



Efeito da transgenia na colonização de cana-de-açúcar por bactéria endofítica *Pantoea agglomerans*

Marià Carolina Quecine – Andressa Peres Bini –

Priscilla de Barros Rossetto – Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade São Paulo (ESALQ/USP)

Wellington Luiz de Araújo

*Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia,
Universidade São Paulo (USP)*

Resumo

O Brasil vem discutindo a utilização de organismos geneticamente modificados (OGMs), para o aumento da eficiência da produção agrícola. Para que ocorra a liberação comercial destes organismos, os riscos ao ambiente, saúde humana e animal devem ser avaliados. Neste contexto, diversos aspectos têm sido questionados sobre a introdução de sequências procarióticas e/ou eucarióticas em plantas e a utilização de microrganismos transgênicos na agricultura. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram avaliar o efeito de transgenia em cana-de-açúcar durante a colonização da mesma por uma bactéria endofítica e em um segundo experimento, determinar o efeito da transgenia bacteriana na infecção e colonização em cana-de-açúcar convencional. Nos dois experimentos foi utilizada a bactéria endofítica *Pantoea agglomerans* (33.1) transformada com o plasmídeo pNKBOR e/ou pNKGFP.

Introdução

A transferência de genes de interesse econômico com o objetivo de aumentar o valor nutricional ou tornar a planta resistente a herbicidas e pragas permitiu o desenvolvimento de inúmeras plantas geneticamente modificadas (PGMs). Visando estas melhorias, esses genes podem também ser inseridos em microrganismos que vivem em simbiose com a cultura de interesse, ou seja, microrganismos endofíticos, conferindo desta maneira a estas plantas as características desejadas. Entretanto, poucos estudos estão sendo realizados a fim de se avaliar o efeito destes organismos geneticamente modificados (OGMs) no ambiente e a comunidade microbiana associada a eles.

Em relação às PGMs, apesar da crescente in-

ensificação do seu cultivo, estudos recentes realizados nessa área mostram que ainda não existe um consenso estabelecido a respeito dos efeitos sobre comunidades microbianas, de modo que, tanto efeitos neutros (WATRUD et al, 2006; VAURAMO et al, 2006) como negativos (CASTALDINI et al, 2005; WEI et al, 2006) vem sendo reportados em periódicos especializados. Alguns estudos têm mostrado também que os efeitos da transgenia são muito pequenos quando comparados a outras fontes de variação, como estação do ano, idade da planta e manejo cultural (HEUER et al, 2002, RASCHE et al, 2006).

Os microrganismos endófitos, descritos como microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro ou formar estruturas externas visíveis (AZEVEDO & ARAÚJO, 2004), podem ser usados no controle biológico de patógenos ou para a promoção de crescimento de plantas. Por esse motivo, são muito bem avaliadas as interações entre a comunidade endofítica endógena e sua planta hospedeira (HALLMANN et al, 1997; LODEWYCKX et al, 2002; RUBINI et al, 2005), entretanto, não há muitos estudos que avaliam o impacto que microrganismos endofíticos expressando genes heterólogos, podem causar sobre a comunidade endofítica associada.

Dentre os endófitos estudados, destaca-se a bactéria *Pantoea agglomerans* que possui potencial de indução de resistência contra diversos patógenos (LIU et al, 1995; WEI et al, 1996; ONGENA et al, 2000; JEUN et al, 2004), além de seu uso direto para controle de diversas pragas e microrganismos antagonistas (BARDIN et al, 2003; BONATERA et al, 2003, PLAZA et al, 2004; GUNASINGHE et al, 2004).

A partir destes fatos e com a eminente liberação do uso de OMGs, o presente trabalho visou o estudo do efeito da transgenia, tanto em planta quanto em microrganismos, durante o processo de colonização de cana-de-açúcar.

Materiais e Métodos **Bactérias e plasmídios utilizados**

A bactéria utilizada como modelo no monitoramento de colonização foi *Pantoea agglomerans* isolado 33.1 (PROCÓPIO, 2004), pertencente à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", Departamento de Genética, ESALQ/USP. Nas linhagens transformadas 33.1:pNKBOR e 33.1:pNKGFP foram utilizados os plasmídios pNKBOR (ROSSIGNOL et al, 2001) e pNKGFP (FERREIRA et al, 2008) respectivamente, sendo o segundo engenhado a partir do pNKBOR. Os plasmídios possuem como características integratividade, o gene de resistência a canamicina, o transposon mini-*Tn10* e apenas o vetor pNKGFP contém o gene da *gfp* (*green fluorescence protein*).

