plantas em cada frasco. A massa média das plantas individualizadas ou dos agrupamentos utilizados na instalação dos experimentos foi calculada pela pesagem de cinco repetições de 10 plantas cada, no caso de *An. comosus* var *comosus*, 'Imperial' e 'Pérola' e 7 repetições de 10 agrupamentos para *Ae. nudicaulis*. Os valores assim estimados foram 0,89g 1,06g e 0,99g, respectivamente.

Na ocasião da avaliação final (aos 105 dias) dos experimentos com *An. comosus* var *comosus*, devido à desuniformidade das plantas geradas, as mesmas foram quantificadas e classificadas por tamanho (0 a 2,5 cm; 2,5 a 5,0 cm e maior que 5,0 cm), medidas a partir da região de inserção da raiz até a ponta da folha mais expandida. Para *Ae. nudicaulis*, devido ao grande número de agrupamentos de plantas formados, o número de plantas foi estimado. A estimativa foi feita calculando-se a massa média de 10 repetições contendo 100 plantas cada.

Além do número de plantas, foram avaliados, os parâmetros de massa fresca e seca. Para isso, as plantas foram retiradas do frasco, depositadas sobre papel toalha para a retirada do excesso de meio de cultura e pesadas em balança analítica, obtendo-se a massa de matéria fresca total. Em seguida, as plantas provenientes de cada frasco foram acondicionadas em sacos de papel kraft e secas em estufas dotadas de sistema de circulação de ar, a uma temperatura de 70 °C, por 72 horas ou até que as amostras atingissem massa constante. Posteriormente, o material foi mantido em dessecador, contendo sílica gel, para evitar a reidratação da amostra, e a sua massa seca foi registrada.

## 4.2 Micropropagação de *Vriesea hieroglyphica* em diferentes sistemas de cultivo

As plantas *in vitro* de *Vriesea hieroglyphica* E. Morren, mantidas em frascos contendo meio de cultura ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido, encontravam-se no oitavo subcultivo e foram obtidas no laboratório de Biotecnologia Vegetal do CENA/USP. Estas foram utilizadas na instalação de dois experimentos. Sendo o primeiro comparando os tratamentos meio de cultura líquido estático e sob agitação e o segundo meio de cultura líquido estático e biorreator de imersão temporária (BIT).

Considerando-se que o meio de cultura sob agitação é visto como um sistema intermediário entre o meio líquido estático e o cultivo em BIT (TAKAYAMA; AKITA, 2006), inicialmente, instalou-se um experimento a fim de avaliar a resposta desta espécie a um sistema com melhor aeração, meio líquido sob agitação, em relação ao meio líquido estático. A partir dos resultados deste, considerou-se que a espécie poderia, potencialmente, responder também ao sistema BIT, sendo então instalado o experimento comparando o sistema BIT com o meio líquido estático.

No primeiro experimento, ambos os tratamentos foram instalados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> sacarose e 2 mg L<sup>-1</sup> BAP (6-benzylaminopurina), pH 5,8 e autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

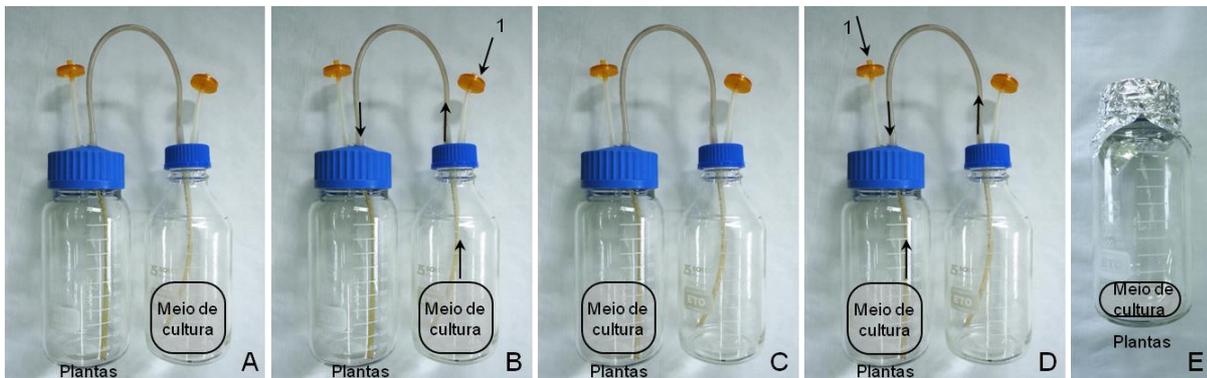
O tratamento em meio líquido sob agitação foi mantido em agitador orbital (Innova™ 2300-New Brunswick Scientific) a 90 rpm. Ambos os tratamentos permaneceram em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Durante um período total de 105 dias, foram realizados dois subcultivos, aos 35 e 70 dias. Devido ao tamanho reduzido das plantas, os agrupamentos de plantas formados eram separados ao meio. Após a repicagem das plantas de cada frasco, o material vegetal foi dividido em duas partes e cada parte transferida para um frasco contendo meio de cultura novo de mesma composição que o utilizado na instalação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por um frasco e cada frasco com 13 plantas (massa média de 0,89 g). A massa média das mesmas foi estimada pela contagem de sete repetições constituídas por 13 plantas cada.

Na ocasião da avaliação final, aos 105 dias, devido ao grande número de agrupamentos de plantas formados, o número de plantas foi estimado calculando-se a massa média de 10 repetições contendo 100 plantas cada. Além do número de plantas, foram avaliados os parâmetros de massa fresca e seca, conforme descrito no item 4.1.

Para o segundo experimento, comparando a micropropagação de *V. hieroglyphica* sob os tratamentos BIT e meio líquido estático, foram utilizados BITs constituídos por um conjunto de dois frascos com capacidade de 1 litro cada, sendo que, o frasco onde as plantas permanecem, possui uma abertura superior de 7,5 cm, enquanto o que contém o meio de cultura tem 4 cm de diâmetro. Esses frascos são conectados através de mangueiras a um sistema de bomba compressora e um timer que controla automaticamente as injeções de ar microfiltrado provocando a passagem do meio de cultura de um frasco para o outro, permitindo a imersão temporária das plantas por períodos definidos (Figura 3).



**Figura 3** - Sistema de funcionamento de biorreator de imersão temporária utilizado para a micropropagação de plantas (A-D) e frasco utilizado para o tratamento meio líquido estático (E). Sendo: momento de repouso (A); passagem do meio para o frasco com as plantas (B); momento de imersão (C); retorno do meio (D). A seta (1) indica o local de injeção de ar e as demais o sentido que o meio de cultura é impulsionado

O funcionamento do BIT pode ser assim descrito (Figura 3 A-D): o meio de cultura permanece no frasco da direita e as plantas no da esquerda (A); o ar microfiltrado (através de microfiltro 0,22  $\mu\text{m}$ ) é injetado no frasco da direita (seta 1) e o meio é impulsionado através da mangueira para o frasco da esquerda (B); a injeção de ar cessa e o meio permanece no frasco da esquerda juntamente com as plantas (C); o ar microfiltrado é injetado no frasco da esquerda (seta 1), e a pressão

gerada faz com que o meio retorne ao frasco da direita (D). E assim sucessivamente de acordo com o tempo e intervalo de imersão definidos para o experimento.

O mesmo tipo de frasco, de capacidade de 1 litro e com boca larga, que contém as plantas no BIT, foi utilizado para o cultivo das plantas sob o tratamento meio líquido estático (Figura 3 E).

Devido à intensa multiplicação observada nas plantas do primeiro experimento e com o objetivo de aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas, alterou-se o meio de cultura para MS completo acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> sacarose e 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Para cada BIT foram vertidos 400 mL de meio de cultura e 40 mL para cada frasco do tratamento líquido estático.

Foram estabelecidas 25 plantas de *V. hieroglyphica* em cada frasco de ambos os tratamentos. Em um período de 105 dias de cultivo foram realizadas três trocas de meio (aos 25, 50 e 75 dias), sendo que as duas primeiras foram feitas com o mesmo meio e volume utilizado na instalação. Na terceira troca utilizou-se o mesmo meio, mas sem a adição de BAP, buscando-se um aumento no crescimento em tamanho das plantas. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. O tempo de imersão do tratamento BIT foi de cinco minutos a cada hora.

Para o experimento comparando BIT e meio líquido estático, foram feitas coletas para análises moleculares na ocasião da instalação (0 dias) e na avaliação final (aos 105 dias). As coletas foram realizadas cortando-se, com auxílio de um bisturi, a parte aérea (a 0,2 cm da sua base) de oito plantas representativas de cada repetição. Para a remoção do meio de cultura da superfície das amostras, procedeu-se à lavagem das folhas coletadas em água destilada autoclavada.

Para confirmar a ausência de contaminações, para cada repetição, uma alíquota de 500 μL da água deionizada autoclavada, utilizada nesta lavagem, foi plaqueada em meio de cultivo TSA (*Tryptic Soy Agar*, Difco) e incubada a 28 °C por sete dias. As amostras de plantas que não apresentaram crescimento bacteriano diante desse teste, foram armazenadas em ultra-freezer (-80 °C) para posteriores análises moleculares da comunidade bacteriana presente.

Na ocasião da coleta final também avaliaram-se os parâmetros de massa fresca e seca, conforme descrito no item 4.1.

### 4.3 Análise por T-RFLP da comunidade bacteriana de culturas *in vitro* de *Dyckia distachya*

Devido às diferenças observadas em um experimento de micropropagação com *Dyckia distachya* Hassler conduzido pela mestrandia Karina Salomão, também orientada da Prof<sup>a</sup>. Adriana Pinheiro Martinelli, em paralelo aos experimentos anteriores, decidiu-se utilizar parte dessas plantas para análises moleculares da comunidade bacteriana. Outro fato que motivou a análise dessas plantas foi o recente estabelecimento *in vitro* desta espécie.

Conforme metodologia descrita por Salomão (2013), as sementes de *D. distachya* foram germinadas em placas de Petri contendo meio de cultura ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH a 5,8. Plântulas germinadas e cultivadas *in vitro* por 60 dias foram transferidas para meio de multiplicação MS com adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,19 mg L<sup>-1</sup> ANA (ácido naftalenoacético) e 0,43 mg L<sup>-1</sup> CIN (cinetina). Foram utilizados três estados físicos de meio de cultura [semisólido com 0,8% de ágar, líquido estático e sob agitação de 60 rpm em agitador orbital (Innova™ 2300-New Brunswick Scientific)].

Cada tratamento foi composto por seis repetições, cada uma composta por um frasco contendo cinco plântulas no primeiro subcultivo. No segundo subcultivo foram consideradas seis repetições com dez plântulas e do terceiro ao quinto subcultivo, 18 repetições com dez plântulas. Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias (SALOMÃO, 2013). No quinto subcultivo foram extraídos os dados de matéria fresca e matéria seca conforme descrito no item 4.1.

As amostras para análises moleculares do presente trabalho foram coletadas na ocasião do segundo subcultivo (120 dias *in vitro*). Com auxílio de um bisturi coletou-se a parte aérea de 4 a 6 plantas representativas de cada frasco. Procedeu-se à lavagem das folhas coletadas em água destilada autoclavada. Para confirmar a ausência de contaminações, para cada repetição, uma alíquota de 500 µL da água deionizada autoclavada, utilizada nesta lavagem, foi plaqueada em meio de cultivo TSA (*Tryptic Soy Agar*, Difco) e incubada a 28 °C por sete dias. As amostras de plantas que não apresentaram crescimento bacteriano diante desse teste, foram armazenadas em ultra-freezer (-80 °C) para posterior análise da comunidade bacteriana por T-RFLP.

Na ocasião da coleta de folhas para análises moleculares foi possível observar que as plantas do tratamento líquido sob agitação eram maiores, tanto em relação às do tratamento líquido estático, como do semissólido, e visivelmente com melhor multiplicação em relação ao tratamento semissólido. Desta forma, considerou-se que o material vegetal proveniente deste experimento foi interessante para a avaliação da comunidade bacteriana. Uma melhor discussão sobre os resultados deste trabalho podem ser obtidos na dissertação de Salomão (2013).

As amostras de folhas de *D. distachya*, coletadas do experimento acima descrito, foram analisadas por T-RFLP conforme nos itens a seguir para a avaliação da comunidade bacteriana presente nas mesmas.

#### **4.3.1 Extração do DNA genômico total**

O DNA genômico de cada repetição foi extraído em triplicata, a partir de 0,02 g de material vegetal macerado sob nitrogênio líquido, utilizando-se o kit *Plant DNAzol Reagent* (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante, sendo ao final ressuspenso em 14  $\mu\text{L}$  de TE (Tris 1 M pH 8/ EDTA 0,5 M pH 8).

A qualidade da extração e integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB 1x (BRODY; KERN, 2004), corado com GelRed™ (Biotium) (1,5  $\mu\text{L}$  50  $\text{mL}^{-1}$  de gel), carregado com 1  $\mu\text{L}$  do DNA adicionado de 1  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicose). Como padrão de tamanhos de banda de DNA utilizou-se *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen). Após 30 minutos de eletroforese a 80 Volts, os géis foram observados sob luz ultravioleta e registrados em transluminador L.PIX (Loccus Biotecnologia, São Paulo – SP).

A quantificação do DNA extraído foi feita em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) e a partir do resultado deste, quando necessário, foi realizada a diluição do DNA em água Mili-Q autoclavada para aproximadamente 50  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

#### 4.3.2 Amplificação do gene 16S rRNA de bactéria

As condições assépticas nas quais as plantas em cultivo *in vitro* são mantidas nos permite deduzir que a quantidade de microrganismos encontrada seria muito pequena. Desta forma, seguindo a estratégia de Gonzalez, Portillo e Saiz-Jimenez (2005), após a extração do DNA total, o gene 16S rRNA (~1500 pb) de todas as amostras, foi pré-amplificado com os *primers* universais fD1 e rD1, e posteriormente com os *primers* internos 799f e 1492r (~735 pb) (Tabela 1).

**Tabela 1** - *Primers* utilizados nas reações de PCR e programas no termociclador para a amplificação das sequências do gene 16S rRNA

<i>Primer</i> *	Sequência 5'→ 3'	Conjunto de <i>primers</i> e tamanho de fragmento	Programa do termociclador	Referência
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	fD1/ rD1	96 °C 4'; 30 ciclos: 94 °C 1', 55 °C 30", 72 °C 2'; 72 °C 10'	Weisburg et al. (1991)
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	~1500 pb		
799f	AACMGGATTAGATACCCKG	799F/ 1492R**	95 °C 3'; 35 ciclos: 94 °C 20", 54 °C 40", 72 °C 40"; 72 °C 7'	Chelius e Triplett (2001)
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	~735 pb		

Nota \*f: *forward primer*, r: *reverse primer*, \*\**Nested-PCR*: utilizaram-se como molde os produtos purificados resultantes da amplificação com o conjunto rD1/fD1.

Para cada amostra a reação foi feita em volume total de 50  $\mu\text{L}$ , sendo 37,7  $\mu\text{L}$  água Milli-Q autoclavada, 5  $\mu\text{L}$  Buffer 10X PCR; 1,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  50 mM; 0,5  $\mu\text{L}$  dNTP's 10 mM; 2  $\mu\text{L}$  *primer* fD1 e rD1 (5 pmoles); 30 a 50 ng de DNA extraído; 0,3  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA Polymerase 5U  $\mu\text{L}^{-1}$ . A reação foi feita em termociclador (GeneAMP PCR System 9700 – Applied Biosystems) nas condições descritas na Tabela 1.

A amplificação do fragmento de interesse (~1500 pb) foi em seguida verificada em gel de agarose 1% (p/v) preparado conforme descrito no item 4.3.1, e carregado com 1  $\mu\text{L}$  do produto da PCR. Posteriormente os produtos da PCR foram purificados com o Kit *Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as instruções do fabricante, sendo ao final ressuspensa em 40  $\mu\text{L}$  do *Elution Buffer Type 4*.

Para evitar a amplificação de DNA mitocondrial e cloroplastidial da planta juntamente com o DNA bacteriano, em seguida foi realizada *Nested-PCR* em um volume total de 50  $\mu\text{L}$  contendo 35,2  $\mu\text{L}$  água Milli-Q autoclavada, 5  $\mu\text{L}$  Buffer 10X PCR; 2,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  50 mM; 0,5  $\mu\text{L}$  dNTP's 10 mM; 0,5  $\mu\text{L}$  BSA (*Bovine Serum Albumin*) 100x; 2  $\mu\text{L}$  dos primers 799f (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) marcado com 6-carboxyfluorescein (6-FAM) na extremidade 5' e 1492r (HEUER et al., 1997) (Tabela 1) (5 pmoles); 0,3  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA Polymerase 5U  $\mu\text{L}^{-1}$ ; 2  $\mu\text{L}$  do produto da reação de PCR com os *primers* fD1 e rD1 purificado. A reação foi feita em termociclador (GeneAMP PCR System 9700 – Applied Biosystems) nas condições apresentadas na Tabela 1. A amplificação do fragmento gerado (~735 pb) foi em seguida verificada em gel de agarose 1% (p/v) preparado conforme descrito no item 4.3.1 e carregado com 1  $\mu\text{L}$  do produto da PCR.

### 4.3.3 Separação dos fragmentos de interesse por eletroforese

Após a *Nested-PCR* e a checagem de que o fragmento de interesse (~735 pb) havia sido gerado, todo o restante do produto (49  $\mu\text{L}$ ), adicionado de 5  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicose), foi carregado em gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão de corrida TSB (BRODY; KERN, 2004) corado com GelRed™ (Biotium) (1,5  $\mu\text{L}$  50  $\text{mL}^{-1}$  de gel). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado Low DNA Mass Ladder (Life Technologies). A eletroforese foi realizada a 80 Volts por um período de 4 a 5 horas para ocorrer a

separação das bandas. Durante a eletroforese a cuba foi protegida com papel aluminizado a fim de reduzir a exposição à luz e a degradação da fluorescência do *primer* marcado.

Após a eletroforese, a banda correspondente aos microrganismos endofíticos (~735 pb) foi cortada do gel com auxílio de bisturi e purificada com o *Kit Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as instruções do fabricante, sendo ao final ressuspendida em 20 µL do tampão *Elution Buffer Type 4*, dos quais, 3 µL foram utilizados para a checagem em gel de agarose 1% (p/v), conforme descrito no item 4.3.1 para a checagem de que a banda cortada era a correta. O produto foi armazenado em freezer -20 °C para posteriores análises moleculares.

#### 4.3.4 Digestão com enzimas de restrição e precipitação

O DNA utilizado para a digestão foi o fragmento de aproximadamente 735 pb amplificado na *Nested-PCR* (*primers* 799f FAM e 1492r) e recuperado do gel de agarose 0,8% (p/v) após a eletroforese. Cada repetição dos experimentos de micropropagação teve as análises de T-RFLP realizadas em triplicata.

As reações de digestão foram feitas em mix contendo 0,06 µL da enzima de restrição (10 U µL<sup>-1</sup>) (*MspI* e *HhaI*); 1,5 µL de tampão específico de cada enzima; 5 µL de produto de PCR purificado e água Mili-Q autoclavada completando um volume final de 15 µL. As digestões com as enzimas *MspI* e *HhaI* foram feitas e analisadas separadamente. A digestão foi realizada em termociclador (GeneAMP PCR System 9700 – Applied Biosystems) nas seguintes condições: 37 °C por 3 horas e 68 °C por 10 min para a inativação da enzima. As enzimas de restrição utilizadas e suas respectivas soluções tampão constam na Tabela 2.

**Tabela 2** - Enzimas de restrição utilizadas para a digestão dos fragmentos de DNA em *Dyckia distachya*

Enzima	Sítio de Corte	Tampão	Fabricante
<i>MspI</i>	C_CGG	Buffer tango with BSA	Fermentas
<i>HhaI</i>	GCG_C	Buffer tango with BSA	Fermentas

Após a digestão, as amostras foram precipitadas adicionando-se 2 µL do tampão acetato de sódio/ EDTA e 60 µL de etanol (100%), centrifugou-se a 4.000 rpm, por 45 minutos, a 20 °C. Descartou-se o sobrenadante por inversão da placa e adicionaram-se 150 µL de etanol (70%), centrifugou-se a 4.000 rpm por 45 minutos, a 20 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e o precipitado seco em estufa, a 50 °C por 8 minutos.

#### **4.3.5 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP)**

Os produtos de digestão precipitados foram ressuspensos em 9,75 µL Formamida Hi-Di e 0,25 µL do padrão de comprimento *GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard* (Life Technologies) para realização da análise de fragmentos no sequenciador *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Life Technologies). Antes do carregamento, as amostras foram desnaturadas por 5 minutos, a 95 °C, e resfriadas em gelo por 4 minutos. A determinação do comprimento dos fragmentos terminais de restrição (T-RFs) foi feita através do software *GeneMapper® 3.0* (Life Technologies), com base na comparação com o padrão. Os dados foram exportados para uma planilha eletrônica (*Excel*, Microsoft).

#### **4.3.6 Processamento dos dados de T-RFLP**

Após a realização da análise de T-RFLP no sequenciador automático (*ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* – Life Technologies), os dados obtidos foram primeiramente analisados com o programa *GeneMapper® 3.0* (Life Technologies), sendo verificados visualmente para conferência da qualidade das corridas.

Uma unidade base limite de 50 unidades de fluorescência foi usada para discriminar os “picos verdadeiros” dos ruídos do *background* e T-RFs maiores que 800 pares de base e menores que 50 foram eliminados de todos os dados (CULMAN et al., 2008).

