



REVISÃO

Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas

Natalia Pimentel Esposito-Polesi¹*

Recebido: 10 de maio de 2011 Recebido após revisão: 02 de agosto de 2011 Aceito: 04 de agosto de 2011
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1914>

RESUMO: (Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas). A cultura de tecidos vegetais tem sido uma importante ferramenta amplamente utilizada para diversas finalidades. Neste contexto, o termo plantas axênicas, tem sido difundido como um ideal a ser atingido nesta técnica, havendo a busca de métodos que eliminem de forma eficaz todo e qualquer microrganismo que possa, eventualmente, crescer no meio de cultura. No entanto, cada vez mais se observa que a concepção de contaminação dentro da cultura de tecidos deve ser revista, assim como a de planta axênica, pois muitos trabalhos mostram que mesmo em microplantas assintomáticas consideradas axênicas, existe uma comunidade endofítica onipresente e que na sua grande maioria desempenha papel fundamental no estabelecimento, desenvolvimento e aclimatização das culturas, sendo, portanto, microrganismos benéficos que devem ser conservados no cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: micropropagação, axênica, endófitos, benéficos.

ABSTRACT: (Endophytic microorganisms and plant tissue culture: breaking paradigms). Plant tissue culture has been an important tool widely used for various purposes. Within this context, the term axenic plant has been taken as an ideal to be achieved in this technique, which the search based on methods that effectively eliminate any microorganisms that may eventually grow into the culture medium. However, it is seen that the conception of contamination in tissue culture should be reviewed as well as axenic plants, because several studies have shown that even in asymptomatic microplants considered axenic, there is an ubiquitous and that the endophytic community mostly plays a fundamental role in the establishment, development and acclimatization of cultures, therefore, beneficial microorganisms that should be preserved *in vitro*.

Key words: micropropagation, axenic, endophytic, benefits.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais é amplamente utilizada com diversas finalidades, dentre elas a micropropagação tem merecido destaque devido à rápida produção de mudas saudáveis num espaço físico reduzido (Alvares & Caldas 2002, Lima & Moraes 2006, Baldotto *et al.* 2010). Inúmeros fatores podem influenciar a cultura de tecidos, dentre eles o fator mais determinante para o sucesso ou não do cultivo *in vitro* é a contaminação microbiana, sendo responsável por perdas severas em biofábricas e laboratórios de pesquisa (Dantas *et al.* 2002, Donato *et al.* 2005). Essa contaminação se deve, principalmente, à presença de microrganismos epifíticos, oportunistas ou patogênicos, que podem penetrar nos tecidos ou estarem presentes na superfície do explante, se desenvolvendo no meio de cultura devido a uma desinfestação ineficiente, ou ainda, pela entrada de microrganismos após o estabelecimento da microplanta devido ao manuseio incorreto durante as subculturas (Londe *et al.* 2007, Panicker *et al.* 2007).

Os microrganismos endofíticos têm sido mencionados em vários estudos como fontes de contaminação na micropropagação, porém, outros consideram sua presença como um fator positivo capaz de auxiliar a planta, uma vez que vivem no interior de seus tecidos

sem causar sintomas de sua presença, podendo, no caso específico do cultivo *in vitro*, favorecer o ajuste osmótico, a produção de fitormônios e absorção de nutrientes (Pirttilä *et al.* 2008, Almeida *et al.* 2009, Abreu-Tarazi *et al.* 2010). Na maioria das vezes, esses microrganismos não se manifestam de forma visível e nem crescem no meio de cultura, sendo observados somente em análises microscópicas das plantas micropropagadas, contradizendo, portanto, a suposição de que estas plantas são axênicas (Barrow *et al.* 2004).

Sendo assim, a presente revisão tem por objetivo fornecer subsídios para melhor compreender essa associação de maneira a contestar o paradigma de que plantas cultivadas sob condições assépticas sejam axênicas, ou seja, isentas de qualquer microrganismo, inferindo que existe uma microbiota onipresente em todas as espécies vegetais independente de sua forma de cultivo.

MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Os microrganismos endofíticos ou endófitos vivem dentro da planta em parte ou em todo o seu ciclo de vida sem causar qualquer sintoma visível de sua presença, podendo ser isolados de tecidos de plantas que tiveram sua superfície desinfestada (Saikkonen 2007,

1. Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP). Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: natalia.polesi@yahoo.com.br

Guo *et al.* 2008, Hardoim *et al.* 2008, Sun *et al.* 2008, Qin *et al.* 2011). Tais microrganismos são isolados de flores, frutos, folhas, caules, raízes, e sementes de várias espécies vegetais (Thomas *et al.* 2007, Melnick *et al.* 2008, Piccolo *et al.* 2010, Qin *et al.* 2011) e colonizam os espaços inter e intracelulares de diferentes tecidos vegetais como parênquima, epiderme, bainha do feixe vascular, xilema, floema, etc (Elbeltagy *et al.* 2001, Yonezawa *et al.* 2004, Franke-Whittle *et al.* 2005, Almeida *et al.* 2009, Esposito-Polesi 2010, Piccolo *et al.* 2010).

De acordo com as estratégias de vida dos endófitos eles podem ser classificados em obrigatórios ou facultativos. Os obrigatórios são estritamente dependentes da planta hospedeira para seu crescimento e sobrevivência. Os facultativos, por outro lado, possuem uma fase de seu ciclo dentro da planta hospedeira e outra em que vivem fora delas (Hardoim *et al.* 2008). Alguns são mais frequentes em determinado tipo de vegetal, designados dominantes, em contraposição há outros mais raros, chamados de secundários (Pileggi 2006).

As associações de microrganismos endofíticos com seus hospedeiros, na maioria das vezes, são simbióticas e/ou mutualísticas (Guo *et al.* 2008, Melnick *et al.* 2008). Dessa forma, os microrganismos endofíticos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira que, por sua vez, é beneficiada com o favorecimento de seu crescimento e desenvolvimento devido à rapidez na formação de mudas, resistência a nematóides e diversos patógenos, bem como tolerância a condições ambientais e nutricionais adversas (Almeida *et al.* 2005, Bandara *et al.* 2006, Guo *et al.* 2008).