Material Vegetal

As plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) utilizadas no experimento foram cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, São Paulo. Foram utilizadas uma variedade comercial, SP80-1842, não portadora do transgene e uma geneticamente modificada, IMI-1 resistente ao herbicida Imazapir, derivada da variedade SP80-1842 que carrega o gene de resistência ao herbicida e o gene de resistência ao antibiótico ampicilina.

Colonização de cana-de-açúcar geneticamente modificada

Para avaliação da colonização da cana-de-açúcar, foi inoculada 10^9 unidade formadora de colônia (UFC) /planta, da bactéria 33.1:pNKGFP no interior de cana-de-açúcar recém geminadas, variedades SP80-1842 e IMI-1, através de seringa e agulha, a qual foi inserida na base inferior do caule. Como controle foi inoculado apenas meio de cultura. Após 15 e 30 dias foram realizados isolamentos bacterianos, para tanto, lg de raiz e folha foram desinfetados e então macerados na presença de 1 mL de tampão PBS (ARAÚJO et al, 2002). Após a obtenção da suspensão de microrganismos, foram feitas diluições em tampão PBS, e alíquotas de 100 μ L foram semeadas sobre meio tripticaseína de soja - TSB 5%, (Merck) suplementado com Benomyl, benzimidazole (50 μ g.mL⁻¹), com e sem canamicina (50 μ g/mL) e incubados a 28° C por 5 dias. As colônias isoladas marcadas

com o gene GFP foram quantificadas através da observação em luz ultravioleta.

Infecção e colonização de cana-de-açúcar por bactéria geneticamente modificada

A infecção natural de plantas micro-propagadas de cana-de-açúcar, variedade convencional SP80-1842 foi avaliada utilizando-se as bactérias 33.1, 33.1:pNKBOR e 33.1:pNKGFP, que foram cultivadas em meio LB e após atingirem a fase log, foram adicionadas, 10^5 UFC/ planta, em Meio Murashige e Skoog - MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo as plantas, e então incubadas a 28°C em estufa com fotoperíodo controlado de 16 horas de luz e avaliados. Como controle foi inoculado apenas meio de cultura. Após 5 e 14 dias foram realizados isolamentos bacterianos 33.1:pNKGFP e 33.1:pNKBOR, para tanto, a raiz das plantas micro-propagadas foram imersas em 2mL de tampão PBS e incubadas por 1 hora a 28° C para remoção das bactérias agregadas a superfície da raiz. Folha e raiz foram desinfetadas e então foram macerados na presença de 1 mL de tampão PBS (ARAÚJO et al, 2002). Após a obtenção da suspensão de microrganismos, foram feitas diluições em tampão PBS, e alíquotas de 100 μ L foram semeadas sobre meio tripticaseína de soja - TSB 5%, (Merck) suplementado com Benomyl, benzimidazole (50 μ g mL⁻¹), com canamicina (50 μ g/mL) e incubados a 28° C por 5 dias.

Análise de dados

Para a análise dos dados de re-isolamento bacteriano, o número de colônias encontradas por tratamento, foi convertido a \log_{10} (UFC + 2)/ grama de tecido. A análise estatística de todos os dados foi feita com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, considerando o delineamento experimental como sub-fatorial, amostras retiradas ao longo do tempo, com quatro repetições cada.

Resultados

Colonização de cana-de-açúcar geneticamente modificada

A colonização de cana-de-açúcar pela bactéria 33.1:pNKGFP a partir da inoculação de 10^9 UFC/planta foi suficiente, pois após 30 dias foi possível re-isolar até 10^3 bactérias expressando o gene *gfp*.

Após 15 e 30 dias de inoculação da bactéria 33.1:pNKGFP foi realizado o isolamento de bactérias resistentes a canamicina, e, então quantificadas, a partir de luz ultravioleta as bactérias que expressavam GFP. A partir da quantificação da densidade de bactérias resistentes a canami-

cina foi possível inferir sobre o efeito do endofítico transformado sobre a comunidade bacteriana da cana-de-açúcar.