Os dados de altura dos picos (unidades de fluorescência) foram transformados em dados relativos, onde os valores absolutos, referentes à intensidade dos picos no eletroferograma, e correspondentes aos comprimentos dos

fragmentos, foram apresentados na forma de valores percentuais de detecção. Essa transformação dos dados foi calculada dividindo-se cada valor de tamanho de pico pelo valor total dos picos de uma amostra. Isso é análogo a transformar cada altura de pico em dados de porcentagem, em relação ao total de valores de altura de pico em uma amostra (CULMAN et al., 2008).

Essa matriz de dados foi utilizada para cálculos de índice de diversidade de *Shannon* de cada amostra para cada enzima utilizando-se o programa *Primer 6* (Plymouth Marine Laboratory, Primer E, Reino Unido), e a análise de comparação de médias pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Também com os dados normalizados e no programa *Primer 6*, a avaliação dos T-RFs obtidos do T-RFLP foi realizada pela análise em escala multidimensional (*multidimensional scaling*, MDS), utilizando o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957).

#### **4.4 Micropropagação de cana-de-açúcar em BIT e em meio líquido estático e análise da comunidade bacteriana**

As plantas *in vitro* de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., variedade SP80-3280), em fase de multiplicação, utilizadas neste experimento, foram cedidas pelo Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald, UFSCAR, Araras, SP e estavam em fase de multiplicação em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> sacarose, 0,2 g L<sup>-1</sup> BAP (6-benzilaminopurina) e 0,1 g L<sup>-1</sup> cinetina.

Para a obtenção de material suficiente para a instalação do experimento, foi realizada a multiplicação das plantas em frascos contendo 20 mL do mesmo meio no qual as mesmas estavam mantidas e com pH 5,8 e autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Os subcultivos foram realizados a cada 15 dias, removendo-se o excesso de folhas e dividindo-se as plantas contidas em cada frasco em dois e transferindo cada metade para um frasco novo contendo meio de cultura fresco. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de  $26 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Para a instalação do experimento comparando a micropropagação de cana-de-açúcar em sistema de biorreator de imersão temporária (BIT) e meio de cultura líquido estático, foram utilizados os mesmos sistemas descritos no item 4.2 para o experimento com *Vriesea hieroglyphica*. O meio de cultura utilizado foi o MS

acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e pH 5,8, o volume vertido em cada BIT foi de 500 mL e em cada frasco do tratamento estático 50 mL, sendo em seguida autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

Cada frasco, tanto do tratamento BIT como no estático, foi estabelecido com 14 plantas de cana-de-açúcar, com massa fresca média (1,92 g), estimada pela pesagem de 7 repetições de 20 plantas cada. Em um período total de 45 dias de cultivo foram realizadas duas trocas de meio (aos 19 e 34 dias) sem que as plantas fossem repicadas. A primeira troca foi feita com o mesmo meio de cultura e volume utilizado na instalação e na segunda utilizou-se o mesmo meio de cultura, mas sem a adição de BAP, sendo o volume foi aumentado para 600 mL no tratamento BIT e 60 mL no estático.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. O intervalo entre as imersões foi de uma hora e o tempo de imersão de cinco minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento, sendo cada repetição composta por um BIT, ou um frasco.

Neste experimento foram realizadas coletas destinadas às análises moleculares: T-RFLP, construção de bibliotecas de clone do gene 16S rRNA e PCR quantitativo em tempo real. Com este objetivo, foram amostradas folhas de 5 a 8 plantas (aproximadamente 1,5 g) representativas de cada repetição no momento da instalação do experimento e na avaliação final (após 45 dias de cultivo).

Para a remoção do meio de cultura da superfície do material coletado, procedeu-se à lavagem das folhas coletadas em água destilada autoclavada. Para confirmar a ausência de contaminações, para cada repetição, uma alíquota de 500 μL da água deionizada autoclavada, utilizada nesta lavagem, foi plaqueada em meio de cultivo TSA (*Tryptic Soy Agar*, Difco) e incubada a 28 °C por sete dias. As amostras que não apresentaram crescimento bacteriano diante desse teste, foram armazenadas em ultra-freezer (-80 °C) para posteriores análises moleculares da comunidade bacteriana.

Ao final do experimento avaliaram-se o número de plantas maiores que 1,5 cm e a massa fresca e seca conforme descrito no item 4.1.

Para permitir a análise de variância, os dados de massa fresca e seca foram transformados (1/√x). Enquanto para os dados de número de plantas maiores que

1,5 cm, foi realizado o ajuste do modelo binomial negativo e a adequação deste modelo verificada pela análise dos resíduos, utilizando-se o gráfico semi-normal de probabilidade com envelope de simulação.

#### 4.4.1 Análises por microscopia de luz

Com o objetivo de avaliar as características morfoanatômicas das folhas em ambos os tratamentos e observar se existe diferença anatômica entre as folhas de cana-de-açúcar sob os tratamentos BIT e meio líquido estático, amostraram-se as cinco repetições tanto do tratamento BIT, como tratamento líquido estático. De cada repetição selecionaram-se três plantas representativas e de cada uma delas retiraram-se, três segmentos da parte mediana de uma folha expandida, totalizando 45 segmentos de folha para cada tratamento.

Os tecidos foliares amostrados foram fixados em solução de Karnovsky (1965) modificada [(glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%),  $\text{CaCl}_2$  (0,001 M), em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2)] por 48 horas, a 4 °C. Posteriormente foram desidratados em série etílica (35% a 100%). A infiltração foi feita lentamente em etanol: meio de infiltração (Historesina, Leica). As amostras foram emblocadas em kit de historesina, segundo recomendação do fabricante. Os cortes histológicos (5  $\mu\text{m}$  de espessura) foram obtidos em ultramicrótomo RM 2155 (Leica, Alemanha) e corados com fucsina ácida (1% em água), seguido de azul de toluidina (0,05%) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram cobertos com Entelan® e lamínula, sendo posteriormente analisados ao microscópio Leica LMD CTR 6500, onde as imagens foram digitalizadas.

A partir das imagens obtidas elegeram-se sete imagens que eram representativas do tratamento em questão e as mesmas foram utilizadas na avaliação da espessura da folha. Utilizando-se o programa *ImageJ* (RASBAND, 2012), foram realizadas três medidas em regiões de feixes vasculares, de forma que foram totalizadas 21 medições para cada tratamento.

#### **4.4.2 Análises por microscopia eletrônica de varredura**

Para visualização da colonização por bactérias endofíticas nas plantas de cana-de-açúcar provenientes dos experimentos BIT e meio de cultura líquido estático, amostraram-se cinco repetições. De cada repetição selecionaram-se três plantas representativas e de cada uma das plantas retiraram-se, com auxílio de uma lâmina, dois segmentos da parte mediana de uma folha expandida, totalizando 30 segmentos de folhas para cada tratamento.

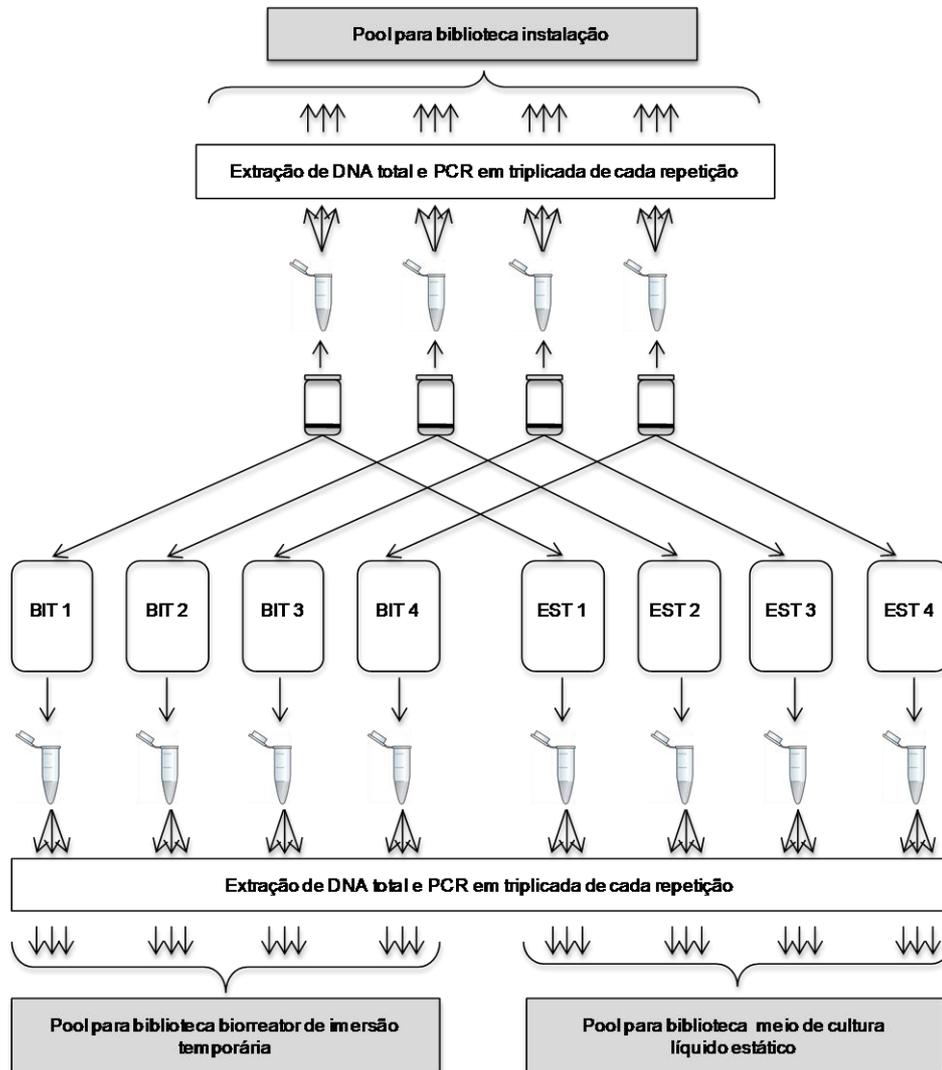
Conforme o método de Tanaka e Nagaya (1980), adaptado por Kitajima e Leite (1999), as amostras foram fixadas em solução Karnovsky (1965) modificado [(glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%),  $\text{CaCl}_2$  (0,001 M em tampão cacodilato 0,05 M; pH 7,2)] por 12 horas, a 4 °C, e substituídas por glicerol (30%), durante 30 minutos. Após o resfriamento das amostras em nitrogênio líquido, as mesmas foram induzidas à clivagem com auxílio de um bisturi. Pequenas porções dos tecidos assim criofraturadas foram transferidas para tubos eppendorf (1,5 mL) contendo solução de tetróxido de ósmio (1%) onde permaneceram por 2 horas. Seguiram-se três lavagens em água e desidratação seriada em acetona 25; 50; 75% (por 5 minutos em cada solução), 90% (2 vezes de 10 minutos) e 100% (3 vezes, 20 minutos cada). Em seguida, as amostras foram secas ao ponto crítico (Balzers CPD 030) sob  $\text{CO}_2$  líquido e montadas em suportes metálicos, metalizadas com ouro durante 180 segundos em metalizador (MED 010 Balzers) e observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss Leo-435 VP), a 20 KV, no qual micrografias digitalizadas foram obtidas. A secagem ao ponto crítico, metalização e observação ao microscópio eletrônico foram feitas no NAP/MEPA, ESALQ/USP.

#### **4.4.3 Análise por T-RFLP da comunidade bacteriana de culturas *in vitro* de cana-de-açúcar**

As amostras coletadas do experimento de cana-de-açúcar em BIT e meio de cultura líquido estático foram analisadas por T-RFLP utilizando-se a metodologia descrita no item 4.3. Tendo sido alterado apenas o tampão utilizado na eletroforese (item 4.3.3) para TAE (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,0).

#### **4.4.4 Construção de biblioteca de clones com amostras de culturas *in vitro* de cana-de-açúcar**

Para o experimento comparando os tratamentos BIT e meio de cultura líquido estático em culturas de cana-de-açúcar foram construídas três bibliotecas de clones do gene 16S rRNA (Figura 4). A primeira foi realizada com as amostras coletadas no dia de instalação do experimento e as outras duas com amostras de folhas coletadas de cada tratamento ao final do experimento. O objetivo foi avaliar se houve alteração na comunidade durante o período de cultivo *in vitro* em questão e se havia diferença entre a comunidade do tratamento BIT, o qual apresentou melhor desempenho nos parâmetros produção de mudas, massa fresca, massa seca, em relação ao tratamento meio de cultura líquido estático.



**Figura 4** - Esquema dos pontos de escolha para a construção das bibliotecas de clones do gene 16S rRNA de *Bacteria* para o experimento de cana-de-açúcar comparando os tratamentos biorreator de imersão temporária e meio líquido estático. As bibliotecas construídas se referem a: folhas coletadas na data de instalação do experimento e folhas coletadas ao final do experimento de ambos os tratamentos

Para a obtenção dos fragmentos de DNA utilizados na construção das bibliotecas, foram realizadas as extrações de DNA das amostras (conforme descrito no item 4.3.1), a pré-amplificação do gene 16S rRNA com os *primers* fD1 e rD1 e posteriormente com os *primers* internos 799f e 1492r (conforme descrito no item 4.3.2) e a separação dos fragmentos de interesse por eletroforese (conforme item 4.3.3) em tampão TAE (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,0).

- **Clonagem dos fragmentos do gene 16S rRNA**

Após a separação por eletroforese, corte e purificação da banda referente aos microrganismos presentes nas folhas de cana-de-açúcar este produto foi clonado em vetor *pGEM-T Easy*, de acordo com as instruções do fabricante do Kit *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I* (Promega). A reação de ligação foi realizada utilizando 1  $\mu\text{L}$  T4 DNA Ligase (3U/ $\mu\text{l}$ ); 5  $\mu\text{L}$  tampão T4 Ligase 1X; aproximadamente 33 ng DNA proveniente da banda cortada do gel de agarose purificada; e 1  $\mu\text{L}$  (50 ng) vetor *pGEM-T Easy Vector* (Promega). A reação de ligação foi incubada a 4 °C, *overnight*, para máxima eficiência de ligação.

- **Transformação de *Escherichia coli***

No dia seguinte à reação de ligação, 5  $\mu\text{L}$  da solução contendo os fragmentos clonados foram adicionados a 20  $\mu\text{L}$  de tampão de transformação (1 mL KCM 10x, 1,5 mL PEG 10% e 7,5 mL de água). Em seguida adicionou-se cuidadosamente à solução de ligação adicionada de tampão de transformação, 100  $\mu\text{L}$  de células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  e a mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e em seguida em temperatura ambiente por mais 10 minutos. Foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de meio LB líquido, mantido à temperatura ambiente, e as células foram então incubadas por 90 minutos, a 37 °C, sob agitação de 250 rpm.

As células competentes transformadas foram plaqueadas em cinco placas de Petri (100  $\mu\text{L}$  placa<sup>-1</sup>) contendo meio LB sólido, acrescido de ampicilina, X-Gal e IPTG (todos em concentração final de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubadas em estufa a 37 °C, por 16 horas. Após este período, as placas foram armazenadas a 4 °C para facilitar a visualização e a seleção das colônias azuis/ brancas.

- **Seleção dos clones e PCR de inserto**

As colônias bacterianas contendo o inserto, e que por isso adquiriram coloração branca, foram coletadas com o auxílio de palitos estéreis e transferidas para microplaca de 96 poços, contendo 50  $\mu\text{L}$  de TE (Tris 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8). Para a extração do DNA das células em suspensão, a placa foi submetida a 95 °C, por 10 minutos em termociclador.

Para as reações de amplificação da região do vetor contendo o inserto do gene 16S rRNA de endofítos, foram utilizados os *primers* M13f (5' GCCAGGGTTTTCCCAGTCACG 3') e M13r (5' GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG 3') (HUEY; HALL, 1989). As reações foram realizadas em mix contendo: 2,5 µL tampão para PCR 10X; 0,75 µL MgCl<sub>2</sub>; 0,25 µL dNTP 10 mM; 0,2 µL de Platinum® Taq Polimerase 5U (Invitrogen); 1 µL de cada *primer* (5 pmoles); 1 µL da amostra de DNA extraído das colônias; e água Mili-Q autoclavada completando volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (GeneAMP PCR System 9700 – Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C, por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95 °C, por 30 segundos; 52 °C, por 30 segundos; 72 °C, por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C, por 10 minutos. O resultado desta amplificação foi visualizado em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004) com 1,5 µL do produto usando como padrão 1 µL de *100pb Ladder* (Invitrogen Technology).

Verificada a amplificação, os produtos de PCR foram purificados adicionando-se ao produto de PCR, três partes de isopropanol (100%) e uma parte de água Mili-Q autoclavada. A mistura foi agitada levemente em vortex e incubada a -20 °C *overnight*. Após este tempo de incubação, centrifugou-se a mistura a 4000 rpm por 90 minutos a 20 °C e ao final com desaceleração de 30 em 30 rpm (Centrifuga modelo 5804R, Eppendorf). O sobrenadante foi removido por inversão, a placa invertida foi submetida a um pulso em centrifuga sobre papel absorvente. Foram adicionados 150 µL de etanol (70%) e centrifugado a 4.000 rpm por 90 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa invertida foi submetida a um pulso em centrifuga sobre papel absorvente. As amostras foram secas em estufa a 50 °C por 8 minutos e ressuspendidas em 20 µL de água esterilizada e armazenadas em freezer a -20 °C, até o próximo passo.

- **PCR de sequenciamento e precipitação**

Confirmada a amplificação do inserto, foi realizada a reação de PCR de sequenciamento em microplaca 96 poços, em mix contendo 2 µL tampão para PCR 2,5X; 1 µL Produto da PCR purificado; 1 µL *primer* M13F; 2 µL *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* kit (Life Technologies) e água Mili-Q autoclavada

completando volume final de 10  $\mu$ L. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador (GeneAMP PCR System 9700 – Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96 °C, por 1 minuto; seguido de 25 ciclos a 96 °C, por 10 segundos; 52 °C, por 30 segundos; e extensão a 60 °C, por 1 minuto.

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas pela adição de 2  $\mu$ L de acetato de sódio EDTA e 60  $\mu$ L de etanol (100%) em cada poço da placa, homogeneizando-se a mistura 5 vezes com a própria ponteira. O material foi centrifugado a 4.000 rpm, por 45 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi removido por inversão sobre papel absorvente. Foram adicionados 150  $\mu$ L de etanol (70%) (diluído em água Mili-Q autoclavada imediatamente antes do uso), centrifugado a 4.000 rpm, por 45 minutos a 20° C. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa seca em estufa a 50 °C, por 8 minutos.

As amostras foram ressuspensas em 10  $\mu$ L de Formamida Hi-Di (Life Technologies) e o sequenciamento dos clones foi realizado no sequenciador capilar automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyser* (Life Technologies).

- **Análise das sequências**

As sequências brutas geradas foram analisadas no site RDP - *Ribosomal Database Project, versão 10, update 31* (<https://rdp.cme.msu.edu>) (COLE et al., 2009), na ferramenta *Pipeline* para a remoção de vetor, e edição sequências. Os parâmetros de exigência foram: qualidade de bases por PHRED,  $Q \geq 20$ , máximo de um erro a cada 100 bases lidas (EWING; GREEN, 1998) e tamanho mínimo da sequência de 400 pb. As sequências consideradas boas foram analisadas quanto à taxonomia pela ferramenta *Classifier* (*Ribosomal Database Project, release 10, update 31*), bem como no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) na ferramenta *Nucleotide blast*. As mesmas sequências foram alinhadas no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) e as curvas de rarefação foram geradas no programa MOTHUR v.1.23.1 (SCHLOSS et al., 2009) estabelecendo-se um *cut-off* de 97% de similaridade. As sequências representativas das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) identificadas foram inseridas na ferramenta *Nucleotide blast* no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a busca de sequências de referência depositadas no banco de dados.

Utilizando-se o programa MOTHUR, foram gerados os índices de diversidade de *Shannon* e *Simpson* e os estimadores de riqueza não-paramétricos *ACE* (*Abundance-based Coverage Estimator*), *Chao1* e *Jackknife*. O estimador de riqueza *Chao1* é baseado em *singletons* (espécie com somente um indivíduo) e *doubletons* (espécies com dois indivíduos), *ACE* é baseado na distribuição de espécies abundantes (>10) e raras (HUGHES et al., 2001). Foi feita, ainda, a análise  $\chi^2$ -Libshuff (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004), integrada na plataforma MOTHUR, para determinar se houve diferença estatisticamente significativa na composição da comunidade bacteriana entre as bibliotecas analisadas.

- **Construções filogenéticas**

Para os agrupamentos filogenéticos, as sequências representativas das UTOs das três bibliotecas foram alinhadas no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) com as sequências de referência encontradas no NCBI, construindo-se a árvore filogenética usando-se o método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987). baseado nas distâncias determinadas pelo método *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004). O grau de confiabilidade da árvore foi avaliado pelo teste probabilístico *bootstrap* (SITNIKOVA; RZHETSKY; NEI, 1995) originado a partir de 1000 repetições.

#### 4.4.5 PCR quantitativo em tempo real para o gene 16S rRNA de *Bacteria*

Análises de PCR quantitativo tiveram como objetivo quantificar o número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* presente nas amostras de folhas de cana-de-açúcar coletadas no momento da instalação do experimento e aos 45 dias de cultivo *in vitro* sob os tratamentos em biorreator de imersão temporária e meio de cultura líquido estático.

As amplificações de cada repetição do experimento de micropropagação, bem como da curva padrão, foram feitas triplicatas (réplicas técnicas). Como padrão para comparações, foi utilizado o gene ribossomal 16S rRNA. As reações foram feitas no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Life Technologies), utilizando o sistema *SYBR® Green-Based RT-PCR Reagents Kit* (Life Technologies).