A relação entre a planta hospedeira com a comunidade endofítica envolve um processo de co-evolução regido pela sua colonização, que é influenciada pelo genótipo, estágio de crescimento, *status* fisiológico, tipo de tecido da planta, práticas agrícolas, além de condições ambientais como temperatura, oferta de água e nutrientes (Hardoim *et al.* 2008, Compant *et al.* 2010, Davitt *et al.* 2011, Gundel *et al.* 2011). A composição da comunidade associada às plantas pode, ainda, ser diferente, dependendo da espécie, do cultivar, e até mesmo entre espécies transgênicas e suas respectivas progenitoras (Andreote *et al.* 2010). A co-evolução das plantas com endófitos conduz a uma íntima relação, ocasionada por mudanças na informação em nível celular e molecular, que podem contribuir de diferentes formas na sanidade e desenvolvimento da planta (Aravind *et al.* 2010).

IMPORTÂNCIA DOS ENDÓFITOS

Controle Biológico

Dentro do controle biológico de doenças, o uso de microrganismos endofíticos tem gerado bons resultados (Aravind *et al.* 2010, Melnick *et al.* 2011). A efetividade dos endófitos como agentes de controle biológico depende de muitos fatores: a especificidade da planta hospedeira, a dinâmica de população e padrão de co-

lonização da planta, a habilidade para mover-se dentro dos tecidos da planta e a habilidade para induzir resistência sistêmica (Melnick *et al.* 2008). Os efeitos benéficos para as plantas hospedeiras incluem: impedimento de herbivoria, proteção contra nematóides e resistência contra patógenos de origem bacteriana e fúngica, podendo diretamente inibir a infecção e proliferação do patógeno dentro da planta hospedeira, ou indiretamente induzindo respostas de resistência intrínseca à planta (Mejía *et al.* 2008, Rohlf & Churchill 2011).

Muitos endófitos, como *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus* sp., *Phomopsis* sp. e *Chaetomium globosum*, apresentam ação fungicida contra *Phytophthora capsici*, *Monilophthora roleri*, *Botrytis cinérea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Verticillium wilt* e *Sclerotium rolfsii*, pela produção de diversas enzimas que degradam a parede celular como proteases, celulasas e quitinases, ou pela produção de substâncias como sideróforos (Melnick *et al.* 2008, Singh *et al.* 2008, Trotel-Aziz *et al.* 2008, Zhao *et al.* 2010, Melnick *et al.* 2011, Yu *et al.* 2011, Zheng *et al.* 2011).

Outros endófitos, como *Methylobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* sp. e *Streptomyces* spp., apresentam ação bactericida contra espécies como, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium atrosepticum* e *Pseudomonas syringae*, devido à produção de antibióticos e enzimas que degradam a parede celular como pectinase, celulase e protease (Tan *et al.* 2006, Adams *et al.* 2008, Ardanov *et al.* 2011, Pérez-García *et al.* 2011).

A proteção antipatogênica mediada por endófitos, também foi observada contra nematóides em gramíneas tropicais, plantas de tomateiro e bananeiras (Mejía *et al.* 2008). Akhtar & Siddiqui (2008) e Mendoza & Sikora (2009) relataram que *Bacillus firmus*, endófito que coloniza diversas espécies de plantas, é um potente bionemático no controle de *Meloidogyne incognita*, *Helicotylenchus* spp, *Tylenchorhynchus* spp, *Radopholus similis* e *Ditylenchus dipsaci*. Outra característica marcante desses microrganismos consiste no fato de que muitos produzem esporos com alta tolerância a condições ambientais adversas, permitindo seu uso em formulações de biopesticidas para aplicação no campo com menor impacto ambiental, como é o caso do bionemático registrado com o nome comercial de Bionem® WP que contém *Bacillus firmus* como agente biológico (Choudhary & Johri 2009, Zhao *et al.* 2010, Melnick *et al.* 2011, Mendoza & Sikora 2009).

Produção de Fitormônios

Estudos sugerem que os microrganismos endofíticos também atuam nas plantas como excelentes promotores de crescimento, sendo relatada sua eficiência em plantas de cana-de-açúcar e no aumento significativo do rendimento dos grãos de arroz (Bandara *et al.* 2006, Ting *et al.* 2008). Um dos principais mecanismos de promoção

do crescimento das plantas mediada por microrganismos endofíticos é a produção de fitormônios por bactérias como *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, que produzem fitormônios como o ácido indol acético, ácido indol butírico, gibberelinas, citocininas, octadecanóides, e compostos que imitam a ação dos jasmonatos (Forchetti *et al.* 2007, Kang *et al.* 2009, Pérez-García *et al.* 2011).

As plantas respondem às perturbações pela modificação dos níveis de vários hormônios, incluindo o ácido jasmônico (JA), ácido abscísico (ABA) e etileno (Ardanov *et al.* 2011). Muitas bactérias endofíticas produzem esses hormônios, que podem auxiliar na sobrevivência da planta, principalmente em espécies que crescem sob condições restritas, como seca e salinidade, (Forchetti *et al.* 2007, Ardanov *et al.* 2011).

Outros efeitos da colonização dos microrganismos endofíticos na promoção de crescimento da planta hospedeira incluem o ajuste osmótico, controle da abertura e fechamento estomático, modificação da morfologia radicular, eficiência fotossintética, aumento da captação e alteração do acúmulo de minerais, suprimento de vitaminas essenciais e metabolismo do nitrogênio (Bandara *et al.* 2006, Figueiredo *et al.* 2008). A inoculação com bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* em *Eucalyptus globulus* estimulou a formação de estacas, enraizamento e aumentou a biomassa radicular (Díaz *et al.* 2009). Em plantas de cevada o endófito *Bacillus* sp. aumentou significativamente os teores de diversos minerais como Mn, Zn e Cu (Canbolat *et al.* 2006). Segundo Shi *et al.* (2010) o teor de clorofila e a capacidade fotossintética tiveram aumento significativo em plantas de beterraba inoculadas com *Bacillus pumilus*, *Chryseobacterium indologene* e *Acinetobacter johnsonii*, quando comparadas às plantas controle, com consequente aumento da produção de carboidratos.