No primeiro isolamento, a densidade de bactérias resistentes a canamicina nas plantas utilizadas não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, apenas quando comparado os diferentes tecidos, caule e raiz, nos quais foi observada uma densidade maior no caule (Figura 1A). Entretanto, no segundo isolamento, a densidade de bactérias resistentes a canamicina foi menor nos tratamentos convencional e transgênica. No tratamento controle no qual a densidade de bactérias resistentes foi significativamente maior (Figura 1B).

Quando observada a densidade das bactérias 33.1:pNKGFP após 15 dias, o número de bactérias presente no caule foi significativamente maior na variedade convencional (SP80-1842), em relação à variedade resistente a Imazapir (IMI-1). Entretanto na raiz não houve diferença dos tratamentos em relação ao controle (Figura 2A). O mesmo não ocorreu quando observada a densidade bacteriana após 30 dias, na qual a diferença apresentou-se entre os tratamentos e não mais entre

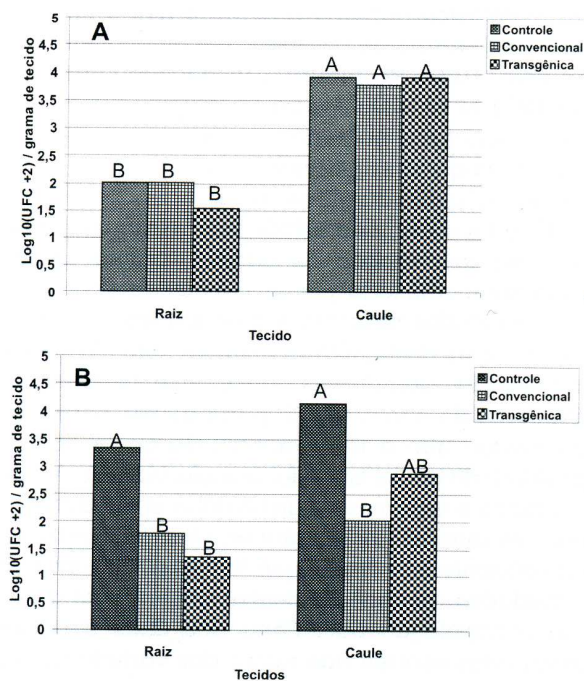


Figura 1. Densidade de bactérias resistentes a canamicina isoladas de cana transgênica e convencional. A) Isolamento após 15 dias. B) Isolamento após 30 dias. O ensaio foi realizado com 4 repetições sendo avaliado por Tukey (5%) pelo programa SAS. Os dados da densidade bacteriana foram transformadas em $\log_{10} (UFC + 2) / \text{grama de tecido}$.

os tecidos avaliados, sendo que neste momento, a quantidade de bactérias colonizando o caule e raiz de plantas transgênicas é significativamente maior do que as presentes nas plantas convencionais (Figura 2B).

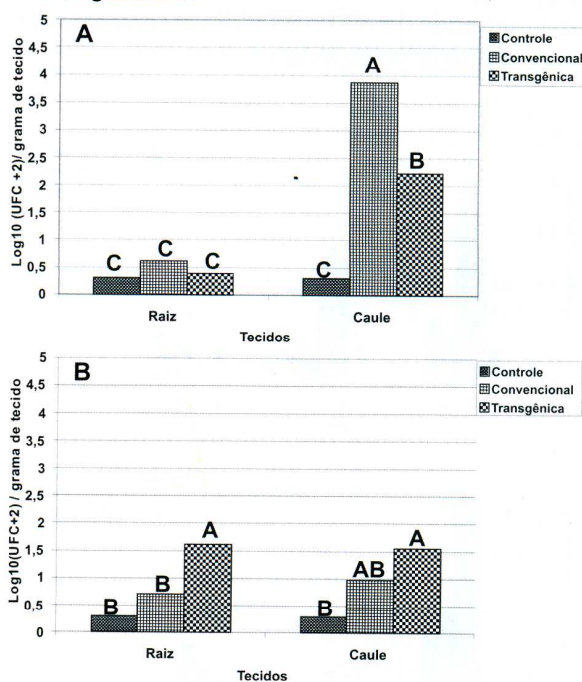


Figura 2. Densidade de bactérias 33.1:pNKGFP em cana transgênica e convencional. A) Isolamento após 15 dias. B) Isolamento após 30 dias. O ensaio foi realizado com 4 repetições sendo avaliado por Tukey (5%) pelo programa SAS. Os dados da densidade bacteriana foram transformadas em $\log_{10} (UFC + 2) / \text{grama de tecido}$.