A reação de amplificação do gene 16S rRNA foi realizada com os *primers* universais para o domínio *Bacteria*: U968F e R1387 (Tabela 3), os quais geram um fragmento de ~400 pb. Os valores de Ct (Cycle threshold) foram utilizados como normalizadores para determinar a quantidade de DNA passível de amplificação em cada uma das amostras. Tais valores refletem o número de ciclos que a fluorescência gerou dentro do limite de uma curva padrão. O valor atribuído a um Ct mostra o ponto no qual um número suficiente de amplicons foi acumulado significativamente acima da linha de base durante a reação.

**Tabela 3** - *Primers* utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real na amplificação parcial do gene 16S rRNA bacteriano

<i>Primer</i>	Sequência 5'→3'	Fragmento (pb)	Referência
U968F	AACGCGAAGAACCTTAC	~ 400	Heuer et al. (1997)
R1387	CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG		

As reações de qPCR foram realizadas em volume total de 10 µL contendo 5 µL de SYBR® *Green-Based RT-PCR Reagents Kit* (Life Technologies), 2,5 µM de cada primer (U968F e R1387) e ~100 ng de DNA. A amplificação do gene foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95 °C por 15 segundos, 56 °C por 1 minuto e a temperatura foi elevada até 95 °C por 15 segundos, com leitura de dados a cada 0,7 °C. Diluições de um clone obtido a partir de uma biblioteca contendo o gene 16S rRNA foram utilizadas para a obtenção da curva padrão. Os plasmídeos foram quantificados em um espectrofotômetro (190 a 840 nm – NanoDrop® ND-1000) e diluídos para construir uma curva padrão de 10<sup>3</sup> a 10<sup>8</sup> cópias do gene µL<sup>-1</sup>.

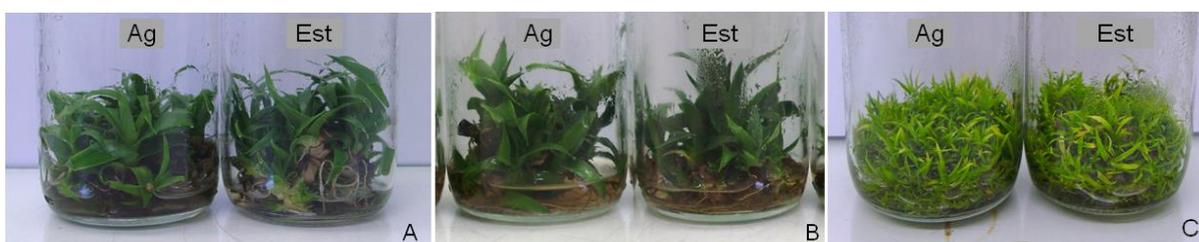
Para verificar se houve diferença entre o número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* encontrado em cada tratamento foi realizada a análise da variância, com nível de significância de (p<0,05), utilizando-se o programa estatístico SAS Institute Inc. (SAS, 2004).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

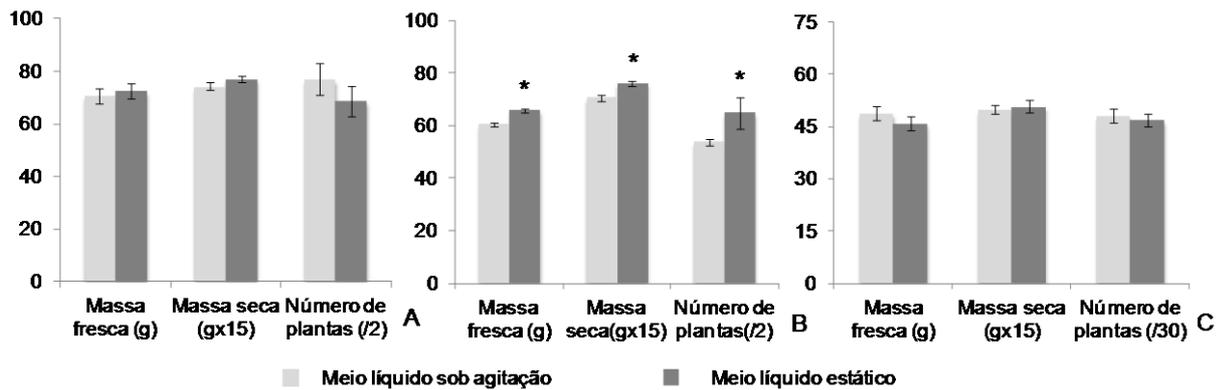
### 5.1 Micropropagação de *Ananas comosus* var *comosus* e *Aechmea nudicaulis* em meio líquido sob agitação e estático

Nos experimentos com *Ananas comosus* var. *comosus* ('Imperial' e 'Pérola'), as culturas apresentaram multiplicação eficiente de plântulas e boas características em ambos os tratamentos, líquido estático e líquido sob agitação (Figuras 5A-B). As culturas de *Ae. nudicaulis* visivelmente apresentam grande taxa de multiplicação de plântulas, ficando o frasco, em ambos os tratamentos, com toda a base preenchida por plantas em cada subcultivo (Figura 5C).



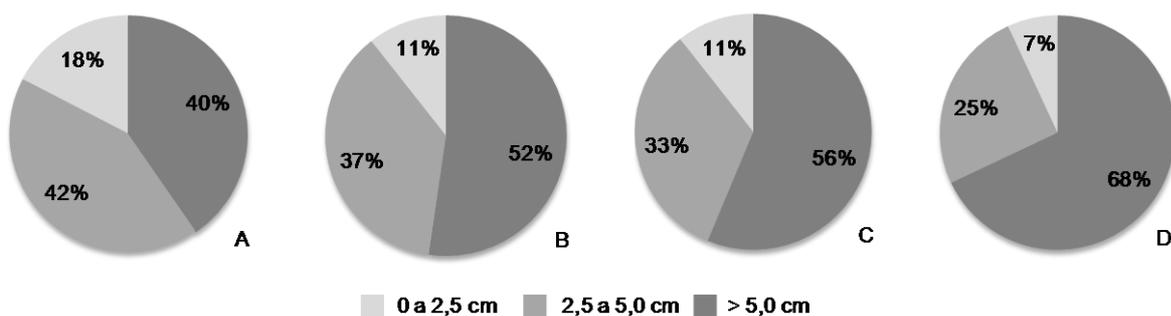
**Figura 5** - Micropropagação de bromeliáceas em meio de cultura líquido sob agitação (Ag) e líquido estático (Es) aos 105 dias de cultivo. *Ananas comosus* var *comosus* 'Imperial' (A), 'Pérola' (B) e *Aechmea nudicaulis* (C)

De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros avaliados apenas na cultivar Pérola, sendo o tratamento líquido estático superior, produzindo  $65,8 \pm 1,7$  g de massa fresca,  $5,1 \pm 0,1$  g de massa seca e  $129,5 \pm 24,8$  número de plantas (Figuras 6B).



**Figura 6** - Micropropagação de *Ananas comosus* var. *comosus* 'Imperial' (A), 'Pérola' (B) e *Aechmea nudicaulis* (C) sob diferentes estados físicos do meio de cultura. Barras representam médias ( $\pm$  erro padrão) aos 105 dias cultivo. Apenas os fatores do experimento com 'Pérola' diferiram estatisticamente (\*) ( $p < 0.05$ ).

Em relação ao tamanho de plantas de *An. comosus* var. *comosus* observados nos dois tratamentos, tanto 'Imperial', como 'Pérola', o tratamento que apresentou o maior número de plantas maiores que 5 cm foi meio de cultura líquido o estático, com 52% e 68%, respectivamente. Em meio líquido estático ambas as cultivares apresentaram menor porcentagem de plantas menores que 2,5 cm em relação ao tratamento meio líquido sob agitação, com 11% em 'Imperial' e 7% em 'Pérola' (Figura 7).



**Figura 7** - Distribuição do número total de plantas de *Ananas comosus* var. *comosus* 'Imperial' (A, B) e 'Pérola' (C, D) em três classes de tamanho aos 105 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura líquido sob agitação (A, C) e estático (B, D)

Ao longo de todo o cultivo de *Ae. nudicaulis*, não se observaram diferenças na multiplicação e no tamanho das plantas produzidas entre os dois tratamentos, líquido estático e sob agitação. Essa tendência se manteve até a avaliação final do experimento (aos 105 dias de cultivo), quando a análise de variância não detectou

diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos para nenhum dos parâmetros avaliados: massa fresca, massa seca e número de plantas (Figura 6 C).

Apesar dos benefícios conhecidos do meio de cultura líquido sob agitação em relação ao meio líquido estático, nem todas as espécies apresentam resultados superiores quando cultivadas nessa condição, conforme observado neste experimento. Este fato também foi observado por Mengarda et al. (2009) que estudando o estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de *Neoregelia cruenta*, *Tillandsia stricta*, *Vriesea gigantea*, *V. guttata* e *V. incurvata*, observaram que após 30 dias de cultivo em diferentes meios (semissólido, líquido estático, líquido sob agitação de 90 rpm e líquido estático com ponte de papel filtro), o meio líquido estático foi superior para todas as espécies.

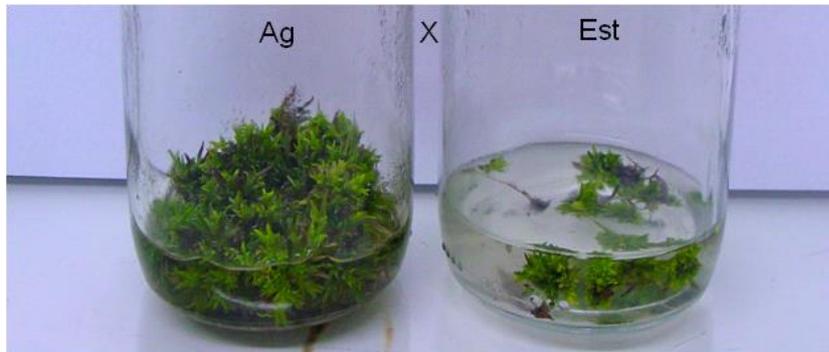
As variações na taxa de multiplicação, e diferentes padrões de crescimento, podem ser atribuídos ao genótipo (HENRY; VAIN; DEBUYSER, 1994; DROSTE et al., 2005), o que explicaria as diferentes respostas às condições físicas do meio de cultura observadas nas espécies analisadas nestes experimentos.

O uso de um meio de cultura apropriado e ajustado para cada espécie é fundamental para que se obtenha uma condição na qual o metabolismo das células vegetais em cultivo *in vitro*, estabeleça padrões que levem à diferenciação de tecidos, acompanhado também pelo crescimento dos mesmos (MENGARDA et al., 2009).

Por não terem sido observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados nesse experimento, consideramos que estas não seriam amostras adequadas para análises moleculares da comunidade bacteriana.

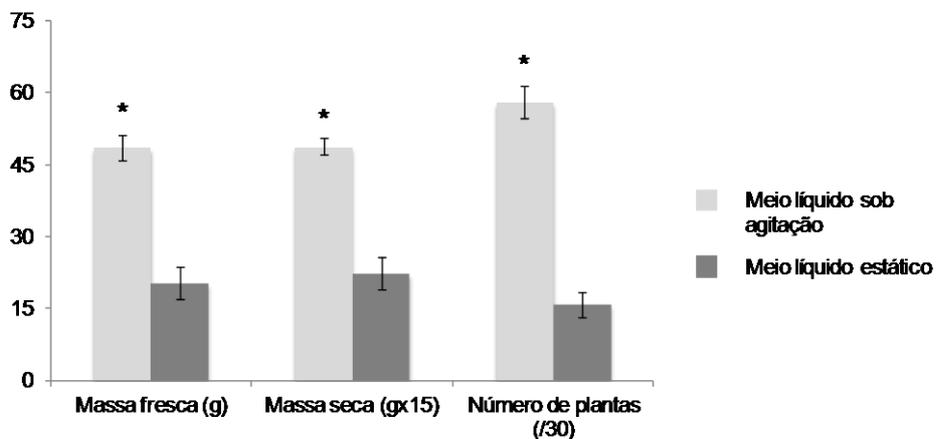
## **5.2 Micropropagação de *Vriesea hieroglyphica* em diferentes sistemas de cultivo**

No experimento avaliando a multiplicação de *Vriesea hieroglyphica*, sob os tratamentos meio de cultura líquido estático e sob agitação, desde o primeiro subcultivo, foi possível observar uma maior multiplicação em meio líquido sob agitação. Esta tendência se manteve até a avaliação final (aos 105 dias), quando a multiplicação das plantas sob o tratamento meio líquido sob agitação foi visivelmente superior em relação ao tratamento meio líquido estático (Figura 8).



**Figura 8** - Micropropagação de *Vriesea hieroglyphica* aos 105 dias de cultivo em meio de cultura líquido sob agitação (Ag) e estático (Est)

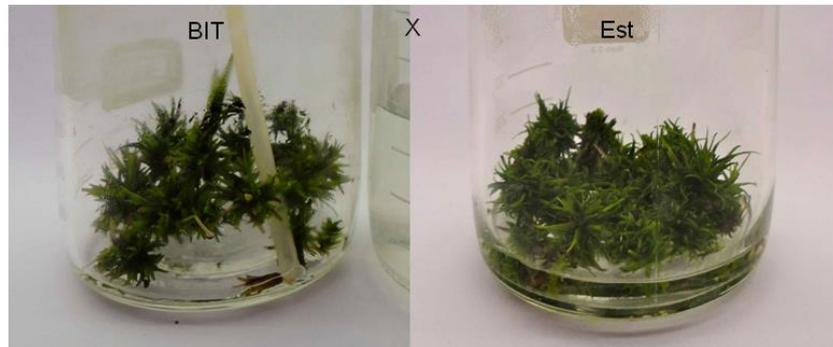
A análise de variância dos parâmetros avaliados ao final do experimento (massa fresca, massa seca e número de plantas) constatou que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, sendo que, o meio de cultura líquido sob agitação produziu 2,4 vezes mais massa fresca ( $48,6 \pm 5,5$  g), 2,2 vezes mais massa seca ( $3,3 \pm 0,23$  g) e um número de plantas 3,7 vezes maior ( $1.742,2 \pm 197,4$  número de plantas), em relação ao tratamento meio líquido estático (Figura 9).



**Figura 9** - Micropropagação de *Vriesea hieroglyphica* em diferentes sistemas de cultivo. Barras representam médias ( $\pm$  erro padrão) aos 105 dias. Médias diferiram estatisticamente (\*) ( $p < 0,05$ ) em todos os parâmetros avaliados

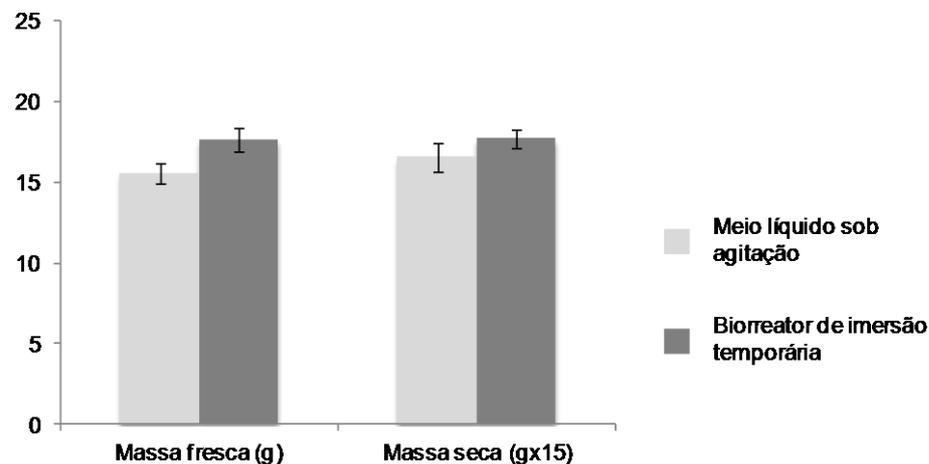
Considerando-se a resposta positiva de *V. hieroglyphica* a um meio com melhor aeração (líquido sob agitação), e sendo a otimização neste sistema considerada um passo intermediário para a utilização de biorreator de imersão temporária (BIT), procedeu-se à instalação do experimento comparando o cultivo *in vitro* de *V. hieroglyphica* em sistema BIT e meio de cultura líquido estático.

Neste segundo experimento, as plantas de ambos tratamentos apresentaram multiplicação lenta, sendo que, ao final, visualmente, as plantas sob o tratamento meio líquido estático apresentavam um desenvolvimento ligeiramente superior às do tratamento BIT (Figura 10).



**Figura 10** - Micropropagação de *Vriesea hieroglyphica* aos 105 dias de cultivo sob os sistemas biorreator de imersão temporária (BIT) e meio líquido estático (Est)

Ao final do experimento (105 dias), a análise de variância não constatou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos em nenhum dos parâmetros avaliados (massa fresca, massa seca e número de plantas) (Figuras 11).



**Figura 11** - Micropropagação de *Vriesea hieroglyphica* comparando diferentes sistemas de cultivo. Barras representam médias ( $\pm$  erro padrão) após 105 dias. Médias não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros avaliados.

A micropropagação em BIT permite, em algumas espécies, a multiplicação das mesmas sem a realização de repicagens, sendo necessárias apenas trocas do meio de cultura. No caso de *V. hieroglyphica*, no entanto, o fato de não ter sido

realizada as repicagens levou à menor multiplicação das plantas quando comparada com o experimento avaliando meio líquido estático e sob agitação.

Apesar do sistema BIT apresentar altas taxas de multiplicação para diversas espécies, a sua otimização exige o ajuste de diversos fatores, tais como: intervalo e tempo de imersão, volume de meio por explante, composição do meio, entre outros (ESCALONA et al., 1999). Desta forma, antes de se descartar esta tecnologia com opção para a micropropagação de *V. hieroglyphica*, todas essas variações devem ser testadas.

Como o objetivo deste estudo não era a otimização do sistema BIT para esta espécie e sim apenas a obtenção de plantas cultivadas *in vitro* em dois sistemas com desempenho visivelmente diferentes para os estudos de suas comunidades bacterianas, não foram realizados maiores esforços na sua otimização. Desta maneira, pelo fato de *V. hieroglyphica* não ter apresentado diferença significativa entre os tratamentos BIT e meio líquido estático, este experimento não foi considerado um modelo adequado para as análises moleculares com o objetivo de relacionar o desempenho das culturas com a comunidade microbiana presente.

### **5.3 Análise por T-RFLP da comunidade bacteriana em culturas *in vitro* de *Dyckia distachya***

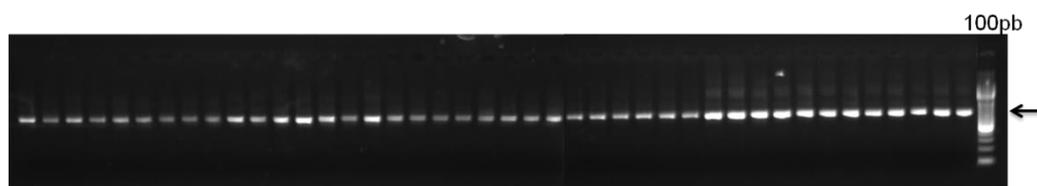
A avaliação dos dados de contagem de brotos coletados na ocasião do segundo subcultivo do experimento comparando a micropropagação de *Dyckia distachya* sob diferentes estados físicos do meio de cultura, mostrou que o melhor tratamento foi o meio de cultura líquido sob agitação, produzindo 34,5% mais número de brotos em relação ao meio semissólido e 8,5% mais brotos que o meio líquido estático (SALOMÃO, 2013). Diante destes resultados, este experimento foi considerado um modelo adequado para análises mais aprofundadas da comunidade bacteriana presente nestas plantas, buscando responder a hipótese deste trabalho.

DNA genômico total foi obtido a partir de amostras de folhas coletadas no experimento comparando a multiplicação de *D. distachya* em meio de cultura semissólido, líquido estático e sob agitação. As extrações realizadas utilizando-se o *Kit Plant DNAzol Reagent* (Invitrogen) apresentaram boa qualidade, com

uma relação 260/ 280 entre 1,8 e 2,0 e com quantidade sempre maior ou igual a 40 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

A reação de amplificação do gene 16S rRNA de bactéria utilizando-se os *primers* fD1 e rD1 (WEISBURG et al., 1991) geraram fragmentos com aproximadamente 1500 pb, correspondendo ao tamanho total deste gene. Como o DNA extraído das folhas é uma mistura de DNA da planta com DNA de bactérias, a partir dos fragmentos gerados na primeira PCR, realizou-se uma *Nested-PCR* utilizando-se o conjunto de primers, 799F (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1492R (HEUER et al., 1997) os quais geraram, os fragmentos esperados: um de aproximadamente 1090 pb (correspondente a 16S rRNA mitocondrial) e outro de aproximadamente 735 pb (16S rRNA bacteriano).