Fixação Biológica de Nitrogênio

As plantas absorvem nitrogênio presente na atmosfera na forma de amônia e nitrato, porém tal absorção é ínfima, sendo necessária a suplementação com fertilizantes, o que nas condições tropicais representa elevados gastos, devido às chuvas que provocam a lixiviação desse nitrogênio, restando à fixação biológica do nitrogênio uma alternativa economicamente viável, vantajosa e menos impactante (Govindarajan *et al.* 2007). Dentre as alternativas para fixação biológica do nitrogênio encontra-se a exploração de microrganismos endofíticos, que, segundo Balachandar *et al.* (2006), ao colonizarem raízes, caules e folhas das plantas, sofrem menos competição do que as bactérias presentes no solo e possivelmente excretam parte do nitrogênio por eles fixados diretamente na planta.

Vários endofíticos que fixam nitrogênio em plantas já foram relatados, podendo-se citar os do gênero *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Methylobacterium* (Donato

et al. 2005, Balachandar *et al.* 2006, Govindarajan *et al.* 2007). *Burkholderia vietnamiensis* foi uma das primeiras espécies deste gênero relatada como fixadora de nitrogênio. Outros estudos, porém, sugerem que muitas espécies de *Burkholderia* desempenhem tal função, como a *Burkholderia baldani* que coloniza os tecidos de cana-de-açúcar, batata-doce e arroz, e *Burkholderia unamae* que coloniza os tecidos da planta de milho (Govindarajan *et al.* 2006).

Solubilização de Fósforo

Depois do nitrogênio, o fósforo é o nutriente que mais limita a planta e sua deficiência restringe o rendimento da produção. Os solos tropicais e subtropicais são predominantemente ácidos e normalmente deficientes em fósforo (Khan *et al.* 2007). Organismos com habilidade de solubilizar fosfato representam uma alternativa economicamente viável, pois o sistema microbiano é capaz de disponibilizar grandes quantidades de nutrientes de reservas naturais e enriquecer o solo com os nutrientes mais importantes e escassos (Khan *et al.* 2007, Dias *et al.* 2009).

Assim como os microrganismos de solo, muitos endófitos são conhecidos por promoverem o crescimento da planta através da conversão do fósforo insolúvel nas formas solúveis (Dias *et al.* 2009). *Bacillus pumilus* e *Acinetobacter calcoaceticus* são bactérias, conhecidas, endofíticas que auxiliam a planta hospedeira de diferentes formas, sendo uma delas a oferta de fósforo solúvel através de sua solubilização (Kang *et al.* 2009, Pérez-García *et al.* 2011). O principal mecanismo envolvido na solubilização de fósforo é a produção e liberação de ácidos pelas bactérias, sendo os ácidos láctico, itacônico, isovalérico, isobutírico e acético, os mais descritos na literatura (Vazquez *et al.* 2000, Dias *et al.* 2009).

Fitorremediação

Existem muitos agentes biológicos que remediam as contaminações no ambiente. A fitorremediação utiliza as plantas para controlar as contaminações por substâncias tóxicas, sendo um método menos oneroso e mais correto ecologicamente (Newman & Reynolds 2005, Zhang *et al.* 2011). Sob o ponto de vista da fitorremediação, nos últimos anos, tem havido grande interesse em comunidades endofíticas, principalmente microrganismos que ocupam a parte aérea interagindo com as raízes e com o solo (Mengoni *et al.* 2009, Li *et al.* 2011). Muitos estudos revelam que as folhas abrigam uma flora bacteriana complexa capaz de melhorar a fitorremediação pelas plantas, ou de tornar a planta tolerante ao estresse causado pelos metais (Newman & Reynolds 2005, Ma *et al.* 2011).

Muitas plantas hiperacumuladoras de metal apresentam a capacidade fisiológica anormal de transferência dos metais pesados do solo para os tecidos da folha, que são armazenados nos vacúolos das células, tornando-

-se um ambiente muito mais tóxico do que o solo, o que pode contribuir para especificidade da comunidade endofítica em tolerar altas taxas desses metais (Idris *et al.* 2006, Mengoni *et al.* 2009). Recentemente, os benefícios da combinação de endófitos resistentes a metal pesado com plantas têm se mostrado promissores, pois alguns endófitos mantêm sua capacidade em promover o crescimento e desenvolvimento da planta mesmo sob condições adversas de toxicidade (Rajkumar *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2011).

Diversas espécies de microrganismos endofíticos foram descritas em associação com plantas hiperacumuladoras de metal, dentre elas pode-se citar as do gênero *Methylobacterium* tolerantes aos metais Ni, Cd, Co, Zn e Cr (Idris *et al.* 2006, Mengoni *et al.* 2009), as dos gêneros *Bacillus*, *Acinetobacter* e *Pantoea* tolerantes a Cu (Sun *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2011) e espécies de fungos septados como o *Exophiala pisciphila* tolerante a Pb, Zn e Cd (Li *et al.* 2011). Dessa forma, fica claro que a identificação de microrganismos especificamente associados com espécies vegetais, pode ajudar a promover a utilização mais eficiente das plantas nas práticas de fitorremediação, através do aproveitamento da sua flora bacteriana (Mengoni *et al.* 2009).

Produção de Compostos Bioativos de Interesse Farmacológico

Calcula-se que pode haver cerca de 1 milhão de espécies endofíticas diferentes, porém, somente poucas foram estudadas até o momento, o que representa uma grande oportunidade para encontrar novos produtos naturais sintetizados por eles de interesse farmacológico (Guo *et al.* 2008, Kour *et al.* 2008, Qin *et al.* 2011). Os microrganismos endofíticos são fontes relativamente espontâneas e potenciais de produtos naturais modernos para exploração na medicina, agricultura e indústria, por se tratarem de sintetizadores químicos dentro da planta (Lin *et al.* 2007, Guo *et al.* 2008). Muitos deles são capazes de sintetizar compostos bioativos que podem ser usados pelas plantas para defesa contra patógenos e algumas destas combinações se mostram de grande utilidade para a descoberta de drogas modernas. Centenas de compostos naturais como alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróides, antibióticos e antitumorais produzidos por endófitos foram relatados (Guo *et al.* 2008, Kour *et al.* 2008, Qiu *et al.* 2010, Aly *et al.* 2011).