Re-isolamento das plantas micro-propagadas

Os resultados obtidos demonstraram que no primeiro isolamento, 4 dias após a inoculação, houve uma diferença significativamente superior na eficiência de colonização de rizosfera e raiz das plantas de cana-de-açúcar pela bactéria 33.1:pNKGFP em relação a bactéria 33.1:pNKBOR (Figura 3A). Entretanto, no segundo isolamento, a diferença estatística é observada apenas na colonização da rizosfera, sendo que, não houve diferença estatística no padrão de colonização da raiz e do caule das plantas de cana-de-açúcar pelas bactérias 33.1:pNKGFP e 33.1:pNKBOR (Figura 3B). No caule das plantas infectadas pela bactéria 33.1:pNKGFP foi observado um aumento no número desta bactéria ao longo do tempo quando comparado os dois isolamentos, havendo consequentemente, uma

diminuição das mesmas na rizosfera e raiz das plantas avaliadas. Quando observado o padrão de colonização dos tecidos das plantas infectadas pela bactéria 33.1:pNKBOR, a mesma acumulou-se apenas na rizosfera, havendo uma diminuição da quantidade da 33.1:pNKBOR presente na raiz e caule das plantas ao longo do tempo.

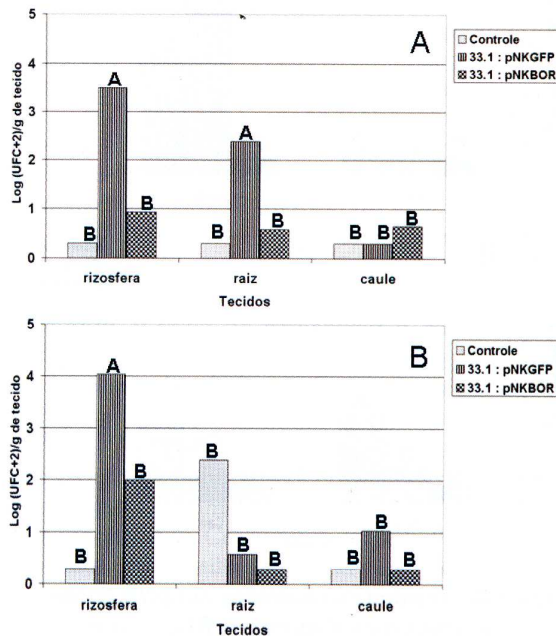


Figura 3. Densidade bacteriana presentes nas plantas micro-propagadas. **A)** Re-isolamento após 4 dias. **B)** Re-isolamento após 15 dias. O ensaio foi realizado com 4 repetições sendo avaliado por Tukey (5%) pelo programa SAS. Os dados da densidade bacteriana foram transformadas em $\log_{10}(\text{UFC} + 2)$ grama de tecido.

Discussão

No primeiro experimento, a bactéria 33.1:pNKGFP quando introduzida em cana-de-açúcar tanto convencional quanto geneticamente modificada alterou a densidade bacteriana endógena, e talvez também a diversidade bacteriana, uma vez que foi observado a diminuição da quantidade de bactérias resistentes a canamicina. Essa alteração provavelmente é fruto da substituição das bactérias endógenas pelas bactérias exógenas introduzidas, sendo que, esta alteração foi observada somente após 30 dias de inoculação das bactérias exógenas e com maior evidência na comunidade presente na raiz de cana-de-açúcar, demonstrando assim que a substituição de bactérias endógenas por uma população exógena é dependente do

tempo e do tecido do hospedeiro.