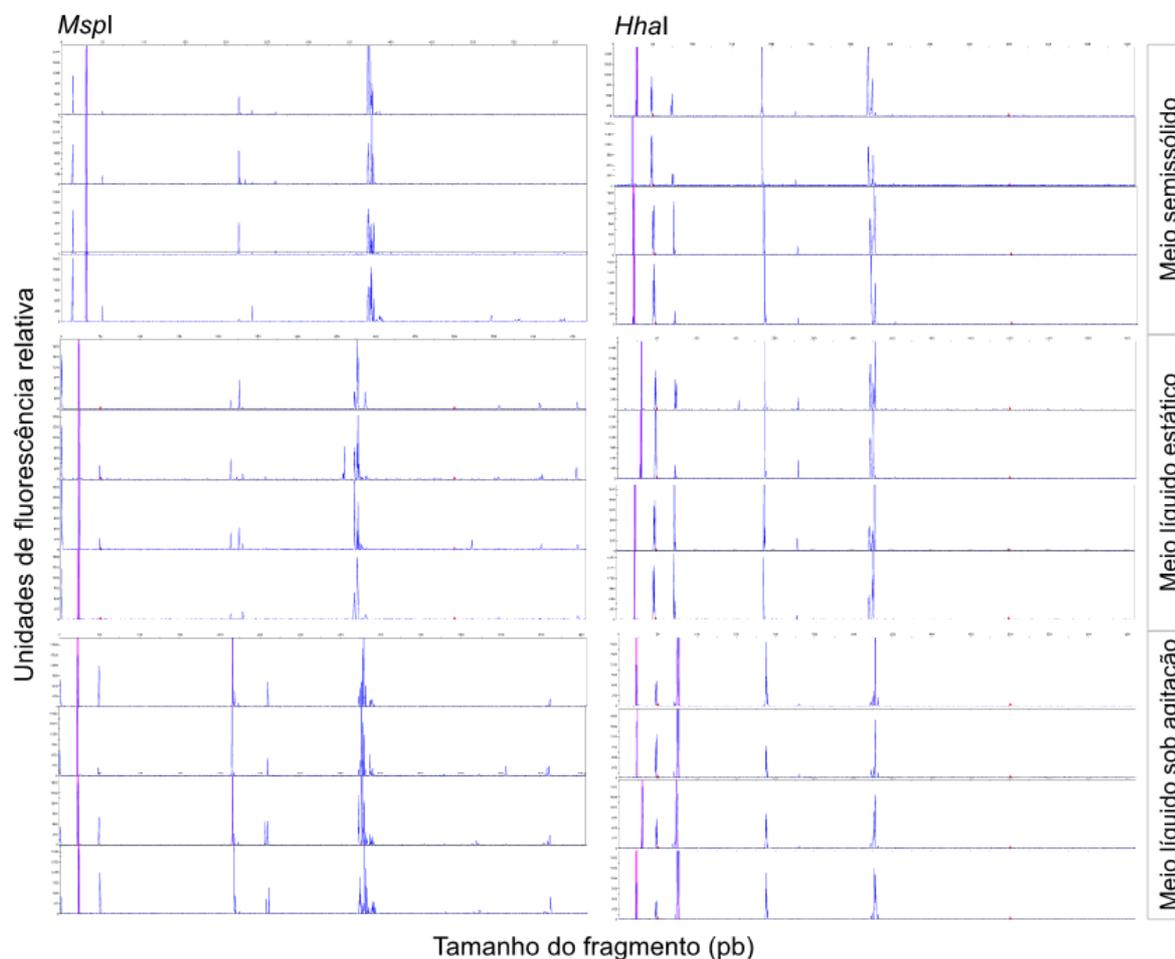
Os produtos obtidos após a *Nested-PCR* foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004) a qual foi eficiente na separação da banda correspondente às bactérias (~735 pb) e da banda correspondente ao DNA mitocondrial (~1090pb). A eletroforese realizada após a purificação da banda de interesse, revelou uma banda única e correspondente à esperada (~735 pb) (Figura 12).



**Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do gene 16S rRNA de amostras de folhas de *Dyckia distachya* aos 60 dias de cultivo *in vitro*. A banda indicada com a seta (~735 pb) corresponde aos fragmentos de DNA obtidos por PCR utilizando os *primers* 799f e 1492r

### 5.3.1 Processamento dos dados de T-RFLP

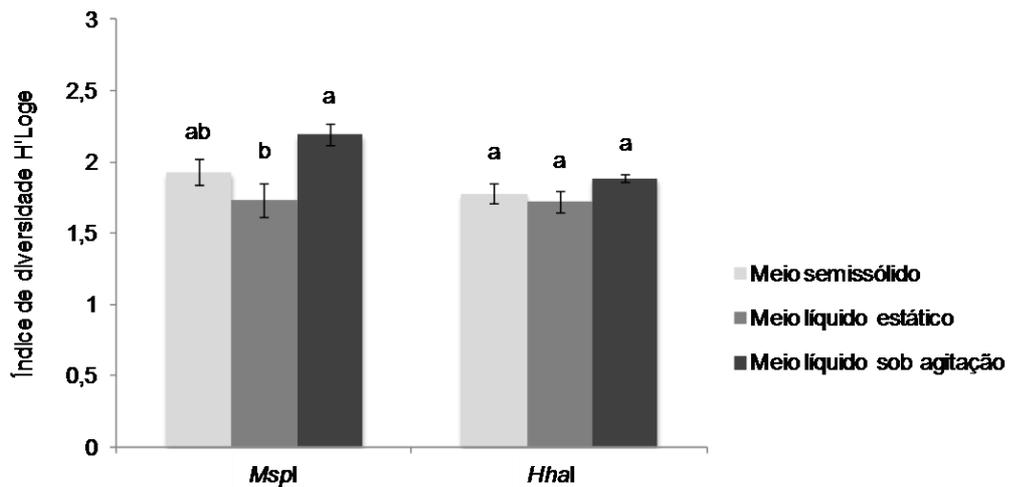
Os resultados com base na discriminação automatizada dos T-RFs (*Terminal Restriction Fragment*) deste material permitiu observar a produção de T-RFs relevantes e de qualidade (Figura 13), e que permitiram as análises de índices de diversidade, construção de histogramas de abundância relativa e análise MDS (*Multidimensional Scaling*).



**Figura 13** - Exemplo de eletroferogramas visualizados no software *GeneMapper*<sup>®</sup> 3.0 (Life Technologies) após digestão com as enzimas *MspI* e *HhaI* e análise no sequenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyser* (Life Technologies). Os eletroferogramas se referem a amostras de folhas de *Dyckia distachya* cultivada sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro* e coletadas no segundo subcultivo

As matrizes geradas com os resultados das análises de T-RFLP foram utilizadas para a análise do índice de diversidade de *Shannon* das amostras de folhas de *D. distachya*, o qual nos permitiu inferir a estrutura das populações bacterianas presentes nos diferentes tratamentos analisados.

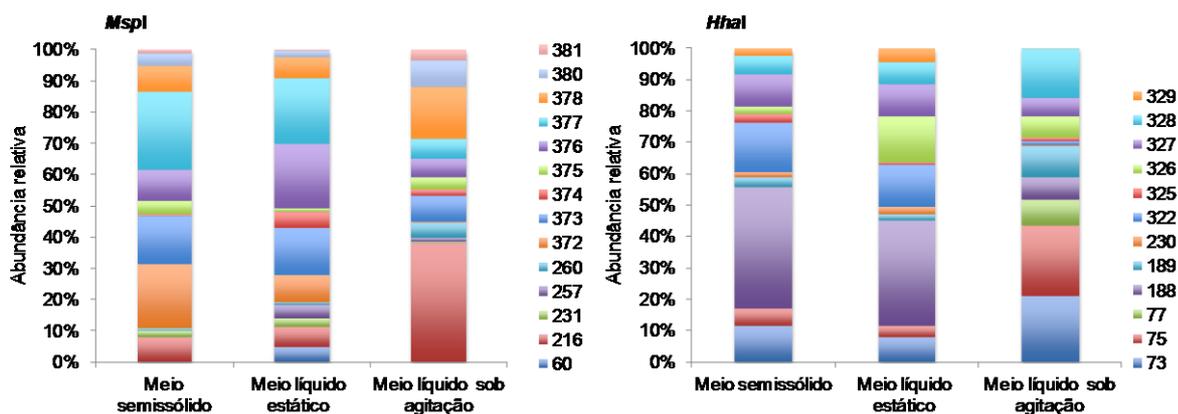
Esse índice foi calculado para as duas enzimas de restrição (*MspI* e *HhaI*), de forma que as amostras com maior diversidade apresentam valores de índices mais altos. Foi aplicado o teste de Tukey para os valores de índices de diversidade gerados e houve diferença significativa somente entre os tratamentos meio de cultura líquido estático e líquido sob agitação nos índices calculados para a enzima *MspI* (Figura 14).



**Figura 14** - Índices de diversidade de bactérias presentes em folhas de *Dyckia distachya* cultivadas sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro* e coletadas no segundo subcultivo. Barras representam médias ( $\pm$  erro padrão) do índice calculadas utilizando-se o programa Primer 6. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) dentro de um mesmo fator

Os perfis de T-RFLP dos três tratamentos foram comparados calculando-se a abundância relativa dos T-RFs, sendo cada T-RF considerado uma Unidade Taxonômica Operacional (UTO) distinta. As análises dos T-RFs podem dar uma visão semi-quantitativa da comunidade por meio da abundância relativa dos picos, os quais representam os membros de uma comunidade em uma PCR (BRAKER et al., 2001; SESSITSCH et al., 2001).

Os histogramas foram gerados para os fragmentos com abundância relativa maior que 1%, sendo estes considerados UTOS de microrganismos dominantes nessas comunidades (LEHOURS et al., 2005). Após a eliminação dos T-RFs representando menos que 1% do total da fluorescência detectada para as comunidades de bactérias endofíticas, para a enzima *MspI* encontraram-se 14 T-RFs representando 90,5% da fluorescência total, enquanto para a enzima *HhaI* observaram-se 12 T-RFs representando 96,8% da fluorescência total (Figura 15).

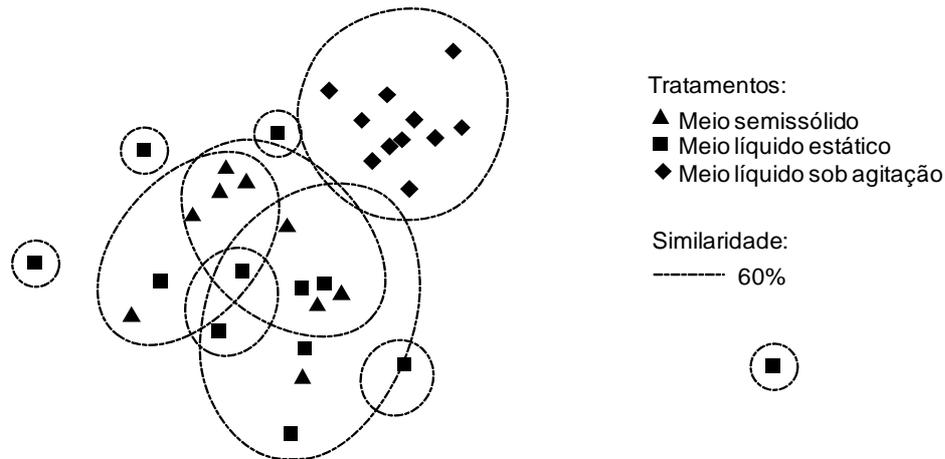


**Figura 15** - Abundância relativa de T-RFs (*Terminal Restriction Fragments*) de comunidade bacteriana presente em folhas de *Dyckia distachya* cultivadas sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. Diagramas mostram os resultados após a clivagem com *MspI* e *HhaI*. Os números na legenda indicam o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, gerados após a clivagem e com abundância maior que 1%

Nos histogramas gerados, tanto para a enzima *MspI* quanto para *HhaI*, observa-se que os tratamentos meio de cultura semissólido e líquido estático compartilham do mesmo T-RF dominante, que por sua vez é diferente do T-RF dominante no tratamento líquido sob agitação. Neste sentido, para a enzima *MspI* nos tratamentos semissólido e líquido estático o T-RF dominante foi o de 377 pb com 25% e 20% de abundância relativa, respectivamente, enquanto no tratamento líquido sob agitação o T-RF de 216 pb com 38% de abundância relativa foi dominante. Para a enzima *HhaI*, nos tratamentos semissólido e líquido estático o T-RF dominante foi o de 188 pb com, 38,8% e 33,5% de abundância relativa, respectivamente, e no tratamento líquido sob agitação foi o T-RF de 75 pb com 22,5% de abundância relativa (Figura 15).

Ainda pelas observações dos histogramas, para a enzima *MspI*, o único T-RF encontrado em apenas um dos tratamentos foi o de 60 pb, com uma contribuição de 5% na abundância relativa, sendo encontrado exclusivamente no tratamento líquido estático. Para a enzima *HhaI*, o único T-RF exclusivo foi o de 77 pb, no tratamento líquido sob agitação e com uma contribuição de 8,5% na abundância relativa.

Com base nos resultados dos perfis de T-RFs, foi feita a análise em escala multidimensional (MDS) da estrutura da comunidade de bactérias presentes nas folhas de *D. distachya* (Figura 16). Esta análise demonstrou que as amostras do tratamento líquido sob agitação se agruparam com 60% de similaridade, enquanto as amostras dos demais tratamentos apresentaram-se dispersas.



**Figura 16** - Análise em escala multidimensional (MDS), realizada no programa *Primer 6* e baseada nos T-RFs discriminados para o gene 16S rRNA de bactérias presentes em folhas de *Dyckia distachya*. As amostras foram coletadas no segundo subcultivo de plantas sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro*

Apesar dos três tratamentos avaliados terem apresentado números semelhantes de UTOs, as diferenças nas abundâncias relativas indicam que o estado físico do meio de cultura (semissólido, líquido estático ou líquido sob agitação) utilizado para a micropropagação, influencia a comunidade endofítica presente nas folhas da espécie *D. distachya*. O tratamento líquido sob agitação, além de, no segundo subcultivo, ter apresentado o melhor desempenho para número de brotos, produzindo 10% mais brotos que o meio líquido estático e 30% mais que semissólido, também apresentou abundância relativa de T-RFs diferenciada em relação aos demais tratamentos.

Este estudo valida a hipótese de que as condições do cultivo *in vitro* influenciam a comunidade de bactérias presentes nas plantas. No entanto, estudos mais aprofundados seriam interessantes para identificar esses microrganismos e a sua possível contribuição para o desempenho das culturas sob agitação.

#### 5.4 Micropropagação de cana-de-açúcar BIT e em meio líquido estático e análise da comunidade bacteriana

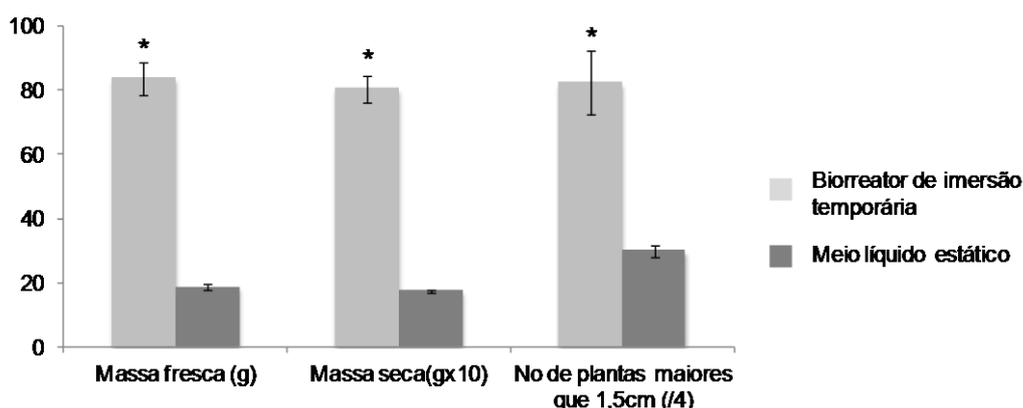
As plantas sob o tratamento BIT começaram a se desenvolver mais vigorosamente, em relação ao tratamento líquido estático, após a primeira troca do

meio de cultura (19 dias). Essa tendência se manteve ao longo do experimento até o dia da avaliação final (45 dias) (Figura 17).



**Figura 17** - Micropropagação de cana-de-açúcar sob os sistemas de cultivo biorreator de imersão temporária (A) e meio de cultura líquido estático (B) aos 45 dias de cultivo e duas trocas de meio

O tratamento BIT produziu 4,49 vezes mais massa fresca ( $83,7 \pm 10,4$  g), 4,58 vezes mais massa seca ( $8,0 \pm 0,88$  g) em relação ao tratamento meio líquido estático. A análise de variância constatou que os tratamentos diferiram entre si ( $p < 0,05$ ) (Figura 18).



**Figura 18** - Micropropagação de cana-de-açúcar em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. Barras representam médias ( $\pm$  erro padrão) aos 45 dias cultivo. Todos os parâmetros avaliados diferiram estatisticamente (\*) ( $p < 0,05$ )

Os dados de contagem do número de plantas maiores que 1,5 cm apresentaram superdispersão, fenômeno observado quando um conjunto de dados apresenta variabilidade maior do que a esperada pelos modelos probabilísticos

padrão. Desta forma, o ajuste do modelo binomial negativo foi o mais adequado, e demonstrou diferença entre os dois tratamentos com relação ao número de plantas maiores que 1,5 cm. O tratamento BIT produziu 2,75 vezes mais plantas ( $329,0 \pm 79,3$  plantas maiores que 1,5 cm) que o tratamento meio líquido estático (Figura 18).

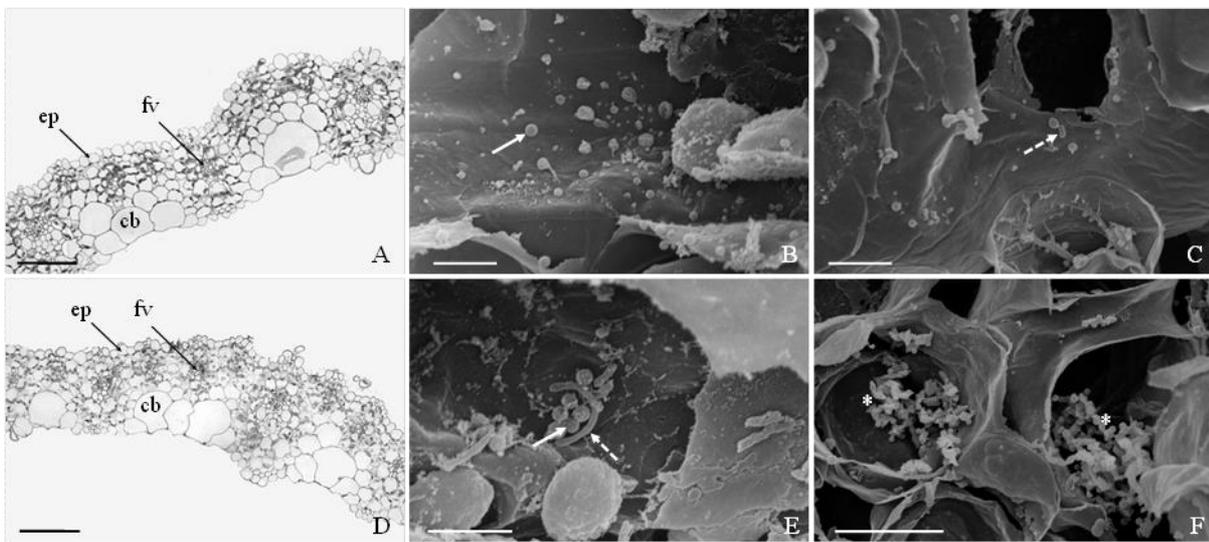
Lorenzo et al. (1998), comparando três sistemas de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar observaram que o sistema de bioreator de imersão temporária apresentou uma taxa de multiplicação de duas vezes mais quando comparados com meio de cultura sólido e líquido, além de reduzir o custo de produção em 46%. Lemos (2009) relata que, apesar da redução de custos (em até 30%) e superior eficiência na multiplicação de diversas culturas, o uso de biorreator de imersão temporária ainda é pouco difundido nos laboratórios de cultivo *in vitro*. Esse mesmo autor descreve que em cana-de-açúcar, pode-se alcançar de três a quatro vezes mais biomassa total das plantas micropropagadas quando comparados ao sistema tradicional estático.

Alguns fatores fisiológicos podem ser apontados no entendimento da eficiência do sistema BIT em relação ao meio líquido estático. O período de imersão das plantas que ocorre neste sistema permite que a planta absorva nutrientes ao longo de toda a sua superfície e quando o meio é drenado as plantas ficam em contato com o ar permitindo a realização das trocas gasosas (ALVARD; COTE; TEISSON, 1993). Esse período de contato das plantas com o ar, bem como a renovação da atmosfera são de extrema importância no desenvolvimento das plantas *in vitro*, pois quando os frascos permanecem hermeticamente fechados, são criadas condições físicas e químicas que limitam o desenvolvimento normal das plantas (BAIRU; STIRK; VAN STADEN, 2009). Outro problema observado ao cultivo *in vitro* é a alta umidade relativa que reduz a transpiração e o transporte de nutrientes, consequentemente afetando as culturas (SHA; MCCOWN; PETERSON, 1985). Tais problemas não ocorrem nos BITs pois a atmosfera é renovada pela injeção periódica de ar microfiltrado.

Diante dos resultados de micropropagação apresentados acima, este experimento foi considerado um modelo adequado para análises mais aprofundadas da comunidade microbiana presente em sistemas de cultivo *in vitro*, buscando elucidar se plantas sob sistemas de cultivo *in vitro* com diferentes desempenhos das culturas também possuem um perfil de comunidade bacteriana diferente.

### 5.4.1 Análise por microscopia de luz e eletrônica de varredura

Nas análises anatômicas a espessura média das folhas nos dois tratamentos não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos BIT e meio líquido estático, com  $177,7 \pm 3,9 \mu\text{m}$  e  $171,7 \pm 4,4 \mu\text{m}$ , respectivamente. Visualmente foi possível observar uma maior quantidade de cloroplastos no tratamento meio líquido estático em relação ao tratamento BIT (Figuras 19A e D, respectivamente).



**Figura 19** - Folhas de cana-de-açúcar coletadas aos 45 dias de cultivo *in vitro* em biorreator de imersão temporária (A-C) e meio líquido estático (D-F) e observadas em microscopia de luz (A, D) e microscopia eletrônica de varredura (B, C, E, F). Presença de bactérias do tipo cocos (seta cheia) e bactérias do tipo bacilo (seta pontilhada) em amostras de folhas criostraturadas. (ep) epiderme; (fv) feixe vascular; (cb) célula buliforme. Barras: A, D = 100  $\mu\text{m}$ ; B, C, E = 4  $\mu\text{m}$ ; F = 10  $\mu\text{m}$

A maior multiplicação das plantas mantidas sob o sistema de BIT, em relação ao meio de cultura líquido estático, pode ter dificultado a incidência de luz nas plantas localizadas nas áreas mais internas dos frascos. Como a baixa incidência de luz faz com que plantas micropropagadas, em geral, não apresentem um aparato fotossintético ativo, com menor concentração de clorofila ou em enzimas envolvidas na fotossíntese (HAZARIKA, 2006), supõe-se que a menor ocorrência de cloroplastos observada nas folhas provenientes do sistema BIT esteja relacionada ao maior número de plantas existente, em relação ao tratamento meio líquido estático.