Por muitos anos a prospecção de fármacos esteve voltada para plantas e microrganismos do ar e do solo, porém, a frequência em encontrar microrganismos que produzam tais compostos nesses ambientes tem decrescido, havendo a necessidade de se explorar novos habitats como o interior de plantas superiores com o objetivo de encontrar endófitos que possam produzir compostos bioativos (Qin *et al.* 2011).

Um exemplo disso foi a descoberta do taxol, um diterpenóide considerado uma droga anticancerígena potente. Contudo, com a provisão limitada pela explora-

ção destrutiva da árvore usada como a fonte principal desse composto e com a prospecção do interior dessa planta, foi possível encontrar o endófito *Taxomyces andreanae*, também produtor de taxol (Gangadevi & Muthumary 2008, Guo *et al.* 2008). Assim, ao se produzir certas drogas, utilizando microrganismos endofíticos, muitos problemas podem ser evitados, como o lento crescimento das plantas que também produzem esses compostos, ou até mesmo o impacto ambiental causado pela extração desses compostos na planta (Lin *et al.* 2007).

A produção por microrganismos endofíticos de uma molécula bioativa, que era somente encontrada em determinadas espécies vegetais, comprova a teoria de que durante a colonização da planta hospedeira esses microrganismos se adaptam ao microambiente vegetal e assimilam parte do DNA da planta em seu genoma, constituindo um processo de co-evolução, no qual os endófitos adquirem de seus hospedeiros a capacidade de biossíntese de compostos bioativos (Kour *et al.* 2008). Outras teorias assumem que o inverso também é verdadeiro, de modo que parte do DNA microbiano, durante um processo de co-evolução, foi assimilado pelo genoma da planta, e o que era uma exclusividade do endófito passa a ser do seu hospedeiro também (Pileggi 2006).

CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

O cultivo de plantas *in vitro* ou cultura de tecidos vegetais pode ser definido como o cultivo, em ambiente artificial sob condições assépticas e controladas, de células vegetais isoladas, ou tecidos ou órgãos, que podem dar origem a plantas inteiras, diretamente do explante ou indiretamente através de calos (Xiao *et al.* 2011). Trata-se de uma área da biotecnologia que compreende vários métodos de propagação vegetal em laboratório, amplamente utilizada como ferramenta para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial (Lakshmanan *et al.* 2005).

Além dos aspectos do melhoramento genético de plantas, a cultura de tecidos vem sendo aplicada, de maneira mais prática e com maior impacto, na propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação, que tem como principal objetivo a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa (Donato *et al.* 2005, Lima & Moraes 2006, Xiao *et al.* 2011). A micropropagação se tornou a saída para o cultivo de muitas plantas que possuem limitações na propagação sexuada, além da alta taxa de multiplicação e qualidade em comparação aos métodos tradicionais (Lima & Moraes 2006, Nietzsche *et al.* 2006).

As principais vantagens das plantas propagadas *in vitro* (microplantas) são: a rapidez com que se obtém um grande número de mudas em instalações reduzidas e a obtenção de plantas livres de doenças e pragas, o que reduz a dispersão de organismos fitoparasitas (Alvares

& Caldas 2002, Barrow *et al.* 2004, Lima & Moraes 2006). Plantas micropropagadas, quando comparadas às plantas oriundas de propagação convencional, geralmente sobrevivem mais no campo, crescem mais rapidamente nos primeiros estádios de desenvolvimento, possuem maior precocidade, florescendo até quatro meses antes, além de apresentarem uniformidade de produção, proporcionando colheitas superiores (Alvares & Caldas 2002).

Embora existam protocolos variados de cultura de tecidos, faz-se necessário avaliar a qualidade do sistema comercial de micropropagação, uma vez que esta é influenciada por diversos fatores como taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma, coloração e tamanho das folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimatização (Lima & Moraes 2006, Xiao *et al.* 2011). Por essa razão, há um grande requerimento de cuidados que vão desde o estabelecimento destas plantas *in vitro* até a manutenção destas, durante os meses de desenvolvimento (Nishimura *et al.* 2002). Dessa forma, o aprimoramento constante dos processos de multiplicação e o controle de qualidade das mudas, aliado à redução de custos, têm sido essenciais para aceitação dessa técnica no mercado (Nietsche *et al.* 2006, Díaz *et al.* 2009).

Plantas Axênicas

A contaminação microbiana é o principal fator que impede a aplicação da cultura de tecidos, havendo uma tendência geral em atribuir essa contaminação às próprias matrizes que não foram submetidas a uma desinfestação eficaz da superfície do explante no processo de iniciação da cultura, ou do manuseio em laboratório, utilizando práticas estéreis ineficientes durante a manipulação (Thomas & Prakash 2004, Thomas *et al.* 2006, Panicker *et al.* 2007, Thomas *et al.* 2008, Thomas & Soly 2009, Thomas & Kumari 2010). As contaminações bacterianas são mais drásticas e trazem duas consequências básicas: a primeira é a perda de tempo e de recursos financeiros ou genéticos pela eliminação de frascos contaminados, e a segunda é o risco de contaminação de outras plantas (Thomas & Prakash 2004, Thomas *et al.* 2006).