Dados semelhantes foram observados por ANDREOTE et al. et al. (2004) ao estudarem o efeito da adição de um isolado endofítico *Enterobacter cloacae* (PR2/7) geneticamente modificado com diferentes plasmídios, em plantas de citrus, observaram que somente na presença do gene *EglA*, contido no plasmídio pEglA, houve substituição de grupos bacterianas em relação ao tratamento controle, demonstrando assim que a presença de microrganismos geneticamente modificados podem realmente alterar a comunidade endofítica.

Também foi observado no primeiro experimento, que a transgenia das plantas de cana-de-açúcar, apesar das mesmas serem resistentes ao herbicida, afeta indiretamente a capacidade de colonização de 33.1:pNKGFP, dependendo do tecido e do tempo avaliado.

Entretanto, o plantio de plantas geneticamente modificadas ainda é um assunto bastante controverso em função dos efeitos diretos e indiretos que elas podem apresentar sobre a composição e funcionalidade do ecossistema. DUNFIELD & GERMIDA (2001), estudaram a transgenia na espécie *Brassica napus* e relataram que a comunidade bacteriana da rizosfera associada foi alterada pelo cultivo da planta transgênica. Entretanto GYAMFI et al. (2002), não observaram alteração na comunidade bacteriana estudando a mesma espécie vegetal transformada com gene de resistência ao herbicida glifosato.

Este foi o primeiro estudo que relata as alterações na colonização de cana-de-açúcar geneticamente modificada por uma bactéria endofítica. Vários estudos já foram realizados em relação à colonização desta planta sem ser geneticamente modificada, abordando principalmente bactérias fixadoras de nitrogênio. A partir destes relatos foi observado que a transferência da bactéria 33.1:pNKGFP do caule, onde foi inoculada, para a raiz, condiz com experimento de GOMES et al. (2005), no qual os autores ao inocularem *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp em diversas variedades de cana-de-açúcar observaram que a maior população bacteriana das duas bactérias inoculadas ocorreu nas raízes das variedades utilizadas.

Em relação à baixa densidade populacional (10^3) isolada após 30 dias, baixos números populacionais também foram observados por GONZALES & BARRAQUIO (2000), tal fato pode ser atribuído ao estado fenológico da planta, como sugerido por REIS JÚNIOR et al. (2000).

A partir dos dados e relatos descritos acima, foi

demonstrado que a relação entre cana-de-açúcar e bactérias colonizadoras deve ser sempre estudada de acordo com a particularidade de cada bactéria e variedade de cana utilizada, sendo que, a bactéria 33.1:pNKGFP avaliada neste experimento foi capaz de colonizar satisfatoriamente caule e raiz da variedade SP80-1842, sendo esta colonização afetada quando utilizada a variedade IMI-1 geneticamente modificada.

Quando estudado a infecção e colonização de cana-de-açúcar SP80-1842 convencional micro-propagada pelas bactérias 33.1:pNKGFP e 33.1:pNKBOR foi observado a alteração do padrão de colonização de acordo com o evento de transformação da bactéria 33.1. Foi possível observar que a bactéria 33.1:pNKGFP infecta e coloniza mais eficientemente as plantas micro-propagadas de cana-de-açúcar.

Apesar de não se conhecer as relações íntimas de interação desta bactéria com as plantas (LEBUHN et al, 2000), o gênero *Pantoea* frequentemente é associado com plantas e colonizam eficientemente rizosfera, sementes e outras partes de vários hospedeiros (BARRAQUIO et al, 2000).

Enfim, por meio do primeiro experimento foi demonstrado que a bactéria 33.1:pNKGFP quando inoculada, coloniza eficientemente a variedade de cana-de-açúcar SP80-1842, tanto convencional quanto geneticamente modificada, sendo que a transgenia da planta afeta o padrão de colonização desta bactéria. No segundo experimento, foi observado que as bactérias 33.1:pNKBOR e 33.1:pNKGFP foram capazes de infectar plantas micro-propagadas de cana-de-açúcar variedade SP80-1842, sendo comprovado que a transgenia das bactérias estaria influenciando o padrão de colonização das mesmas. Infelizmente, essas interações ainda não são bem compreendidas, pois sofrem efeitos de muitas variáveis que não exclusivamente a transgenia, tanto das plantas quando das bactérias, fato este que corrobora a importância de futuros trabalhos, mais detalhados que avaliem os efeitos gerados pela transgenia na interação planta-microrganismos e suas consequências a curto e longo prazo à agricultura moderna.