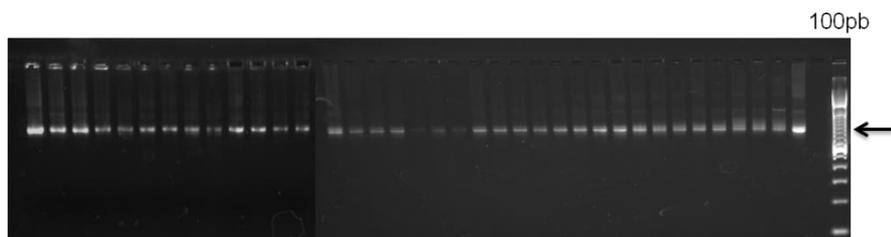
As observações feitas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstraram a presença de bactérias do tipo cocos e bacilos (Figuras 19 B, C, E), bem como associações de bactérias, possivelmente formando biofilmes (Figura 19F).

Quecine et al. (2012), estudando os benefícios da inoculação da bactéria endofítica promotora de crescimento *Pantoea agglomerans*, em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas, observou, utilizando esta técnica, a colonização da superfície das raízes e inclusive a formação de biofilmes. Verstraete et al. (2013) utilizaram MEV para observar o comportamento de bactérias endofíticas nos tecidos internos de *Fadogia homblei*, e constataram que esses microrganismos estão dispersos entre as células do mesofilo.

#### 5.4.2 Análises moleculares da comunidade bacteriana

DNA genômico total foi obtido a partir de amostras de folhas coletadas do experimento comparando a micropropagação de cana-de-açúcar nos sistemas biorreator de imersão temporária (BIT) e meio de cultura líquido estático. As extrações, utilizando-se o *Kit Plant DNAzol Reagent* (Invitrogen) apresentaram boa qualidade, com relação 260/ 280 entre 1,8 e 2,0 e quantidade, sempre maior ou igual a 40 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

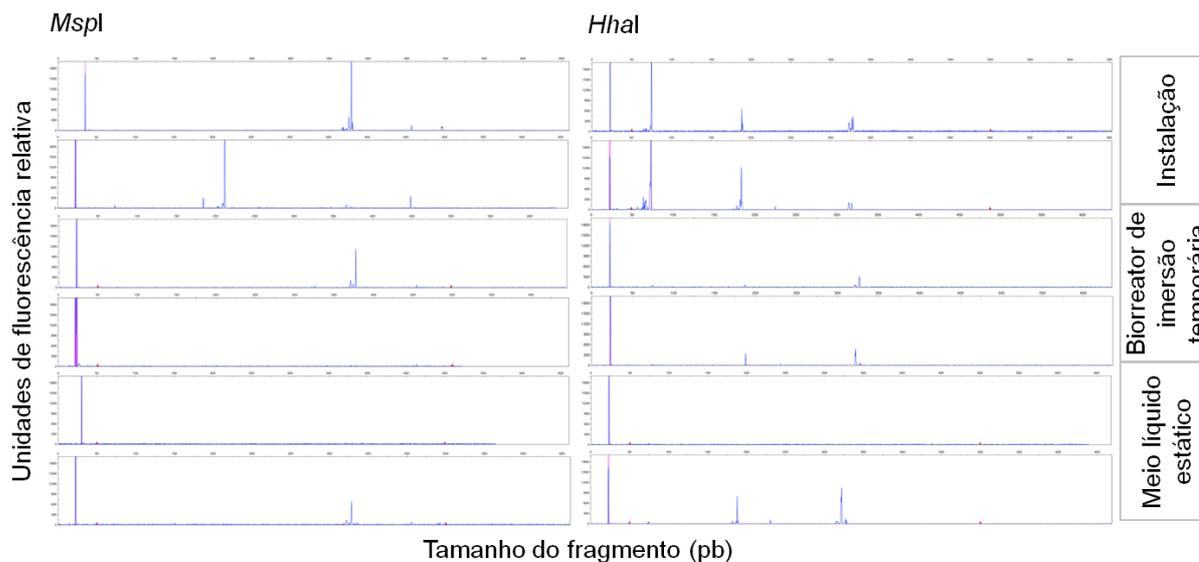
A reação de amplificação do gene 16S rRNA de bactéria utilizando-se os *primers* fD1 e rD1 (WEISBURG et al., 1991) geraram fragmentos com aproximadamente 1500 pb, correspondendo ao tamanho total do gene. E a *Nested-PCR* utilizando-se o conjunto de primers, 799F (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1492R (HEUER et al., 1997) geraram os dois fragmentos esperados: um de aproximadamente 1090 pb (correspondente a 16S rRNA mitocondrial) e outro de aproximadamente 735 pb (16S rRNA bacteriano) o qual foi cortado do gel e purificado. A eletroforese em gel realizada após a purificação dos produtos recuperados revelou uma banda única e correspondente a ~735 pb, conforme esperado (Figura 20).



**Figura 20** - Eletroforese em gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do gene 16S rRNA de amostras de folhas de cana-de-açúcar aos 45 dias de cultivo *in vitro* sob os tratamentos biorreator de imersão temporária e meio de cultura líquido estático. A banda assinalada (~735 pb) corresponde aos fragmentos de DNA obtidos por PCR utilizando os *primers* 799f e 1492r correspondente ao DNA bacteriano

#### 5.4.2.1 Análise por T-RFLP da comunidade bacteriana das culturas *in vitro* de cana-de-açúcar

Para as amostras de folhas de cana-de-açúcar apenas em algumas repetições foi possível observar produção de T-RFs relevantes (Figura 21). A pequena quantidade de T-RFs observada possivelmente ocorreu devido às condições de cultivo *in vitro* nas quais as plantas estavam mantidas. Este ambiente requer condições próximas à total assepsia para introdução e manutenção das culturas, resultando em uma comunidade bacteriana reduzida. Em adição a isso, as plantas utilizadas para a montagem do experimento com cana-de-açúcar estavam *in vitro* há período relativamente longo, maior do que um ano, durante o qual, medidas corriqueiramente adotadas no processo de micropropagação, como eliminação de culturas com sinais de contaminação também contribuem para a manutenção de culturas com comunidade consideravelmente reduzida. Os responsáveis pelos “sinais de contaminação” nas culturas podem, em alguns casos, ser microrganismos endofíticos e, considerando as práticas convencionais do cultivo *in vitro*, podem levar ao descarte da cultura. A tentativa de eliminação total dos microrganismos no cultivo *in vitro*, por considerá-los contaminantes, pode vir a se tornar um problema, como foi relatado para a cultura da batata, que por consequência do uso de sistemas comerciais de micropropagação teve eliminadas bactérias endofíticas importantes (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000), tanto promotoras de crescimento, como responsáveis por resistência a doenças (STURZ, 1995).



**Figura 21** - Exemplo de eletroferogramas visualizados no software *GeneMapper*<sup>®</sup> 3.0 (Life Technologies) após digestão com as enzimas *MspI* e *HhaI* e após a análise no sequenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyser* (Life Technologies). Os eletroferogramas se referem a amostras de folhas de cana-de-açúcar coletadas na instalação e aos 45 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes sistemas de cultivo

Devido ao insucesso nas diversas tentativas realizadas no sentido de se otimizar a técnica de T-RFLP para o material de cana-de-açúcar, o esforço para este material foi concentrado na construção de bibliotecas de clones do gene 16S rRNA e PCR quantitativo em tempo real, com o intuito de avaliar as diferenças na comunidade bacteriana de culturas *in vitro* sob sistema BIT e meio líquido estático.

#### 5.4.2.2 Construção de biblioteca de clones com amostras de culturas *in vitro* de cana-de-açúcar

- **Análise das sequências**

Foram sequenciados um total de 616 clones, sendo, 192 pertencentes à biblioteca “instalação” (INS), 232 pertencentes à biblioteca “biorreator de imersão temporária” (BIT) e 192 pertencentes à biblioteca “meio líquido estático” (MLE). O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi realizado com o *primer* M13f (HUEY; HALL, 1989). O sequenciamento parcial deste gene tem sido extensivamente utilizado como ferramenta molecular para a identificação de gêneros bacterianos, além de ser utilizado para análises de diversidade, quando o objetivo não é realizar

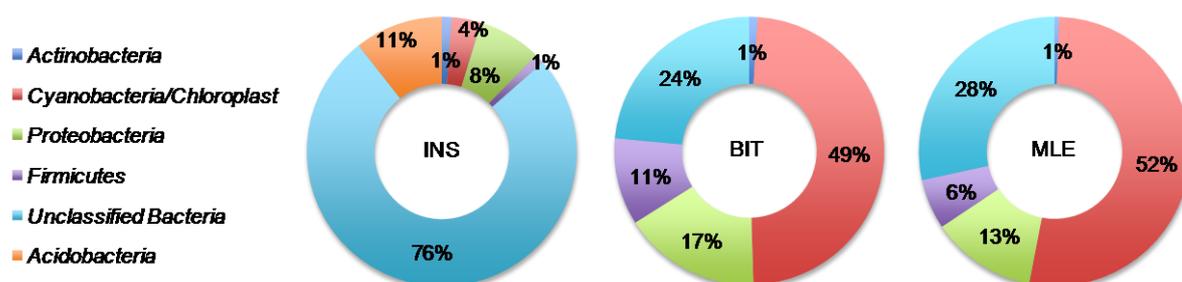
um estudo evolutivo detalhado (CANNAVAN, 2007). Geralmente, a sequência parcial do gene apresenta variabilidade suficiente para a identificação inicial de isolados bacterianos.

Após a edição e remoção das sequências de baixa qualidade na ferramenta *Pipeline* no site *Ribosomal Database Project* versão 10, update 31, restaram 172, 200 e 183 sequências para as bibliotecas “INS”, “BIT” e “MLE”, respectivamente. O tamanho médio das sequências foi de 621 pb (Tabela 4).

**Tabela 4** - Resumo dos clones sequenciados nas bibliotecas construídas a partir de folhas de cana-de-açúcar utilizadas na instalação do experimento (INS) e aos 45 dias de cultivo *in vitro* sob os tratamentos biorreator de imersão temporária (BIT) e meio de cultura líquido estático (MLE)

Biblioteca	Número de clones sequenciados	Clones que passaram no RDP		Comprimento médio das sequências (pb)	Número de UTOs observadas
		Número	%		
INS	192	172	90	584	25
BIT	232	200	86	603	29
MLE	192	183	95	676	26

A taxonomia das sequências consideradas de boa qualidade foi atribuída com base no *Ribosomal Database Project* (RDP) II, utilizando a ferramenta *Classifier*. Além de sequências referentes a bactérias não classificadas e cianobactérias/cloroplastos, foram encontradas sequências referentes aos filós: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Acidobacteria* (Figura 22).



**Figura 22** - Distribuição dos filios bacterianos encontrados nas bibliotecas de clones do gene 16S rRNA de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* e classificados utilizando-se a ferramenta *Classifier* (RDP). As bibliotecas foram construídas a partir de folhas coletadas em três ocasiões: “instalação” do experimento (INS) e aos 45 dias de cultivo sob os tratamentos “biorreator de imersão temporária” (BIT) e meio líquido estático (MLE)

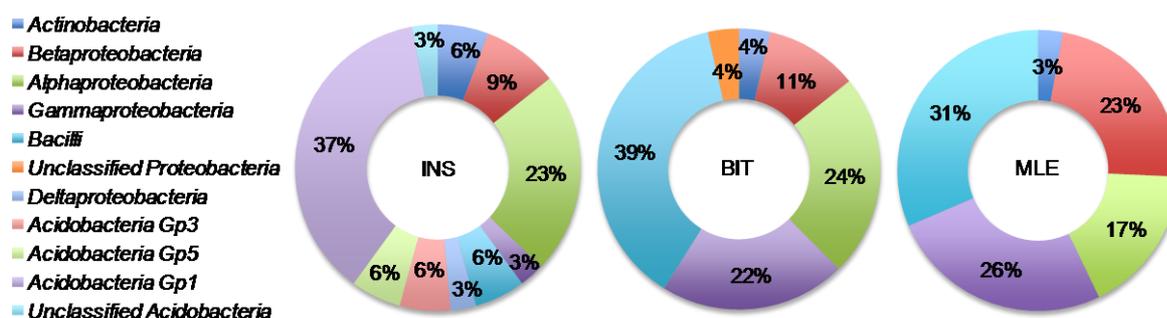
Os mesmos filios encontrados nas bibliotecas construídas com folhas de cana-de-açúcar deste experimento foram também encontrados como sendo os mais abundantes em solo cultivado com cana-de-açúcar (DINI-ANDREOTE et al., 2010). Essa semelhança entre os filios encontrados no solo e na parte aérea das folhas de cana-de-açúcar pode estar relacionada ao fato de que a maioria das bactérias associadas às plantas é proveniente do ambiente do solo (COMPANT; CLEMENT; SESSITSCH, 2010).

Do total das sequências analisadas na ferramenta *Classifier* (RDP), na biblioteca “INS”, uma grande porcentagem, 76%, foi atribuída a bactérias não classificadas, seguida por *Acidobacteria*, com 11%. A distribuição em filios dos clones provenientes das bibliotecas “BIT” e “MLE” apresentou-se com padrões bastante semelhantes entre essas duas bibliotecas, sendo o filo dominante cianobactéria/ cloroplasto, com 49 e 52% do total, respectivamente, seguido, em ambas as bibliotecas por *Actinobacteria*, com 24 e 28% do total, respectivamente (Figura 22).

Bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria* estão entre as mais abundantes nos solos, no entanto, os membros deste filo são de difícil cultivo e manutenção em laboratório, de forma que os conhecimentos sobre suas capacidades metabólicas e seu papel ainda é rudimentar (EICHORST; KUSKE; SCHMIDT, 2011). Lee et al. (2008), utilizando a construção de bibliotecas de clones do gene 16S rRNA para amostras de solo coletada da rizosfera de *Castanea crenata*, constatou que as bactérias pertencentes a este filo foram numericamente dominante e metabolicamente ativas, sugerindo que este filo estaria grandemente relacionado nos ciclos biogeoquímicos da rizosfera do solo.

Em solo, o pH tem sido apontado como o principal fator determinando a abundância de *Acidobacteria* (LAUBER et al., 2009; ROUSK et al., 2010; NAETHER et al., 2012), havendo, em geral, uma correlação negativa deste com a abundância de *Acidobacteria* observada, de forma que quanto menor o pH maior a sua abundância (OVERBEEK, 2013). Bactérias pertencentes a este filo também foram encontradas, em pequena quantidade (0,52%), em raízes da cultura do arroz (SUN et al., 2008).

A partir da taxonomia atribuída aos clones, e utilizando-se a ferramenta *Classifier* (RDP), foram construídos gráficos de distribuição dos clones por classes. Para isso, foram excluídos da análise os clones atribuídos a cianobactéria/cloroplasto e a bactérias não classificadas. Os gráficos assim gerados mostram que a biblioteca “INS” apresentou 10 classes identificadas, enquanto “BIT” apresentou seis e “MLE” cinco. A classe dominante na biblioteca “INS” foi *Acidobacteria Gp1* com 37% dos clones, seguido de *Alphaproteobacteria* com 23%. As bibliotecas “BIT” e “MLE” também apresentaram padrão bastante semelhante entre elas, quanto à distribuição das classes, sendo que a dominante foi *Bacilli* com 39 e 31%, respectivamente. A segunda maior, com 24%, foi a classe *Alphaproteobacteria* em “BIT” e com 26% a classe *Gammaproteobacteria* em “MLE” (Figura 23).



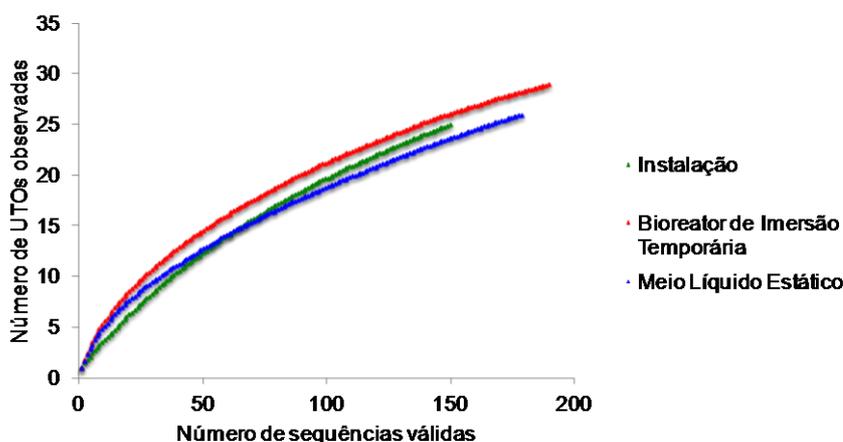
**Figura 23** - Distribuição das classes bacterianas encontradas nas bibliotecas de clones do gene 16S rRNA de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* e classificadas utilizando-se a ferramenta *Classifier* (RDP). As bibliotecas foram construídas a partir de folhas coletadas em três ocasiões: “instalação” do experimento (INS) e aos 45 dias de cultivo sob os tratamentos “biorreator de imersão temporária” (BIT) e meio líquido estático (MLE). Para a construção destes gráficos não foram utilizados os clones atribuídos a cianobactéria/cloroplasto e a bactérias não classificadas

A presença da classe *Bacilli* em plantas cultivadas *in vitro*, também foi observada por Esposito-Polesi (2010). Em seu estudo, investigando a comunidade microbiana presente em plantas de diversas espécies cultivadas *in vitro* e sem sinais

de contaminação, observou a presença do gênero *Bacillus pumilus*, pertencente à classe *Bacilli*, colonizando os tecidos internos em três das espécies investigadas (manjerição, pupunheira e cúrcuma).

Utilizando-se o programa MOTHUR v.1.23.1 (SCHLOSS et al., 2009) e estabelecendo-se um *cut-off* de 97% de similaridade, o número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) determinado foi de 25, 29 e 26, respectivamente, nas bibliotecas “INS”, “BIT” e “MLE” (Tabela 4).

As relações entre os números de sequências válidas e de UTOs observadas foram utilizadas para a construção de curvas de rarefação (Figura 24) e para avaliar o esforço amostral da análise. As curvas plotadas mostraram que, em nenhuma das bibliotecas, o número de sequências obtidas foi suficiente para se amostrar completamente a riqueza de filotipos das comunidades bacterianas. A curva obtida para a biblioteca “BIT” apresentou uma inclinação ligeiramente maior em relação às demais. Esta observação sugere uma maior riqueza de espécies nas culturas cultivadas em biorreator de imersão temporária.



**Figura 24** - Curvas de rarefação indicando a riqueza de UTOs nas bibliotecas do gene 16S rRNA de *Bacteria* presentes nas amostras de folha de cana-de-açúcar para as bibliotecas construídas com amostras de folhas coletadas na ocasião da instalação e aos 45 dias de cultivo *in vitro* sob os tratamentos em biorreator de imersão temporária e meio de cultura líquido estático. As UTOs foram definidas com base em sequências que diferiram ao nível  $\geq 3\%$

Os estimadores de riqueza são capazes de estimar a riqueza total presente na comunidade de uma amostra, permitindo que diferentes amostras possam ser comparadas (HUGHES et al., 2001). Esse número máximo de UTOs em um determinado nível filogenético pode ser estimado por meio de métodos estatísticos

que são capazes de extrapolar a relação de UTOs por meio de métodos não-paramétricos, ou em função do número de sequências a partir da curva de rarefação.

Os valores de índice de diversidade de UTOs das bibliotecas do gene 16S rRNA de *Bacteria*, *Shannon* e *Simpson*, mostram uma maior diversidade na biblioteca “BIT”, um valor intermediário na biblioteca “MLE” e o menor foi encontrado na biblioteca “INS”. Para as estimativas de riqueza de UTOs, os valores encontrados pelo método não-paramétrico *Jackknife* condiz com os resultados obtidos para os índices de diversidade. Para as estimativas *ACE* e *CHAO1*, os resultados encontrados foram diferentes, sendo que o maior valor encontrado foi para a biblioteca “MLE” e o menor foi para “BIT” (Tabela 5).

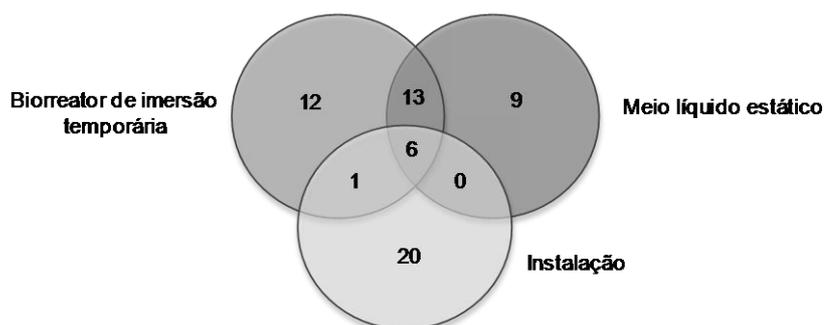
**Tabela 5** - Estimativas de riqueza de UTOs e índices de diversidade calculados a partir da biblioteca de clones do gene 16S rRNA de *Bacteria* de amostras de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*. As bibliotecas foram construídas a partir de folhas coletadas em três ocasiões: “instalação” do experimento (INS) e aos 45 dias de cultivo sob os tratamentos “biorreator de imersão temporária” (BIT) e meio de cultura líquido estático (MLE)

Biblioteca	Número de sequência válidas	Número de UTO	Estimativa de riqueza de UTOs*			Índice de diversidade	
			<i>ACE</i>	<i>CHAO1</i>	<i>Jackknife</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
INS	192	25	44,46	40,17	39,97	1,46	0,51
BIT	232	29	43,65	35,60	41,00	2,24	0,21
MLE	192	26	50,72	41,17	40,44	2,02	0,25

\*Medidas de diversidade calculadas com base em *cutoff* de 97% de similaridade entre as sequências do gene 16S rRNA de *Bacteria*.