Dessa forma, o termo plantas axênicas tem sido difundido como um dos principais objetivos da técnica de micropropagação, pois indica que a planta está livre de todo e qualquer microrganismo (Panicker *et al.* 2007). Por essa razão, durante muito tempo, a presença desses microrganismos no cultivo *in vitro* foi considerada sinônimo de contaminação prejudicial. Entretanto, muitos estudos revelam que esporadicamente, após um período de estresse mecânico, físico ou nutricional, observa-se o crescimento de pequenas colônias de microrganismos no meio de cultura ou sobre as microplantas, até então assintomáticas e axênicas (Thomas & Prakash 2004, Almeida *et al.* 2005, Thomas *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2008). Tais estudos sugerem que esses microrganismos

sejam endofíticos, uma vez que sua presença nas microplantas não necessariamente afeta negativamente seu desenvolvimento, inferindo-se inclusive, tratar-se de uma associação benéfica (Almeida *et al.* 2005, Pirttilä *et al.* 2008, Almeida *et al.* 2009, Dias *et al.* 2009, Abreu-Tarazi *et al.* 2010).

Para combater as contaminações, ocasionalmente, são utilizados antibióticos e fungicidas, podendo ser adicionados ao meio de cultura ou submetendo os explantes a banhos sob agitação, durante alguns dias. Entretanto, a prática de desinfestação utiliza compostos que certamente reduzem a capacidade de resposta morfogênica dos explantes, exigindo dessa forma, a utilização de biorreguladores mais fortes para alcançar o objetivo de propagação, o que pode acarretar em sérios efeitos colaterais, como a variação somaclonal. Além disso, o uso de certos antibióticos tem sido limitado devido à toxicidade para as plantas (Donato *et al.* 2005, Londe *et al.* 2007) e devido à possibilidade de eliminar também microrganismos identificados como não patogênicos que beneficiam a cultura (Barrow *et al.* 2004, Weber *et al.* 2004, Dias *et al.* 2009).

Importância dos Endófitos na Cultura de Tecidos

A interação entre plantas e microrganismos pode estimular o crescimento vegetal, seja por competição com patógenos ou por indução de efeitos de outros microrganismos úteis, ocasionando benefício às plantas (Londe *et al.* 2007). Por essa razão, são muito importantes os estudos com uma abordagem positiva da presença de endófitos naturais no cultivo *in vitro*. Isto, porque, vários estudos evidenciaram a onipresença de endófitos em várias espécies cultivadas *in vitro*, sem lhes causar danos, dentre elas a uva, mamão, melão, banana, abacaxi, orquídea, pupunha, manjerição, mogno, eucalipto, pinheiro, sequóia, violeta, cúrcuma, cana-de-açúcar, teca, morango, entre outros (Almeida *et al.* 2005, Thomas *et al.* 2008, Almeida *et al.* 2009, Dias *et al.* 2009, Abreu-Tarazi *et al.* 2010, Esposito-Polesi 2010).

Segundo Thomas *et al.* (2007), uma exigência universal primária para o trabalho de cultura de tecidos é assepsia, mas as observações sugerem que é praticamente impossível adquirir culturas assépticas com esterilização normal da superfície, o que incita a possibilidade da cultura de tecidos não axênicos como uma opção futura. Vários estudos já demonstraram a grande diversidade de aspectos benéficos dos microrganismos endofíticos às plantas hospedeiras (Weber *et al.* 2004, Akello *et al.* 2007). Sendo assim, a presença de tais microrganismos pode não representar problemas reais à cultura, e ainda constituir um ganho ao mantê-los na planta, pois, além de não apresentarem características patogênicas, também se configuram como vetores genéticos, agentes de controle biológico e fonte de metabólitos secundários, dentre outros (Almeida *et al.* 2005, Donato *et al.* 2005, Londe *et al.* 2007).

Ao contrário do que se acreditava, os microrganismos endofíticos tem despontado como importantes aliados

no processo de micropropagação. Segundo Pirttilä *et al.* (2008), o genótipo da planta e a composição de espécies endofíticas, aliados às condições de cultivo *in vitro*, representam um fator chave para a obtenção de culturas com alta capacidade de regeneração. Muitos estudos sugerem que os endófitos auxiliam a microplanta no ajuste osmótico, no desenvolvimento, pela produção de fitormônios, absorção de nutrientes e proteção contra ação de patógenos, além de favorecer o crescimento e sobrevivência das microplantas na fase de aclimatização e na rapidez da produção de biomassa (Almeida *et al.* 2005, Almeida *et al.* 2009, Dias *et al.* 2009, Abreu-Tarazi *et al.* 2010).

Espécies endofíticas do gênero *Methylobacterium* são relatadas na literatura como benéficas na cultura de tecidos vegetais, por promoverem a embriogênese e organogênese, além de induzirem a formação de calos e brotações em *Triticum aestivum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, e *Linum usitatissimum*, e permitir o desenvolvimento das plantas regeneradas, pela biossíntese de compostos e fitormônios como auxinas e citocininas (Trotsenko *et al.* 2001, Pirttilä *et al.* 2008). Muitos endófitos podem ser benéficos na tolerância ao estresse causado durante as subculturas (Lata *et al.* 2006). Algumas actinobactérias produzem auxinas que podem aumentar a capacidade de germinação e o crescimento da microplanta (Merzaeva & Shirokikh 2010, Qin *et al.* 2011). No caso específico de microplantas de *Pinus sylvestris*, sabe-se que alguns endófitos podem minimizar o escurecimento dos calos, através da formação de biofilmes que protegem contra as reações de oxidação e escurecimento, além da produção de compostos que afetam a morfologia e aumentam a viabilidade dos explantes (Pirttilä *et al.* 2002, Pirttilä *et al.* 2004, Pirttilä *et al.* 2008).

Além dos microrganismos endofíticos que naturalmente colonizam os tecidos vegetais, outra alternativa para melhorar a produção das microplantas, encontra-se na utilização de endófitos selecionados e inoculados de maneira asséptica nas espécies, de modo a favorecer ou potencializar o desenvolvimento e regeneração destas *in vitro* (Senthilkumar *et al.* 2008), ou ainda favorecer o controle de patógenos (Ardanov *et al.* 2011). O cultivo *in vitro* pode auxiliar na interação de microrganismos endofíticos e sementes de diversas espécies de orquídea, permitindo a germinação dessas sementes em condições controladas, sem competição com outros microrganismos de solo, com maior grau de especificidade, além de contribuir para melhor avaliar as interações entre o endófito e a planta hospedeira (Stewart & Kane 2007, Steinfort *et al.* 2010).

Segundo Barrow *et al.* (2004), a micropropagação é uma valiosa ferramenta na identificação de microrganismos endofíticos, para estudar suas relações e interações com a planta hospedeira em níveis genético, celular e fisiológico. Cabe destacar, ainda, que a cultura de tecidos pode auxiliar no isolamento de endofíticos associados de forma específica a diferentes órgãos da planta, no

entendimento das relações existentes entre o endófito e seu hospedeiro, bem como explorar a diversidade endofítica (Thomas *et al.* 2008, Thomas & Kumari 2010).

CONCLUSÃO

Com base no que foi exposto é possível verificar os inúmeros benefícios atribuídos às plantas por abrigarem em seu interior os microrganismos endofíticos tanto no cultivo *in vivo* quanto no cultivo *in vitro*, quebrando o paradigma da existência de plantas “axênicas”, além de levantar um aspecto importante a ser considerado na cultura de tecidos, de que a assepsia é importante, porém, é impossível obter culturas assépticas, e que muito provavelmente, a partir de agora, os produtores e biofábricas terão de considerar não somente atribuições genéticas, mas, também, a comunidade endofítica presente, que pode atribuir características de interesse às plantas. Cabe salientar, ainda, a necessidade de estudos mais aprofundados e com uma percepção mais positiva da presença desses endófitos na cultura de tecidos, bem como o uso cada vez maior dessa técnica no estudo e exploração da comunidade endofítica onipresente nas diferentes espécies de plantas.

REFERÊNCIAS

- ABREU-TARAZI, M.F., NAVARRETE, A.A., ANDREOTE, F.D., ALMEIDA, C.V., TSAI, S.M. & ALMEIDA, M. 2010. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World J Microbiol Biotechnol*, 26: 555-560.
- ADAMS, A.S., SIX, D.L., ADAMS, S.M. & HOLBEN, W.E. 2008. *In vitro* interactions between yeasts and bacteria and the fungal symbionts of the mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*). *Microbial Ecology*, 56: 460-466.
- AKELLO, J., DUBOIS, T., GOLD, C.S., COYNE, D., NAKAVUMA, J. & PAPARU, P. 2007. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 96: 34-42.
- AKHTAR, M.S. & SIDDIQUI, Z.A. 2008. *Glomus intraradices*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J Gen Plant Pathol*, 74:53-60.
- ALMEIDA, C.V., YARA, R. & ALMEIDA, M. 2005. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 467-470.
- ALMEIDA, C.V., ANDREOTE, F.D., YARA, R., TANAKA, F.A.O., AZEVEDO, J.L. & ALMEIDA, M. 2009. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 1757-1764.
- ALVARES, M.C. & CALDAS, L.S. 2002. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 415-420.
- ALY, A.H., DEBBAB, A., CLEMENTS, C., EDRADA-EBEL, R., ORLIKOVA, B., DIEDERICH, M., WRAY, V., LIN, W. & PROKSCH, P. 2011. NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19: 414-421.
- ANDREOTE, F.D., ROCHA, U.N., ARAÚJO, W.L., AZEVEDO, J.L. & OVERBEEK, L.S. van. 2010. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek*, 97: 389-399.