As análises das bibliotecas pelo programa  $\beta$ -Libshuff não mostraram diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) comparando-se as sequências do gene 16S rRNA das bibliotecas feitas a partir do material coletado dos tratamentos “BIT” e “MLE”. No entanto, esses dois tratamentos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) quando comparados com as sequências da biblioteca construída com o material coletado no momento da instalação do experimento. Estes resultados indicam que a composição da comunidade microbiana sofreu alterações em relação às UTOs presentes durante o cultivo *in vitro* comparada ao material inicial, no entanto o sistema no qual as plantas foram micropropagadas, BIT ou MLE, não pareceu influenciar a comunidade microbiana presente.

Um diagrama de Venn foi construído para verificar as intersecções e peculiaridade entre as bibliotecas, identificando o número de UTOs exclusivas e compartilhadas. O maior número de UTOs exclusivas, 20, foi encontrado na biblioteca “INS”, enquanto “BIT” e “MLE” apresentaram, respectivamente, 12 e 9 UTOs exclusivas. Os demais compartilhamentos podem ser observados na Figura 25.

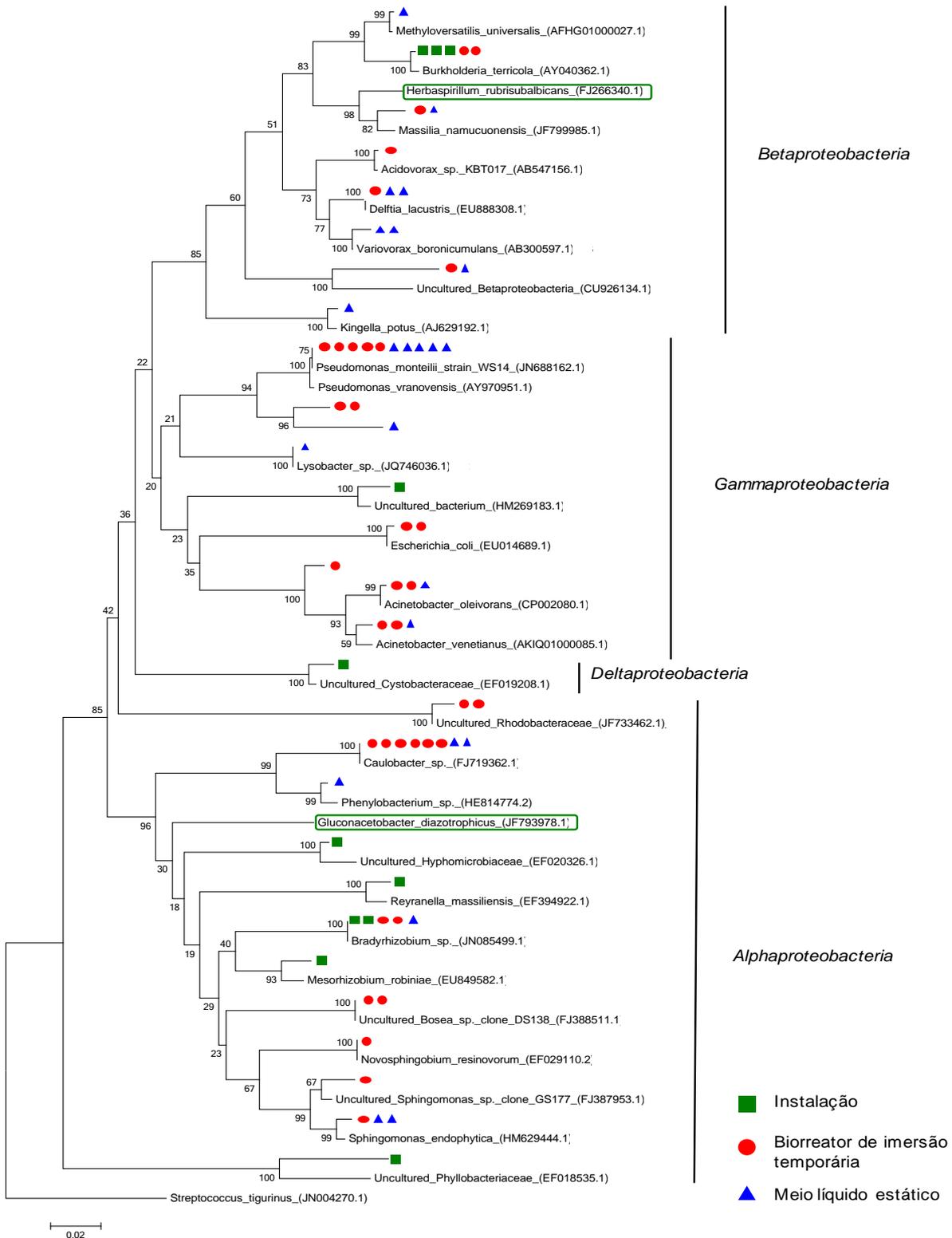


**Figura 25** - Diagrama de Venn baseado nas UTOs das bibliotecas do gene 16S rRNA de *Bacteria* para as amostras de folha de cana-de-açúcar coletadas do material utilizado na instalação do experimento e aos 45 dias de cultivo *in vitro* sob os sistemas biorreator de imersão temporária e meio de cultura líquido estático

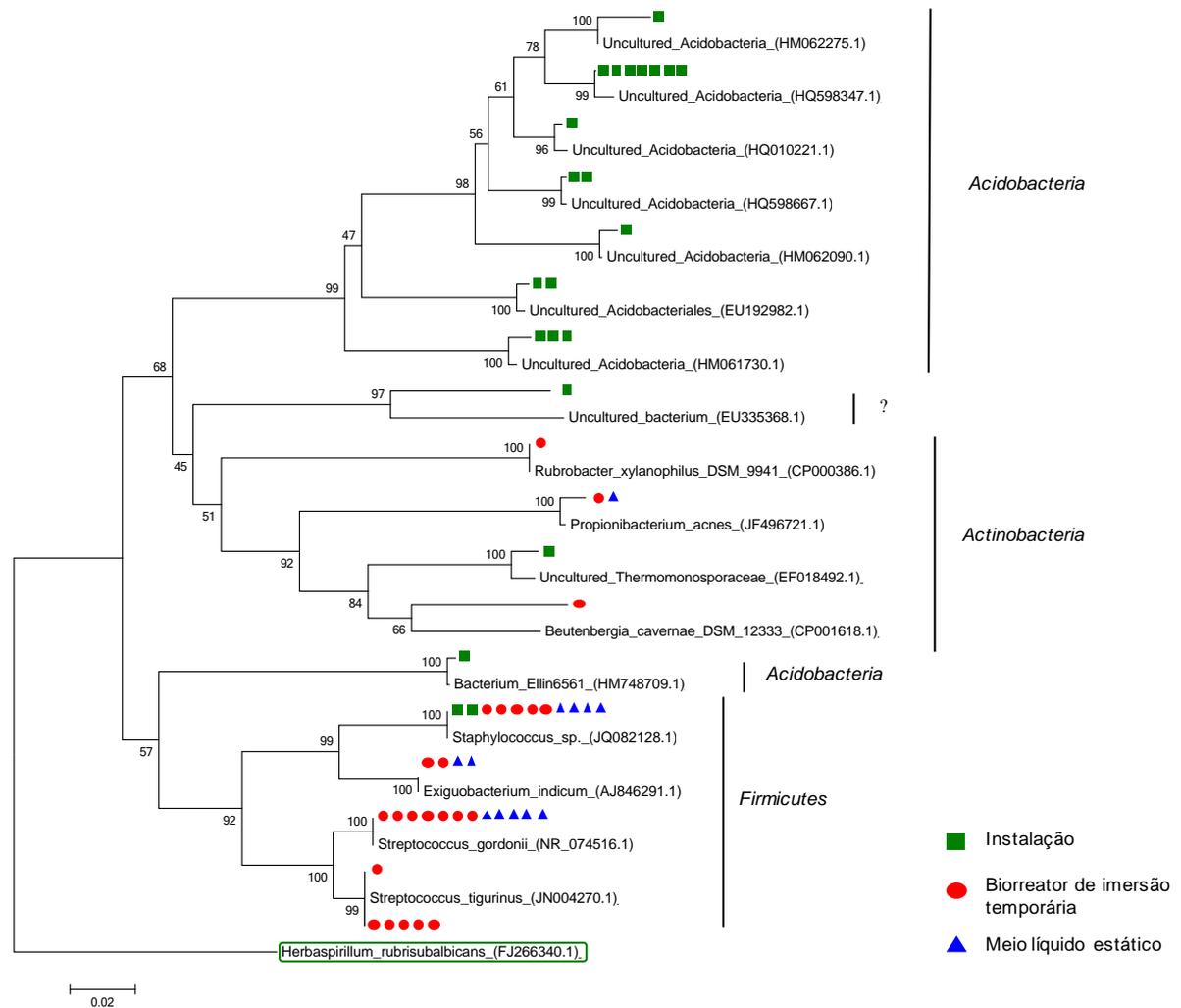
Apesar da análise das bibliotecas pelo programa J-Libshuff não ter mostrado diferenças significativas entre os tratamentos, o diagrama de Venn revela que cada tratamento possui um número considerável de UTOs exclusivas. Estudos mais aprofundados a respeito destas UTOs exclusivas seriam interessantes para elucidar que tipo de efeito elas exercem no desenvolvimento e crescimento *in vitro* das plantas.

- **Construções filogenéticas**

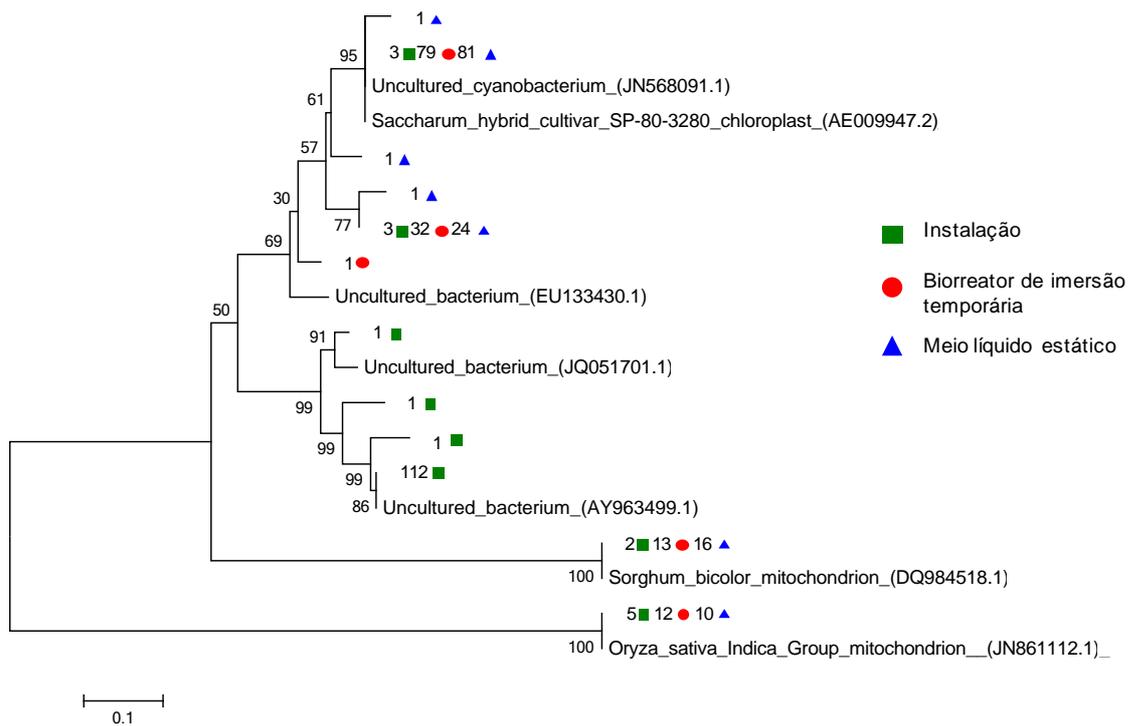
Para uma melhor visualização, foram construídas três árvores filogenéticas, com a primeira contendo clones referentes ao filo *Proteobacteria* (Figura 26), a segunda aos filios *Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* (Figura 27) e a terceira com sequências de bactérias não identificadas, que apresentaram similaridade com cianobactéria/ cloroplasto, mitocôndria de sorgo e de arroz (Figura 28). Os detalhes das sequências utilizadas na construção das árvores filogenéticas constam no Anexo A.



**Figura 26** - Agrupamentos filogenéticos com clones pertencentes ao filo Proteobacteria construído através do programa MEGA 5 pelo método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) com valor de *bootstrap* de 1000 repetições e baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Os clones são referentes a bibliotecas construídas a partir de amostras de folhas de cana-de-açúcar cultivada *in vitro* utilizadas na instalação do experimento e aos 45 dias de cultivo sob dois sistemas (biorreator de imersão temporária e de cultura meio líquido estático). As sequências de referência foram obtidas no NCBI. O enraizamento do agrupamento foi feito com *Streptococcus tigurinus* (JN004270.1)



**Figura 27** - Agrupamentos filogenéticos com clones pertencentes a três filos e construído através do programa MEGA 5 pelo método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) com valor de *bootstrap* de 1000 repetições e baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Os clones são referentes a bibliotecas construídas a partir de amostras de folhas de cana-de-açúcar cultivada *in vitro* utilizadas na instalação do experimento e aos 45 dias de cultivo sob dois sistemas (biorreator de imersão temporária e meio de cultura líquido estático). As sequências de referência foram obtidas no NCBI. O enraizamento do agrupamento foi feito com *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (FJ266340.1)



**Figura 28** - Agrupamentos filogenéticos com os clones identificados construído através do programa MEGA 5 pelo método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) com valor de *bootstrap* de 1000 repetições e baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Os clones são referentes a bibliotecas construídas a partir de amostras de folhas de cana-de-açúcar cultivada *in vitro* utilizadas na instalação do experimento e aos 45 dias de cultivo sob dois sistemas (biorreator de imersão temporária e meio líquido estático). As sequências de referência foram obtidas no NCBI. O enraizamento do agrupamento foi feito com mitocôndria de *Oryza sativa* (JN861112.1)

No agrupamento filogenético apresentado na Figura 26, pode-se observar que algumas sequências ficaram próximas filogeneticamente de importantes bactérias fixadoras de nitrogênio presentes em cana-de-açúcar, *Herbasirillum rubrisubalbicans* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Analisando-se a Figura 28, observa-se que um grande número de sequências pertencentes às bibliotecas “BIT” e “MLE”, 11 e 14% (Tabela 6), respectivamente, foram atribuídas, com 100% de similaridade, tanto a mitocôndria de sorgo, como a de arroz. Outra grande porcentagem de clones (35% em “BIT” e 44% em “MLE”) mostrou 100% de similaridade tanto com sequência de cloroplasto de cana SP80-3280 (mesma cultivar utilizada neste experimento), como com a de cianobactéria (Tabela 6). Curiosamente, a biblioteca “INS” apresentou uma porcentagem bem menor atribuída a essas organelas: 4% de sequências referentes a mitocôndria e 2% referente a cloroplasto, no entanto, apresentou 71% de sequências referentes a bactérias não cultiváveis (Tabela 6).

**Tabela 6** - Sequências de clones que apresentaram similaridade com mitocôndria ou cianobactéria/cloroplasto. Os clones são referentes a bibliotecas construídas a partir de amostras de folhas de cana-de-açúcar cultivada *in vitro* utilizadas na instalação (INS) do experimento e após 45 dias de cultivo sob dois sistemas [biorreator de imersão temporária (BIT) e meio líquido estático (MLE)]

Sequência	Similaridade (%)	INS		BIT		MLE	
		Nº de clones	%	Nº de clones	%	Nº de clones	%
Mitocôndria de sorgo/arroz	100	7	4	25	11	26	14
Cloroplasto de cana SP80-3280/cianobactéria	100	3	2	79	35	81	44
Bactéria não cultivável	89 a 100	120	71	33	15	16	14

Chelius e Triplett (2001), utilizando o conjunto de *primers* 799f-1492r na construção de biblioteca de clones do gene 16S rRNA no estudo da diversidade de bactérias associadas às raízes de milho, relatam não terem sido encontradas quaisquer sequências atribuídas a mitocôndria, cloroplasto ou eucariotos. Esse *primer* foi também utilizado com sucesso em gramíneas, por outros autores, investigando bactérias endofíticas em arroz (SUN et al., 2008) e milho (JOHNSTON-MONJE; RAIZADA, 2011; LIU et al., 2012). No entanto, Bodenhausen, Horton e Bergelson (2013), estudando comunidade endofítica associada a raízes e folhas de *Arabidopsis thaliana*, encontraram índices de até 23% de suas sequências atribuídas a plantas.

De todas as bibliotecas, um total de 49 sequências foi atribuído a bactérias com alguma atividade de interesse agrônômico, tais como promotora de crescimento ou com atividade de controle de doenças. Os detalhes destes clones, bem com as suas atividades de interesse, constam da Tabela 7.

**Tabela 7** - Resumo dos gêneros de interesse agrônômico encontrados nas bibliotecas de clones do gene 16S rRNA de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*\*

Filo	Número de clones			Gênero	Atividade							Referência**		
	INS	BIT	MLE		PS	NFF	NFS	FU	SID	NE	SRI		i-PGPR	e-PGPR
<i>Proteobacteria</i>	3	2		<i>Burkholderia</i>	+	+	+				+	+	+	1, 2, 3
		7	6	<i>Pseudomonas</i>	+	+		+	+	+	+		+	2, 3, 4, 5
		5	2	<i>Acinetobacter</i>	+								+	2, 3
		6	2	<i>Caulobacter</i>									+	2
		2	2	1	<i>Bradyrhizobium</i>			+				+		2
<i>Firmicutes</i>	2	5	4	<i>Staphylococcus</i>	+								+	1
TOTAL	7	27	15											

As bibliotecas foram construídas a partir de folhas coletadas em três ocasiões: instalação (INS), e aos 45 dias de cultivo sob os tratamentos biorreator de imersão temporária (BIT) e meio líquido estático (MLE).

\* adaptado de Rodríguez-Díaz et al. (2008). SF: solubilização de fosfato; FNL: fixador de nitrogênio livre; FNS: fixador de nitrogênio em simbiose; FU: atividade antifúngica; SID: produção de sideróforo; NE: nematicida; IRS: indutor de resistência sistemática; e-RPC: rizobactéria extracelular promotora de crescimento; i-RPC: rizobactéria intracelular promotora de crescimento.

\*\* 1: Gray; Smith (2005); 2: Mavingui et al. (1997); 3: Molina et al. (2003); 4: Bloemberg; Lugtenberg (2001); 5: Thaning et al. (2001).

Apesar de estes gêneros terem sido descritos na literatura como benéficos às plantas (Tabela 7), todos esses estudos foram feitos em plantas em campo e quando em condições *in vitro* a resposta pode não ser a mesma. Toledo (2011) isolou e identificou bactérias responsáveis pela perda de explantes por contaminação e muitos dos gêneros identificados são também descritos como benéficos em campo (*Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Glucanocetbacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Rizobium* entre outros), concluindo que a maior fonte de contaminação seria o próprio material vegetal e as bactérias nele presentes, e não o manipulador ou ao meio externo.

#### **5.4.2.3 PCR quantitativo em tempo real para o gene 16S rRNA de *Bacteria***

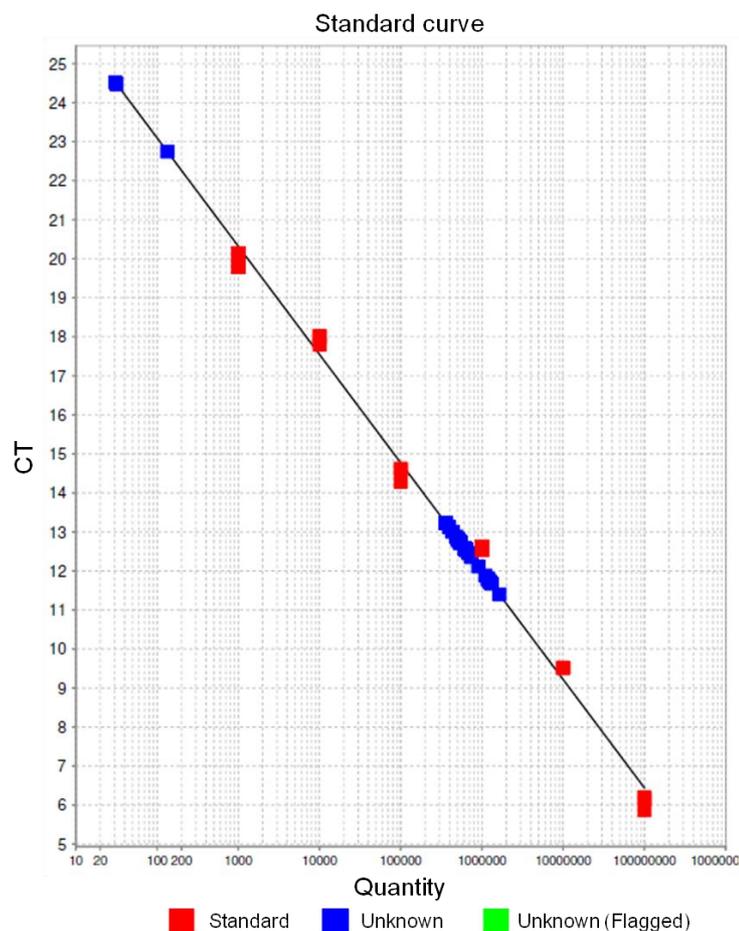
A especificidade das reações foi checada através da análise das curvas de *melting*. Estas curvas são capazes de diferenciar fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, no entanto com composição de bases nucleotídicas distintas, surgindo diferentes picos de *melting* (RIRIE; RASMUSSEN; WITTEWER, 1997). Fragmentos de mesmo tamanho, mas com poucas bases nucleotídicas diferentes, podem resultar em diferença de temperatura de *melting* (TM) de 1 a 5° C (KE; WARTELL, 1993). Desta forma, nas análises realizadas neste estudo, apenas as reações que apresentaram uma variação de no máximo 5 °C de temperatura de *melting* foram consideradas válidas para a quantificação.

Seguindo-se a condição acima descrita, somente as amostras coletadas no momento instalação (INS) precisaram ser desconsideradas, pois apresentou uma variação na TM de 9,8 °C, enquanto as variações na TM das amostras de biorreator de imersão temporária (BIT) e de meio de cultura líquido estático (MLE) foram satisfatórias (0,35 e 0,70 °C, respectivamente) (Tabela 8).

**Tabela 8** - Valores de temperatura de *melting* (TM) da curva padrão das amostras de folhas de cana-de-açúcar utilizadas na instalação (INS) do experimento de cultivo *in vitro* e aos 45 dias de cultivo sob os tratamentos biorreator de imersão temporária (BIT) e meio de culturalíquido estático (MLE). Os valores foram obtidos pela análise da curva de *melting* das reações de qPCR com os *primers* para o domínio *Bacteria* U968F e R1387

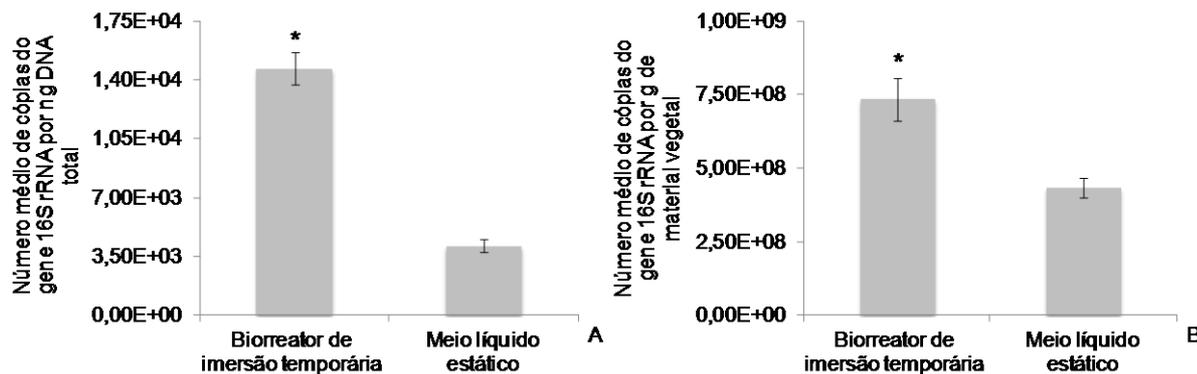
Amostra	TM (°C) da curva padrão (média)	TM (°C) das amostras			
		Mínima	Máxima	Média	Variação
INS	84,35	84,70	94,50	89,04	9,80
BIT	84,35	84,70	85,05	84,79	0,35
MLE	84,35	84,70	85,40	84,84	0,70

A reação mostrou eficiência de amplificação de 129,2% com valores de correlação da ordem de  $R^2 > 0,993$ . A eficiência maior do que a esperada (entre 80 e 110%) foi devido ao fato de algumas amostras estarem fora da curva padrão (Figura 29).



**Figura 29** - Curva de amplificação padrão e quantificação do gene 16S rRNA para amostras de folha de cana-de-açúcar sob os tratamentos biorreator de imersão temporária, meio líquido estático e no momento de instalação do experimento. Os valores de Cts (*Cycle threshold*) obtidos na reação foram utilizados para a normalização dos dados. Pontos em azul: amostras de folha de cana-de-açúcar sob os tratamentos avaliados neste estudo; pontos em vermelho: curva padrão a partir de clones de bibliotecas contendo o gene ribossomal

O número de cópias do gene 16S rRNA, calculado por nanograma (ng) de DNA total extraído, foi 3,54 vezes maior ( $1,47 \times 10^4$  cópias  $\text{ng}^{-1}$ ) no tratamento BIT em relação ao MLE, e para o cálculo de número de cópias por grama (g) de material vegetal, “BIT” também apresentou maior número de cópias, com 1,7 vezes mais cópias ( $7,33 \times 10^8$  cópias  $\text{g}^{-1}$ ) em relação ao “MLE” (Figura 30).



**Figura 30** - Quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* nas amostras de folhas de cana-de-açúcar sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. Barras representam médias ( $\pm$  erro padrão) aos 45 dias de cultivo. Os cálculos foram feitos para número de cópias do gene por nanograma (ng) de DNA total (A) e para número de cópias do gene por grama (g) de material vegetal (B). Em ambos os cálculos, a médias diferiram significativamente (\*) ( $p < 0,05$ )

Diante dos dados apresentados, pode-se dizer que as folhas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* por 45 dias sob o tratamento “BIT”, apresentaram um maior número de cópias do gene 16S rRNA de bactéria, o que nos permite inferir que neste sistema também está presente uma quantidade maior de bactérias em relação a “MLE”. A condição de melhor aeração do sistema “BIT”, proporcionada pela injeção de ar periódica, pode estar relacionada com essa maior quantidade de bactérias.

Para as mesmas amostras analisadas por qPCR, as bibliotecas de clones do gene 16S rRNA não apresentaram diferenças entre a comunidade presente comparando-se os dois sistemas de cultivo. Possivelmente, a diferença entre as comunidades presentes nos dois sistemas é devida à quantidade total de bactérias encontradas, e não necessariamente em relação aos microrganismos presentes.

Azevedo (1998) afirma que o limiar entre um microrganismo ser benéfico e patogênico é muito sutil, aparentemente, isso também se aplica ao ambiente de cultivo *in vitro*. Algumas das espécies de bactérias identificadas neste estudo, em culturas visualmente isentas de microrganismos, coincidem com espécies caracterizadas como contaminantes em outros trabalhos, o que nos leva a deduzir que o limiar entre uma situação harmônica e de contaminação é uma questão quantitativa.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na busca por um sistema de cultivo *in vitro* que nos permitisse avaliar os impactos de diferentes sistemas de cultivo na comunidade microbiana, observou-se haver diferenças entre as respostas das espécies em relação aos sistemas empregados.

Obtido o modelo de estudo, e utilizando-se diferentes técnicas moleculares, os resultados deste trabalho corroboram com a hipótese de que, plantas saudáveis cultivadas sob sistemas de cultivo *in vitro*, possuem uma comunidade endofítica onipresente.

As análises de T-RFLP, realizadas com a bromélia *Dyckia distachya*, mostram que, apesar do número de UTOs encontradas nos três tratamentos avaliados, terem sido similares (13-14), a abundância relativa de UTOs no melhor tratamento (para o parâmetro número de brotos formados) foi claramente diferente, comparada com os demais tratamentos, indicando um efeito qualitativo do sistema de cultivo na comunidade.

Para o cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar, o sistema biorreator de imersão temporária apresentou, além de melhor taxa de multiplicação, uma maior quantidade de bactérias. Esta pode estar relacionada à condição de melhor aeração do meio e renovação da atmosfera observada neste sistema, comparando-se com meio de cultura líquido estático.

Estes estudos indicam que, além dos já conhecidos fatores fisiológicos envolvidos no desempenho das plantas sob o cultivo *in vitro*, um fator biológico associado a essa comunidade microbiana encontrada possivelmente, exerce influências sobre o desenvolvimento das mesmas. Estudos mais aprofundados, caracterizando as bactérias envolvidas e seu papel na interação planta-microrganismo poderão contribuir para uma melhor compreensão das diferenças de resposta entre os diferentes sistemas *in vitro* para diferentes espécies de plantas.



## REFERÊNCIAS

- ABREU-TARAZI, M. F. et al. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated "axenic" pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.
- AHUJA, M. R. Regeneration and germplasm preservation in aspes-*Populus*. In: \_\_\_\_\_ **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 187-194.
- AKELLO, J. et al. Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 11, p. 1437-1441, 2008.
- ALMEIDA, C. V. et al. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, 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, DF, v. 40, n. 5, p. 467-470, 2005.
- ALMEIDA, W. A. B. et al. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, n. 2, p. 296-300, 2002.
- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid-medium culture for banana micropropagation - effects of temporary immersion of explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 55-60, 1993.
- ALVES, G. M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 204-207, 2006.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in-situ* detection of individual microbial-cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 417-432, 2009.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 145-180, 2000.

ARANDA-PERES, A. N. et al. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the Brazilian Atlantic forest: The importance of calcium. **Hortscience**, St. Joseph, v. 44, n. 2, p. 536-536, 2009.

ARRABAL, R. et al. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 11, n. 6, p. 1081-1089, 2002.

AVANISS-AGHAJANI, E. et al. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 34, n. 1, p. 98-102, 1996.

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

BAIRU, M. W.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 3, p. 239-248, 2009.

BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.

BAKKER, H. The growth of sugarcane. In: BAKKER, H (Ed.). **Sugarcane cultivation and management**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. p. 27-52.

BALDANI, J. I. et al. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane - reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, n. 4, p. 417-423, 2002.

BASSLER, H. A. et al. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, n. 10, p. 3724-3728, 1995.

BEATTIE, G. A. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Plant - associated bacteria**. Heidelberg: Springer, 2007. p. 1-55.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: profile and adaptive radiation. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 690 p.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, n. 1, p. 11-18, 2009.

BERTALAN, M. et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 450, 2009. doi: 10.1186/1471-2164-10-450.

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

BODDEY, R. M. et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 139-149, 2003.

BODENHAUSEN, N.; HORTON, M. W.; BERGELSON, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 2, e56329, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0056329

BOHANNAN, B. J. M.; HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, n. 3, p. 282-287, 2003.

BRAKER, G. et al. Community structure of denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along redox gradients in pacific northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 4, p. 1893-1901, 2001.

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, Durham, v. 27, n. 4, p. 326-349, 1957.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, Natick, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.

BROWN, T. A. Synthesis and processing of RNA. In: BROWN, T. A. **Genomes**. 2. ed. Oxford: Wiley-Liss, 2002. cap. 10.

BUNN, E.; TAN, B. Microbial contaminants in plant tissue culture propagation. In: **Microorganisms in plant conservation and biodiversity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 307-335.

CANNAVAN, F. S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Microbiana) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CANUTO, E. L. et al. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, Seropédica, v. 37, p. 67-72, 2003.

CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, New York, v. 11, n. 4, p. 265-270, 1984.

CHAO, A.; MA, M. C.; YANG, M. C. K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. **Biometrika**, Cambridge, v. 80, n. 1, p. 193-201, 1993.

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.

CHI, F. et al. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, n. 11, p. 7271-7278, 2005.

CHO, I.; BLASER, M. J. Applications of next-generation sequencing: The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 13, n. 4, p. 260-270, 2012.

CHU, I. Economic analysis of automated micropropagation. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 19-27.

CIDADE, D. A. P. et al. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, p. 385-391, 2006.

CLEMENT, B. G. et al. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 135-142, 1998.

COFFANI-NUNES, J. V. Bromélias. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Ed.). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: SENAC, 2002. p. 119-132.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. D141-D145, 2009.

COMPANT, S. et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 84-93, 2008.

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

CONN, V. M.; FRANCO, C. M. M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, n. 3, p. 1787-1794, 2004.

CONRATH, U. et al. Priming: Getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, n. 10, p. 1062-1071, 2006.

COSTA, A. F. **Revisão taxonômica do complexo *Vriesea paraibica* Wawra (*Bromeliaceae*)**. 2002. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microorganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 17-60.

CULMAN, S. W. et al. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 55-63, 2008.

DE BELLIS, P.; SCHENA, L.; CARIDDI, C. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 118, n. 1, p. 11-22, 2007.

DEBIASI, C. Utilização de biorreatores de imersão temporária emu ma biofábrica de cultura de tecidos vegetais. In: GERALD, L. T. S. (Org.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1. ed. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 100-117.

DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 25, p.189-195, 2009.

DINI-ANDREOTE, F. et al. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 336, n. 1-2, p. 337-349, 2010.

DROSTE, A. et al. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

DUAN, J. et al. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 938-945, 2006.

EICHORST, S. A.; KUSKE, C. R.; SCHMIDT, T. M. Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum *Acidobacteria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 77, n. 2, p. 586-596, 2011.

ESCALONA, M. et al. Pineapple (*Ananas comosus* L-Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 9, p. 743-748, 1999.

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

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 3, p. 215-231, 2002.

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

FAO. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 05 jun. 2013.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

FENG, Y.; SHEN, D.; SONG, W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 938-945, 2006.

FEUSER, S. et al. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, n. 3, p. 221-227, 2003.

GARCIA-GONZALES, R. et al. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, Chile, v. 37, n. 3, p. 5-30, 2010.

GEORGE, E. F. Plant tissue procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 1-28.

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

GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in *Bromeliaceae*: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, New York, v. 98, n. 5, p. 872-895, 2011.

GOLDEMBERG, J. et al. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, Washington, DC, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.

GONZALEZ, J. M.; PORTILLO, M. C.; SAIZ-JIMENEZ, C. Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 1024-1028, 2005.

GOSAL, S. K. et al. Biotization with *Piriformospora indica* and *Pseudomonas fluorescens* improves survival rate, nutrient acquisition, field performance and saponin content of micropropagated *Chlorophytum* sp. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 9, n. 3, p. 289-297, 2010.

GOVINDARAJAN, M. et al. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 280, n. 1-2, p. 239-252, 2006.

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, DF: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 395-412, 2005.

GRUPTA, R.; MUKERJI, K. G. Root exudate biology. In: MUKERJI, K. G. et al. (Ed.). **Techniques in mycorrhizal studies**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 103-131.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the micropropagation of Bromeliads. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants**. Heidelberg: Springer, 2009. p. 47-66.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HALLMANN, J.; BERG, G. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In: SCHULZ, B. J. E. et al. (Ed.). **Microbial root endophytes**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 15-31.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

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

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, n. 1, p. 1-21, 1998.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DEBUYSER, J. Genetic-analysis of *in-vitro* plant-tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, Wageningen, v. 79, n. 1-2, p. 45-58, 1994.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

HOOPER, L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, Washington, DC, v. 291, n. 5505, p. 881-884, 2001.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, Washington, DC, v. 336, n. 6086, p. 1268-1273, 2012.

HUANG, P.-L. et al. Micropropagation of the bromeliad *Guzmania* 'Hilda' via organogenesis and the effect of alpha-naphthaleneacetic acid on plantlet elongation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 4, p. 894-898, 2011.

HUEY, B.; HALL, J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli* - minisatellite probe from bacteriophage-M13. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 171, n. 5, p. 2528-2532, 1989.

HUGHES, J. B. et al. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 10, p. 4399-4406, 2001.

HUI, A. V. et al. Establishment of a shoot proliferation protocol for banana (ABB group) cv. 'Pisang awak' via temporary immersion system. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 36, n. 4, p. 529-538, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 05 jun. 2013.

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M. N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 6, 2011.

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.

KE, S. H.; WARTELL, R. M. Influence of nearest-neighbor sequence on the stability of base-pair mismatches in long DNA - determination by temperature-gradient gel-electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 21, n. 22, p. 5137-5143, 1993.

KHAN, I. A. et al. Effect of sucrose and growth regulators on the micropropagation of sugarcane clones. **Pakistan Journal of Botany**, Tandojam, Pakistan, v. 38, n. 4, p. 961-967, 2006.

KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 2. ed. Piracicaba: ESLAQ/USP, NAP/MEPA, 1999. 45 p.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from plant-tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, n. 2, p. 139-144, 1992.

KREBS, C. J. **Ecological methodology**. 2. ed. New York: Addison Wesley Longman, 1998. 620 p.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. 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.

LACAVA, P. T. et al. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 535-541, 2006.

LAUBER, C. L. et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, n. 15, p. 5111-5120, 2009.

LAWRENCE, C. J.; WALBOT, V. Translational genomics for bioenergy production from fuelstock grasses: maize as the model species. **Plant Cell**, Baltimore, v. 19, n. 7, p. 2091-2094, 2007.

LEE, S.-H.; KA, J.-O.; CHO, J.-C. Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 285, n. 2, p. 263-269, 2008.

LEHOURS, A. C. et al. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, n. 11, p. 7389-7400, 2005.

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant-cell and tissue-cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 2, p. 83-109, 1995.

LEMOS, E. E. P. et al. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, p. 482-487, 2001.

LEMOS, E. E. P. Micropropagação de cana-de-açúcar. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 257-286.

LIU, W. T. et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997.

LIU, Y. et al. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 194, n. 12, p. 1001-1012, 2012.

LORENZO, J. C. et al. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, n. 3, p. 197-200, 1998.

LUDWIG, W. et al. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, n. 4, p. 1363-1371, 2004.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 12. ed. Sarasota, Florida: The Marie Selby Botanical Gardens, The Bromeliad Society International, 2010.

MAGNANI, G. S. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MAIDAK, B. L. et al. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 1, p. 171-173, 1999.

MALHOTRA, S. D. Biotechnology and sugarcane. **International Sugar Journal**, London, v. 97, n. 1156, p. 160-163, 1995.

MARTINELLI, G. et al. *Bromeliaceae* da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.

MARTINELLI, G. The Bromeliads of the Atlantic forest. **Scientific American**, New York, v. 282, n 3, p. 86–93, 2000.

MATOS, A. P.; REINHARDT, D. H. Pineapple in Brazil: characteristics, research and perspectives. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 822, p. 22-36, 2009.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 205-251.

MAVINGUI, P. et al. Generation of *Rhizobium* strains with improved symbiotic properties by random DNA amplification (RDA). **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, n. 6, p. 564-569, 1997.

MEHROTRA, S. et al. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, Lagos, v. 6, n. 13, p. 1484-1492, 2007.

MENGARDA, L. H. G. et al. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de *Bromeliaceae*. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, p. 469-474, 2009.

MOESENEDER, M. M. et al. Optimization of terminal-restriction fragment length

polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, n. 8, p. 3518-3525, 1999.

MOLINA, L. et al. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 71-81, 2003.

MORDOCCO, A. M.; BRUMBLEY, J. A.; LAKSHMANAN, P. Development of a temporary immersion system (RITAA (R)) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 45, n. 4, p. 450-457, 2009.

MUDGE, S. R. et al. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species. **Planta**, Berlin, v. 229, n. 3, p. 549-558, 2009.

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

MURCH, S. J. et al. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 78, n. 1, p. 63-68, 2004.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NADKARNI, M. A. et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. **Microbiology**, Reading, v. 148, p. 257-266, 2002.

NAETHER, A. et al. Environmental factors affect Acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 78, n. 20, p. 7398-7406, 2012.

NICHOLSON, J. K. et al. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. **Science**, Washington, DC, v. 336, n. 6086, p. 1262-1267, 2012.

NKWANYANA, P. D.; SNYMAN, S. J.; WATT, M. P. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) *in vitro*: A comparison between semi-solid and liquid RITA (R) temporary immersion culture systems with respect to plant production and genotypic and phenotypic fidelity. **South African Journal of Botany**, Pretoria, South African, v. 76, n. 2, p. 400-400, 2010.

OLIVEIRA, A. C. et al. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, n. 10, p. 1048-1054, 2002.

OLIVEIRA, L. C. et al. Abundance of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) affects group characteristics and use of space by golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) in Cabruca agroforest. **Environmental Management**, New York, v. 48, n. 2, p. 248-262, 2011.

OLSEN, G. J. et al. Microbial ecology and evolution - a ribosomal-RNA approach. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 40, p. 337-365, 1986.

OVERBEEK, L. S. Exploration of hitherto-uncultured bacteria from the rizosphere. In: BRUIJN, F. J. **Molecular microbial ecology of the rhizosphere**. New York: Willey, 2013. v. 2, p. 169-177.

PACE, N. R. et al. The analysis of natural microbial-populations by ribosomal-RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 9, p. 1-55, 1986.

PAEK, K. Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 3, p. 287-300, 2005.

PAHL, A. et al. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 37, n. 6, p. 1958-1963, 1999.

PANDEY, R. N. et al. Technologies for cost reduction in sugarcane micropropagation. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, Lagos, v. 10, n. 40, p. 7814-7819, 2011.

PATEL, J. B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Molecular Diagnosis**, Naperville, Illinois, v. 6, n. 4, p. 313-321, 2001.

PIRTTILÄ, A. M. et al. Detection of Intracellular Bacteria in the Buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by *In Situ* Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 3073–3077, 2000.

PLANTS Database. *Bromeliaceae*. Disponível em: <http://plants.usda.gov/java/nameSearch?keywordquery=Aechmea+nudicaulis+&mode=sciname&submit.x=12&submit.y=10>. Acesso em: 17 jun. 2012.

PODOLICH, O. et al. *Methylobacterium* sp. resides in unculturable state in potato tissues *in vitro* and becomes culturable after induction by *Pseudomonas fluorescens* IMGB163. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v 106, p. 728-37, 2009.

POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. **Harvard Papers in Botany**, Cambridge, v. 4, p. 175–184, 1999.

PREIL, W. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. In: HVOSLEF-EIDE, A. K.; PREIL, W. (Ed.). **Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation**. Heidelberg: Springer, 2005. cap. 1, p. 1-20.