- ARAVIND, R., EAPEN, S.J., KUMAR, A., DINU, A. & RAMANA, K.V. 2010. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Crop Protection*, 29: 318-324.
- ARDANOV, P., OVCHARENKO, L., ZAETS, I., KOZYROVSKA, N. & PIRTILÄ, A.M. 2011. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biological Control*, 56: 43-49.
- BALACHANDAR, D., SANDHIYA, G.S., SUGITHA, T.C.K. & KUMAR, K. 2006. Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *World J Microbiol Biotechnol*, 22: 707-712.
- BALDOTTO, L.E.B., BALDOTTO, M.A., CANELLAS, L.P., BRESAN-SMITH, R. & OLIVARES, F.L. 2010. Growth promotion of pineapple 'vitória' by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization. *R. Bras. Ci. Solo*, 34: 1593-1600.
- BANDARA, W.M.M.S., SENEVIRATNE, G. & KULASOORIYA, S.A. 2006. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *J. Biosci.*, 31: 645-650.
- BARROW, J.R., OSUNA-AVILA, P. & REYES-VERA, I. 2004. Fungal endophytes intrinsically associated with micropropagated plants regenerated from native *Bouteloua eriopoda* torr. and *Atriplex canescens* (pursh) nutt. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant*, 40: 608-612.
- CANBOLAT, M.Y., BILEN, S., ÇAKMAKÇI, R., ŞAHİN, F. & AYDIN, A. 2006. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol Fertil Soils*, 42: 350-357.
- CHOUDHARY, D.K. & JOHRI, B.N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance. *Microbiological Research*, 164: 493-513.
- COMPANT, S., CLÉMENT, C. & SESSITSCH, A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 669-678.
- DANTAS, S.A.F., OLIVEIRA, S.M.A. & CÂMARA, T.R. 2002. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 10: 391-403.
- DAVITT, A. J., CHEN, C. & RUDGERS, J. A. 2011. Understanding context-dependency in plant-microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 137-145.
- DIAS, A.C.F., COSTA, F.E.C., ANDREOTE, F.D., LACAVAL, P.T., TEIXEIRA, M.A., ASSUMPÇÃO, L.C., ARAÚJO, W.L., AZEVEDO, J.L. & MELO, I.S. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 189-195.
- DÍAZ, K., VALIENTE, C., MARTÍNEZ, M., CASTILLO, M. & SANFUEENTES, E. 2009. Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 867-873.
- DONATO, V.M.T.S., ANDRADE, A.G., TAKAKI, G.M.C., MARIANO, R.L.R. & MACIEL, G.A. 2005. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. *Ciência e Agrotecnologia*, 29: 134-141.
- ELBELTAGY, A., NISHIOKA, K., SATO, T., SUZUKI, H., YE, B., HAMADA, T., ISAWA, T., MITSUI, H. & MINAMISAWA, K. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5285-5293.
- ESPOSITO-POLESI, N.P. 2010. *Investigação da microbiota endofítica onipresente em micróplatas "axênicas"*. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, ESALQ-USP, Piracicaba SP. 2010.
- FIGUEIREDO, M.V.B., MARTINEZ, C.R., BURITY, H.A. & CHANWAY, C.P. 2008. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 1187-1193.
- FORCHETTI, G., MASCIARELLI, O., ALEMANO, S., ALVAREZ, D. & ABDALA G. 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76: 1145-1152.
- FRANKE-WHITTLE, I.H., O'SHEA, M.G., LEONARD, G.J., WEBB, R. & SLY, L.I. 2005. Investigation into the ability of *Gluconacetobacter sacchari* to live as an endophyte in sugarcane. *Plant and Soil*, 271: 285-295.
- GANGADEVI, V. & MUTHUMARY, J. 2008. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 717-724.
- GOVINDARAJAN, M., BALANDREAU, J., MUTHUKUMARASAMY, R., REVATHI, G. & LAKSHMINARASIMHAN, C. 2006. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant Soil*, 280: 239-252.
- GOVINDARAJAN, M., KWON, S.W. & WEON, H.Y. 2007. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World J Microbiol Biotechnol*, 23: 997-1006.
- GUNDEL, P.E., GARIBALDI, L.A., MARTÍNEZ-GHERSA, M.A. & GHERSA, C.M. 2011. *Neotyphodium* endophyte transmission to *Lolium multiflorum* seeds depends on the host plant fitness. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 359-366.
- GUO, B., WANG, Y., SUN, X. & TANG, K. 2008. Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 136-142.
- HARDOIM, P.R., OVERBEEK, L.S. van & ELSAS, J.D. van. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16: 463-471.
- IDRIS, R., KUFFNER, M., BODROSSY, L., PUSCHENREITER, M., MONCHY, S., WENZEL, W.W. & SESSITSCH, A. 2006. Characterization of Ni-tolerant methyllobacteria associated with the hyperaccumulating plant *Thlaspi goesingense* and description of *Methyllobacterium goesingense* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 634-644.
- KANG, S.M., JOO, G.J., HAMAYUN, M., NA, C.I., SHIN, D.H., KIM, H.Y., HONG, J.K. & LEE, I.J. 2009. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology Letters*, 31: 277-281.
- KHAN, M.S., ZAIDI, A. & WANI, P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. *Agron. Sustain. Dev.*, 27: 29-43.
- KOUR, A., SHAWL, A.S., REHMAN, S., SULTAN, P., QAZI, P. H., SUDEN, P., KHAJURIA, R.K. & VERMA, V. 2008. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 1115-1121.
- LAKSHMANAN, P., GEJSKES, R.J., AITKEN, K.S., GROF, C.P.L., BONNETT, G.D. & SMITH, G.R. 2005. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant*, 41: 345-363.
- LATA, H., LI, X.C., SILVA, B., MORAES, R.M. & HALDA-ALIJA, L. 2006. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated Echinacea plants using 16S rRNA sequencing. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 85: 353-359.
- LI, T., LIU, M.J., ZHANG, X.T., ZHANG, H.B., SHA, T. & ZHAO, Z.W. 2011. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment*, 409: 1069-1074.
- LIMA, J.D. & MORAES, W.S. 2006. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 36: 13-19.
- LIN, X., LU, C., HUANG, Y., ZHENG, Z., SU, W. & SHEN, Y. 2007. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Campithecium acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World J Microbiol Biotechnol*, 23: 1037-1040.

- LONDE, L.N., SOUSA, C.S., VIEIRA, C.U., BONETTI, A.M. & KERR, W.E. 2007. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). *Biosci. J.*, 23: 94-100.
- MA, Y., PRASAD, M.N.V., RAJKUMAR, M. & FREITAS, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phyto-remediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 29: 248-258.
- MEJÍA, L.C., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., BAEL, S. van, ARNOLD, A.E., HEBBAR, P., SAMUELS, G.J., ROBBINS, N. & HERRE, E.A. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46: 4-14.
- MELNICK, R.L., ZIDACK, N.K., BAILEY, B.A., MAXIMOVA, S.N., GUILTINAN, M. & BACKMAN, P.A. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*, 46: 46-56.
- MELNICK, R.L., SUÁREZ, C., BAILEY, B.A. & BACKMAN, P.A. 2011. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57: 236-245.
- MENDOZA, A.R. & SIKORA, R.A. 2009. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *BioControl*, 54: 263-272.
- MENGGONI, A., PINI, F., HUANG, L.N., SHU, W.S. & BAZZICALUPO, M. 2009. Plant-by-plant variations of bacterial communities associated with leaves of the nickel hyperaccumulator *Alyssum bertolonii* Desv. *Microb Ecol*, 58: 660-667.
- MERZAEVA, O.V. & SHIROKIKH, I.G. 2010. The production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. *Appl Biochem Microbiol*, 46: 44-50.
- NEWMAN, L. & REYNOLDS, C. 2005. Bacteria and phyto-remediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends Biotechnol*, 23: 6-8.
- NIETSCHKE, S., MARQUES, S.V., PEREIRA, M.C.T., SALLES, B., XAVIER, A.A., FRANÇA, A.C., LIMA, C. & SILVA, L.S. 2006. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. *Ciência Rural*, 36: 989-991.
- NISHIMURA, T., MEGURO, A., HASEGAWA, S., NAKAGAWA, Y., SHIMIZU, M. & KUNOH, H. 2002. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from Mountain Laurel and its antifungal activity. *J. Gen. Plant Pathol*, 68: 390-397.
- PANICKER, B., THOMAS, P., JANAKIRAM, T., VENUGOPALAN, R. & NARAYANAPPA, S.B. 2007. Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum "Arka Swarna" and activation of endophytic bacteria. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant*, 43: 614-622.
- PÉREZ-GARCÍA, A., ROMERO, D. & VICENTE, A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 187-193.
- PICCOLO, S.L., FERRARO, V., ALFONZO, A., SETTANNI, L., ERCOLINI, D., BURRUANO, S. & MOSCHETTI, G. 2010. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Ann Microbiol*, 60: 161-167.
- PILEGGI, S.A.V. 2006. *Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico*. 125f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- PIRTTILÄ, A.M., LAUKKANEN, H. & HOHTOLA, A. 2002. Chitinase production in pine callus (*Pinus sylvestris* L.): a defense reaction against endophytes? *Planta*, 214: 848-852.
- PIRTTILÄ, A.M., JOENSUU, P., POSPIECH, H., JALONEN, J. & HOHTOLA, A. 2004. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiol Plant*, 121: 305-312.
- PIRTTILÄ, A.M., PODOLICH, O., KOSKIMÄKI, J.J., HOHTOLA, E. & HOHTOLA, A. 2008. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 95: 47-55.
- QIN, S., XING, K., JIANG, J.H., XU, L.H. & LI, W.J. 2011. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89: 457-473.
- QIU, M., XIE, R.S., SHI, Y., ZHANG, H. & CHEN, H.M. 2010. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Ann Microbiol*, 60: 143-150.
- RAJKUMAR, M., AE, N. & FREITAS, H. 2009. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 77: 153-160.
- ROHLFS, M. & CHURCHILL, A.C.L. 2011. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 23-34.
- SAIKKONEN, K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*, 21: 67-74.
- SENTHILKUMAR, M., MADHAIYAN, M., SUNDARAM, S.P., SANGEETHA, H. & KANNAIYAN, S. 2008. Induction of endophytic colonization in rice (*Oryza sativa* L.) tissue culture plants by *Azorhizobium caulinodans*. *Biotechnology Letters*, 30: 1477-1487.
- SHI, Y., LOU, K. & LI, C. 2010. Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. *Photosynth Res*, 105: 5-13.
- SINGH, N., PANDEY, P., DUBEY, R.C. & MAHESHWARI, D.K. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 1669-1679.
- STEINFORT, U., VERDUGO, G., BESOAIN, X. & CISTERNAS, M.A. 2010. Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnst(Orchidaceae). *Flora*, 205: 811-817.
- STEWART, S.L. & KANE, M.E. 2007. Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant*, 43: 178-186.
- SUN, L., QIU, F., ZHANG, X., DAI, X., DONG, X. & SONG, W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 55: 415-424.
- SUN, L.N., ZHANG, Y.F., HE, L.Y., CHEN, Z.J., WANG, Q.Y., QIAN, M. & SHENG, X.F. 2010. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, 101: 501-509.
- TAN, H.M., CAO, L.X., HE, Z.F., SU, G.J., LIN, B. & ZHOU, S.N. 2006. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum in vitro*. *World J Microbiol Biotechnol*, 22: 1275-1280.
- THOMAS, P. & PRAKASH, G.S. 2004. Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years *in vitro*. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant*, 40: 603-607.
- THOMAS, P., PRABHAKARA, B.S. & PITCHAIMUTHU, M. 2006. Cleansing the long-term micropropagated triploid watermelon cultures from covert bacteria and field testing the plants for clonal fidelity and fertility during the 7-10 year period *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 85: 317-329.
- THOMAS, P., KUMARI, S., SWARNA, G.K., PRAKASH, D.P. & DINESH, M.R. 2007. Ubiquitous presence of fastidious endophytic bacteria in field shoots and index-negative apparently clean shoot-tip cultures of papaya. *Plant Cell Reports*, 26: 1491-1499.
- THOMAS, P., SWARNA, G.K., ROY, P.K. & PATIL, P. 2008. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria

- isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 93: 55-63.
- THOMAS, P. & SOLY, T. 2009. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host. *Microbial Ecology*, 58: 952-964.
- THOMAS, P. & KUMARI, S. 2010. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. *Scientia Horticulturae*, 124: 469-474.
- TING, A.S.Y., MEON, S., KADIR, J., RADU, S. & SINGH, G. 2008. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *BioControl*, 53: 541-553.
- TROTEL-AZIZ, P., COUDERCHET, M., BIAGIANTI, S. & AZIZ, A. 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*, 64: 21-32.
- TROTSSENKO, Y.A., IVANOVA, E.G. & DORONINA, N.V. 2001. Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. *Microbiology*, 70: 623-632.
- VAZQUEZ, P., HOLGUIN, G., PUENTE, M., LOPEZ, E., CORTES, A. & BASHAN, Y. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils*, 30: 460-468.
- WEBER, O.B., TERAQ, D., ROCHA, L.S., CORREIA, D. & SANTOS, F.J.S. 2004. Efeito de bactérias diazotróficas na produção do abacaxizeiro 'Cayenne Champac', sob irrigação, em dois níveis de adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26: 249-253.
- XIAO, Y., NIU, G. & KOZAI, T. 2011. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 105: 149-158.
- YONEZAWA, M., USUKI, F., NARISAWA, K., TAKAHASHI, J. & HASHIBA, T. 2004. Anatomical study on the interaction between the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospira* and *Chinese cabbage*. *Mycoscience*, 45: 367-371.
- YU, X., AI, C., XIN, L. & ZHOU, G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium wilt* and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47: 138-145.
- ZHANG, Y.F., HE, L.Y., CHEN, Z.J., WANG, Q.Y., QIAN, M. & SHENG, X.F. 2011. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere*, 83: 57-62.
- ZHAO, Z., WANG, Q., WANG, K., BRIAN, K., LIU, C. & GU, Y. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*, 101: 292-297.
- ZHENG, Y., XUE, Q.Y., XU, L.L., XU, Q., LU, S., GU, C. & GUO, J.H. 2011. A screening strategy of fungal biocontrol agents towards *Verticillium wilt* of cotton. *Biological Control*, 56: 209-216.