QUECINE, M. C. et al. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 78, n. 21, p. 7511-7518, 2012.

RASBAND, W. S. **ImageJ**. Bethesda, Maryland: US National Institutes of Health, 1997. Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em: 10 abr. 2012.

RECH FILHO, A. et al. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 14, n. 8, p. 1799-1808, 2005.

REITER, B. et al. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 5, p. 2261-2268, 2002.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica**. Itajaí, SC, 1983. 559 p. (Flora Ilustrada Catarinense. Série 983).

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 245, n. 2, p. 154-160, 1997.

RIO GRANDE DO SUL (Estado). Assembléia Legislativa. 2002. **Lista oficial das espécies plantas ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul**. Disponível em: [http://www.al.rs.gov.br/legis/M010/M0100099.ASP?Hid\\_Tipo=TEXTO&Hid\\_TodasNormas=320&hTexto=&Hid\\_IDNorma=320](http://www.al.rs.gov.br/legis/M010/M0100099.ASP?Hid_Tipo=TEXTO&Hid_TodasNormas=320&hTexto=&Hid_IDNorma=320) Acesso em: 12 jul. 2012.

RODRÍGUEZ-DÍAS, M. et al. A review on the taxonomy and possible screening traits of plant growth promoting rizobacteria. In: AHAMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (Ed.). **Plant bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2008. cap. 4, p. 55-80.

ROELS, S. et al. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 1, p. 57-66, 2005.

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

ROUSK, J. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, London, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, 2010.

RUDRAPPA, T. et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant Physiology**, Rockville, v. 148, n. 3, p. 1547-1556, 2008.

RUGGIERO, C. et al. **Controle integrado da fusariose do abacaxizeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 81 p.

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

SALOMÃO, K. **Aspectos reprodutivos e micropropagação em *Dyckia distachya* Hassler, espécie ameaçada de extinção**. 2013. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SAS INSTITUTE. **SAS/Stat user's guide: statistics**. Version 9.1. 3. ed. Cary, NC, 2004.

SCHAUFLEER, D. H.; WALKER, P. N. Micropropagated sugarcane shoot identification using machine vision. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 38, n. 6, p. 1919-1925, 1995.

SCHAUFLEER, D. H.; WALKER, P. N. Micropropagation of sugarcane between parallel plates. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 37, n. 4, p. 1225-1230, 1994.

SCHERER, R. F. et al. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 151, p. 38-45, 2013.

SCHERLING, C. et al. A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *Paenibacillus* sp isolate and *in vitro*-grown poplar plants revealed by metabolomics. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 22, n. 8, p. 1032-1037, 2009.

SCHILIRO, E. et al. Genetic responses induced in olive roots upon colonization by the biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 11, e48646, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0048646.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHLOSS, P. D.; LARGET, B. R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, n. 9, p. 5485-5492, 2004.

SCHUMANN, A. et al. Elicitation of galanthamine production by *Leucojum aestivum* shoots grown in temporary immersion system. **Biotechnology Progress**, New York, v. 29, p. 311-318, 2013.

SENGAR, R. S.; SENGAR, K.; GARG, S. K. Biotechnological approaches for high sugarcane yield. **Plant Sciences Feed**, Pune, Maharashtra, India, v. 1, n. 7, p. 101-111, 2011.

SENTHILKUMAR, M. et al. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. **Current Microbiology**, New York, v. 58, n. 4, p. 288-293, 2009.

SENTHILKUMAR, M. et al. Induction of endophytic colonization in rice (*Oryza sativa* L.) tissue culture plants by *Azorhizobium caulinodans*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 30, n. 8, p. 1477-1487, 2008.

SESSITSCH, A. et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 9, p. 4215-4224, 2001.

SHA, L.; MCCOWN, B. H.; PETERSON, L. A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 110, n. 5, p. 631-634, 1985.

SHANNON, C. E.; WEANER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University Illinois Press, 1949. 117 p.

SHEN, T. J.; CHAO, A.; LIN, C. F. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. **Ecology**, Brooklyn, v. 84, n. 3, p. 798-804, 2003.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, London, v. 163, n. 4148, p. 688-688, 1949.

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branched and bootstrap tests of phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 319-333, 1995.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (*Bromeliaceae*. Part 2). **Flora Neotropica Monograph**, New York, v. 14, p. 1493-2141, 1979.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (*Bromeliaceae*. Part 1). **Flora Neotropica Monograph**, New York, v. 14, p. 1-658, 1974.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (*Bromeliaceae*. Part 3). **Flora Neotropica Monograph**, New York, v. 14, p. 663-1492, 1977.

SNYMAN, S. J. et al. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 47, n. 2, p. 234-249, 2011.

SOE, K. M. et al. Effects of endophytic actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* strains on growth, nodulation, nitrogen fixation and seed weight of different soybean varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 58, n. 3, p. 319-325, 2012.

SOUZA, A. P.; BUCKERIDGE, M. S. Photosynthesis in sugarcane and its strategic importance to face the global climatic change. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability**. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. p. 320–323.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STRINGHETA, A. C. O. et al. Germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Tillandsia geminiflora* Brongn, em diferentes substratos. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 165-170, 2005.

STURZ, A. V. et al. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, London, v. 48, n. 3, p. 360-369, 1999.

STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 175, n. 2, p. 257-263, 1995.

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

SUGARCANECROPS. **Introduction**. Tel Aviv, Israel, 2010. Disponível em: <<http://www.sugarcanecrops.com/introduction/>>. Acesso em: 05 jun. 2013.

SUN, L. et al. 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.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Ed.). **Plant tissue culture engineering**. Heidelberg: Springer, 2006. p. 83-100.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 101, n. 30, p. 11030-11035, 2004.

TANAKA, K.; NAGAYA, T. (Ed.). **Microscopia eletrônica de varredura ilustrada**. Técnicas de preparo de material biológico. Tokyo: Editora Asakura, 1980.

THAKUR, R. et al. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, n. 5, p. 382-391, 2006.

THANING, C. et al. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* apothecial formation by the soil bacterium *Serratia plymuthica*: identification of a chlorinated macrolide as one of the causal agents. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 12-13, p. 1817-1826, 2001.

THERON, J.; CLOETE, T. E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 26, n. 1, p. 37-57, 2000.

THIES, J. E.; HOLMES, E. M.; VACHOT, A. Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 41, n. 3, p. 299-319, 2001.

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

TING, A. S. Y. et al. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 53, n. 3, p. 541-553, 2008.

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

TURNBAUGH, P. J. et al. The Human Microbiome Project. **Nature**, London, v. 449, n. 7164, p. 804-810, 2007.

VAN DE PEER, Y. et al. Database on the structure of small subunit ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 1, p. 179-183, 1999.

VAN OVERBEEK, L.; VAN ELSAS, J. D. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 283-296, 2008.

VERSTRAETE, B. et al. Symbiotic *beta-Proteobacteria* beyond Legumes: *Burkholderia* in *Rubiaceae*. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 1, 2013.

VETTORE, A. L. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Woodbury, v. 13, n. 12, p. 2725-2735, 2003.

WALKER, P. N.; HARRIS, J. P.; GAUTZ, L. D. Optimal environment for sugarcane micropropagation. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 34, n. 6, p. 2609-2614, 1991.

WANDERLEY, M. G. L. et al. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, 2006. v. 5.

WANG, Z. et al. Automated micropropagated sugarcane shoot separation by machine vision. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 42, n. 1, p. 247-254, 1999.

WANG, Z. et al. Identification and separation of micropropagated sugarcane shoots based on the Hough transform. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 41, n. 5, p. 1535-1541, 1998.

WEBER, O. B. et al. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, p. 1419-1426, 2003.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WENDT, T. A review of the subgenus *Pothuava* (Baker) of *Aechmea* Ruiz e Pav. (*Bromeliaceae*) in Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 125, p. 245-271, 1997.

WEYENS, N. et al. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 20, n. 2, p. 248-254, 2009.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOODSON, S. A.; LEONTIST, N. B. Structure and dynamics of ribosomal RNA. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 8, p. 294-300, 1998.

ZAHL, S. Jackknifing an index of diversity. **Ecology**, Brooklyn, v. 58, n. 4, p. 907-913, 1977.

ZHAO, Y. et al. Improved mass multiplication of *rhodiola crenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 166, n. 6, p. 1480-1490, 2012.

ZOBAYED, S. M. A. et al. Optimized system for biomass production, chemical characterization and evaluation of chemo-preventive properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Plant Science**, Amsterdam, v. 167, n. 3, p. 439-446, 2004.

**ANEXO**

Anexo A - Comparações dos clones representativos das UTO's com sequências depositadas no *GenBank* do NCBI

Filo	Número de clones por biblioteca			Número de acesso GENBANK	Descrição	Identidade (%)	Author	Fonte	Fonte de isolamento
	INS	BIT	MLE						
<i>Proteobacteria</i>			1	AFHG01000027.1	<i>Methyloversatilis universalis</i> FAM5 contig00044	100	Kittichotirat et al.	J. Bacteriol.(2011)	<i>Methyloversatilis universalis</i> FAM5
<i>Proteobacteria</i>	3	2		AY040362.1	<i>Burkholderia terricola</i>	100	Goris et al.	Syst. Appl. Microbiol.(2002)	<i>Burkholderia terricola</i>
<i>Proteobacteria</i>		1	1	JF799985.1	<i>Massilia namucuoensis</i> strain 333-1-0411	98	Kong et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2013)	soil
<i>Proteobacteria</i>		1		AB547156.1	<i>Acidovorax</i> sp. KBT017	99	Makizumi et al.	J. Gen. Plant Pathol.(2011)	squash seedling
<i>Proteobacteria</i>		1	2	EU888308.1	<i>Delftia lacustris</i>	100	Jorgensen et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2009)	<i>Delftia lacustris</i>
<i>Proteobacteria</i>			2	AB300597.1	<i>Variovorax boronicumulans</i>	99	Miwa et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2008)	soil collected from experimental field
<i>Proteobacteria</i>		1	1	CU926134.1	Uncultured <i>Betaproteobacteria</i>	94	Riviere et al.	ISME J (2009)	mesophilic anaerobic digester
<i>Proteobacteria</i>			1	AJ629192.1	<i>Kingella potus</i> 16S rRNA gene, type strain 3/SID/1128T	99	Lawson et al.	J. Clin. Microbiol. (2005)	<i>Kingella potus</i> type strain: 3/SID/1128
<i>Proteobacteria</i>		5	5	JN688162.1	<i>Pseudomonas monteilii</i> strain WS14	100	Zhang et al.	J. Microbiol.(2012)	soil
<i>Proteobacteria</i>			1	AY970951.1	<i>Pseudomonas vranovensis</i> strain CCM 7279	93	Tvrzova et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2006)	<i>Pseudomonas vranovensis</i>
<i>Proteobacteria</i>		2		JN688162.1	<i>Pseudomonas monteilii</i> strain WS14	97	Zhang et al.	J. Microbiol. (2012)	soil
<i>Proteobacteria</i>			1	JQ746036.1	<i>Lysobacter</i> sp. YIM 77875	100	Wei et al.	Antonie Van Leeuwenhoek(2012)	geothermal soil
<i>Proteobacteria</i>	1			HM269183.1	Uncultured bacterium clone ncd244e07c1	98	Kong et al.	Genome Res.(2012)	skin, volar forearm
<i>Proteobacteria</i>		2		EU014689.1	<i>Escherichia coli</i> strain KCTC 2441	100	Chang et al.	J. Microbiol. Methods(2008)	<i>Escherichia coli</i> strain="KCTC 2441"
<i>Proteobacteria</i>		2	1	CP002080.1	<i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1	100	Jung et al.	J. Bacteriol.(2010)	<i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1
<i>Proteobacteria</i>		2	1	AKIQ01000085.1	<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1 = CIP 110063 strain RAG-1 ctg555	99	Fondi et al.	J. Bacteriol.(2012)	seawater
<i>Proteobacteria</i>		1		ACQB01000091.1	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	97	Peleg et al.	PLoS ONE(2012)	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606
<i>Proteobacteria</i>	1			EF019208.1	Uncultured <i>Cystobacteraceae</i> bacterium	99	Lesaulnier et al.	Environ. Microbiol.(2008)	trembling aspen rhizosphere under ambient CO2 conditions
<i>Proteobacteria</i>		2		JF733462.1	Uncultured <i>Rhodobacteraceae</i>	99	Tang et al.	FEMS Microbiol. Ecol.(2012)	<i>Simulium innoxium</i> (black fly); male; larvae

Clones obtidos na construção da biblioteca de amostras de folhas de cana-de-açúcar coletadas no momento da instalação (INS) do experimento e aos 45 dias de cultivo sob biorreator de imersão temporária (BIT) e meio líquido estático (MLE).

Anexo A - Comparações dos clones representativos das UTO's com sequências depositadas no *GenBank* do NCBI

(continuação)

Filo	Número de clones por biblioteca			Número de acesso GENBANK	Descrição	Identidade (%)	Author	Fonte	Fonte de isolamento
	INS	BIT	MLE						
<i>Proteobacteria</i>		6	2	FJ719362.1	<i>Caulobacter</i> sp. T47	100	Hoque et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (2011)	soil
<i>Proteobacteria</i>			1	HE814774.2	<i>Phenylobacterium</i> sp. S3H10	99	Nissinen et al.	FEMS Microbiol. Ecol.(2012)	<i>Phenylobacterium</i> sp. S3H10
<i>Proteobacteria</i>	1			EF020326.1	Uncultured <i>Hyphomicrobiaceae</i> bacterium clone Elev_16S_1905	98	Lesaulnier et al.	Environ. Microbiol. (2008)	trembling aspen rhizosphere unde relevelated CO2 conditions
<i>Proteobacteria</i>	1			EF394922.1	<i>Reyranella massiliensis</i> strain 521	98	Pagnier et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2011)	<i>Reyranella massiliensis</i> 521
<i>Proteobacteria</i>	2	2	1	JN085499.1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3647	100	Sene et al.	Eur. J. Soil Biol. (2012)	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3647
<i>Proteobacteria</i>	1			EU849582.1	<i>Mesorhizobium robiniae</i> strain CCNWYC 115	97	Wei et al.	FEMS Microbiol. Ecol.(2009)	<i>Mesorhizobium robiniae</i>
<i>Proteobacteria</i>		2		FJ388511.1	Uncultured <i>Bosea</i> sp. clone DS138	100	Sagaram et al.	Appl. Environ. Microbiol. (2009)	citrus midrib
<i>Proteobacteria</i>		1		EF029110.2	<i>Novosphingobium resinovororum</i>	99	Lim et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (2007)	genomic DNA NCIMB 8767
<i>Proteobacteria</i>		1		FJ387953.1	Uncultured <i>Sphingomonas</i> sp. clone GS177	98	Sagaram et al.	Appl. Environ. Microbiol. (2009)	citrus midrib
<i>Proteobacteria</i>		1	2	HM629444.1	<i>Sphingomonas endophytica</i>	99	Huang et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2012)	<i>Sphingomonas endophytica</i>
<i>Proteobacteria</i>	1			EF018535.1	Uncultured <i>Phyllobacteriaceae</i> bacterium clone Amb_16S_795	92	Lesaulnier et al.	Environ. Microbiol. (2008)	trembling aspen rhizosphere under ambient CO2 conditions
<i>Acidobacteria</i>	1			HM062275.1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone KBS_T1_R5_149261_e4	99	Eichorst et al.	Appl. Environ. Microbiol.(2011)	soil collected from 0-7cm of agricultural plots
<i>Acidobacteria</i>	7			HQ598347.1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone AEW_08_546	99	Naether et al.	Appl. Environ. Microbiol.(2012)	woodland soil
<i>Acidobacteria</i>	1			HQ010221.1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone soil31_G9	99	Goffredi et al.	Microb. Ecol.(2011)	rainforest soil
<i>Acidobacteria</i>	2			HQ598667.1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone HEW_08_554	99	Naether et al.	Appl. Environ. Microbiol.(2012)	woodland soil
<i>Acidobacteria</i>	1			HM062090.1	Uncultured <i>Acidobacteria</i>	99	Eichorst et al.	Appl. Environ. Microbiol.(2011)	soil collected from 0-7cm plots never used for agriculture
<i>Acidobacteria</i>	2			EU192982.1	Uncultured <i>Acidobacteriales</i>	99	Ceja-Navarro et al.	Plant Soil (2010)	agricultural soil
<i>Acidobacteria</i>	3			HM061730.1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone KBS_T8_R1_149288_e6	99	Eichorst et al.	Appl. Environ. Microbiol.(2011)	soil collected from 0-7cm plots never used for agriculture
<i>Acidobacteria</i>	1			HM748709.1	<i>Bacterium</i> Ellin6561	99	Davis et al.	Environ. Microbiol.(2011)	soil

Clones obtidos na construção da biblioteca de amostras de folhas de cana-de-açúcar coletadas no momento da instalação (INS) do experimento e aos 45 dias de cultivo sob biorreator de imersão temporária (BIT) e meio líquido estático (MLE).

Anexo A - Comparações dos clones representativos das UTO's com sequências depositadas no *GenBank* do NCBI

(continuação)

Filo	Número de clones por biblioteca			Número de acesso GENBANK	Descrição	Identidade (%)	Author	Fonte	Fonte de isolamento
	INS	BIT	MLE						
<i>Actinobacteria</i>		1		CP000386.1	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> DSM 9941	99	Copeland et al.	Unpublished	genomic DNA DSM 9941
<i>Actinobacteria</i>		1	1	JF496721.1	<i>Propionibacterium acnes</i>	99	Tenorio et al.	J Oral Microbiol 3 (2011)	subgingival plaque
<i>Actinobacteria</i>	1			EF018492	Uncultured <i>Thermomonosporaceae</i>	98	Lesaulnier et al.	Environ. Microbiol. (2008)	trembling aspen rhizosphere under ambient CO2 conditions
<i>Actinobacteria</i>		1		CP001618	<i>Beutenbergia cavernae</i> DSM 12333	90	Land et al.	Stand Genomic Sci.(2009)	Cave soil
<i>Firmicutes</i>	2	5	4	JQ082128.1	<i>Staphylococcus</i> sp. U1368-101106-SW104	100	Yin et al.	PLoS ONE.(2013)	South Pacific ocean surface seawater
<i>Firmicutes</i>		2	2	AJ846291.1	<i>Exiguobacterium indicum</i> partial 16S rRNA gene	100	Chaturvedi et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2006)	water
<i>Firmicutes</i>		7	5	NR_074516.1	<i>Streptococcus gordonii</i>	100	Vickerman et al.	J. Bacteriol.(2007)	<i>Streptococcus gordonii</i> str. Challis substr CH1
<i>Firmicutes</i>		5		JN004270.1	<i>Streptococcus tigurinus</i>	100	Zbinden et al.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2012)	blood culture
<i>Eukaryota</i>	2	13	16	DQ984518.1	<i>Sorghum bicolor</i> mitochondrion	100	Allen et al.	Unpublished	<i>Sorghum bicolor</i> mitochondrion
<i>Eukaryota</i>	5	12	10	JN861112.1	<i>Oryza sativa</i> Indica Group mitochondrion	100	Zhang,T. et al.	PLoS ONE.(2012)	<i>Oryza sativa</i> Indica Group mitochondrion
<i>Eukaryota</i>				AE009947.2	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP-80-3280 chloroplast	97	Calsa et al.	Unpublished	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP80-3280
<i>Bacteria</i>			1	JN568091.1	Uncultured <i>Cyanobacterium</i> clone SSN1OH10	97	Rodriguez et al.	Unpublished	CAFO bioaerosol
<i>Eukaryota</i>				AE009947.2	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP-80-3280 chloroplast	100	Calsa et al.	Unpublished	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP80-3280
<i>Bacteria</i>	3	79	81	JN568091.1	Uncultured <i>Cyanobacterium</i> clone SSN1OH10	100	Rodriguez et al.	Unpublished	CAFO bioaerosol
?		1		EU133430.1	Uncultured bacterium clone FFCH14837	93	Eishahed et al.	Appl. Environ. Microbiol.(2008)	soil from an undisturbed mixed grass prairie preserve
?	1			HM269183.1	Uncultured bacterium clone ncd244e07c1	98	Kong et al.	Genome Res.(2012)	skin, volar forearm
?	1			AY963499.1	Uncultured bacterium clone BS63	89	Chan et al.	FEMS Microbiol. Ecol.(2006)	soil
	1			EU335368.1	Uncultured bacterium clone BacB_063	89	Hansel et al.	Appl. Environ. Microbiol.(2008)	unsaturated B horizon soil aggregate

Clones obtidos na construção da biblioteca de amostras de folhas de cana-de-açúcar coletadas no momento da instalação (INS) do experimento e aos 45 dias de cultivo sob biorreator de imersão temporária (BIT) e meio líquido estático (MLE).

Anexo A - Comparações dos clones representativos das UTO's com sequências depositadas no *GenBank* do NCBI

(conclusão)

Filo	Número de clones por biblioteca			Número de acesso GENBANK	Descrição	Identidade (%)	Author	Fonte	Fonte de isolamento
	INS	BIT	MLE						
?	1			AY963499.1	Uncultured <i>bacterium</i> clone BS63	94	Chan et al.	FEMS Microbiol. Ecol.(2006)	soil
?	1			JQ051701.1	Uncultured <i>bacterium</i> clone H-HN-A4-Min_289091	97	Turlapati et al.	FEMS Microbiol. Ecol.(2013)	soil
?	112			AY963499.1	Uncultured <i>bacterium</i> clone BS63	100	Chan et al.	FEMS Microbiol. Ecol.(2006)	soil
?	3	32	26						

Clones obtidos na construção da biblioteca de amostras de folhas de cana-de-açúcar coletadas no momento da instalação (INS) do experimento e aos 45 dias de cultivo sob biorreator de imersão temporária (BIT) e meio líquido estático (MLE).