Referências

- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.D.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L. & ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. *Journal of Microbiology*, v. 42, n. 3, p.169-173, 2004.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; LACAVA, P. T. Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002. v. 1, p.86
- AZEVEDO, J.L. & ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli, B.N. & Deshmukh, S.K. (Ed.). *Fungi: multifaceted microbes*. Boca Raton: CRC Press, cap. 6, p.189-207, 2004.
- BARDIN, S.D.; HUANG, H.C.; LIU, L. & YANKE, L.J. Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp on canola, safflower, dry pea, and sugar beet. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie*, v. 25, p. 268-273, 2003.
- BARRAQUIO, W.L.; SEGUBRE, E.M.; GONZALES, M.A.S.; VERMA, S.C.; JAMES, E.K.; LADHA, J.K. & TRIPATHI, A.K. Diazotrophic enterobacteria: what is their role in the rhizosphere of rice? In: Ladha JK, Reddy PM, eds. *The Quest for Nitrogen Fixation in Rice*. Manila, Philippines: International Rice Research Institute, p. 93-118, 2000.
- BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L. & MONTESINOS, E. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology*, v. 84, n.1, p.93-104, 2003.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; BENEDETTI, A.; MARCHIONNI, M.; MOCALI, S.; A. FABIANI; LANDI, S.; SANTOMASSIMO, F.; PIETRANGELI, B.; NUTI, M.P.; MICLAUS, N. & GIOVANNETTI, M. Impact of *Bt* corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 6719-6729, 2005.
- DUNFIELD, K. E. & GERMIDA, J. J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 38, p. 1-9, 2001.
- DUNFIELD, K.E. & GERMIDA, J.J. Impact of genetically modified crops on soil and plant-associated microbial communities. *Journal of Environmental Quality*, v. 33, p. 806-815, 2004.
- FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; ODA, S., AZEVEDO, J. L. & ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 287, p. 8-14, 2008.
- GUNASINGHE, R.N.; IKIRIWATTE, C.J. & KARUNARATNE, A.M. The use of *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp to control banana pathogens. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 79, n. 6, p. 1002-1006, 2004.

- GÓMES, A. A.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D. & GOI, S.R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, p. 1105-1113, 2005.
- GONZALES, M.S.; & BARRAQUIO, W.L. Isolation and characterization of *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis) in *Saccharum officinarum* L., *S. spontaneum* L., and *Erianthus* sp. *Philippine Agricultural Scientist*, v. 83, p. 173-181, 2000
- GYAMFI, S.; PFEIFER, U.; STIERSCHNEIDER, M. & SESSITSCH, A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 41, p. 181-190, 2002.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F. & KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HEUER, H.; KROPFENSTEDT, R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G. & SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p.1325-1335, 2002.
- JEUN, Y.C., PARK, K.S.; KIM, C.H. ; FOWLER, W.D. & KLOPPER, J.W. Cytological observation of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control*, v. 29, p. 39-42, 2004.
- LEBUHN, M.; ACHOUAK, W.; SCHLOTTER, M.; BERGE, O.; MEIER, H.; BARAKAT, M.,; HARTMANN, A. & HEULIN, T. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 50, p. 2207-2223, 2000.
- LIU, L., KLOPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, v. 85, p. 695-698, 1995.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M. & VAN DER LELEI, D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 21, p. 583-606, 2002.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, v.15, p. 473-497, 1962.
- ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C. & BE' LANGER, R.R. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology*, v. 49, p. 523-530, 2000.
- PLAZA, P.; USALL, J., SMILANICK, J.L.; LAMARCA, N. & VINAS, I. Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons *Journal of Food Protection*, v. 67, n. 4, p. 781-786, 2004.
- PROCÓPIO, R. E.L. Diversidade bacteriana endofítica de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico. 115p. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade São Paulo (ICB/USP), 2004.
- RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C. BERG, G.; VAN ELSAS, J.D. & SESSITSCH, A. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. *Journal of Applied Ecology*, v. 43, p. 555-566, 2006.
- REIS JÚNIOR, F.B. DOS REIS, V.M.; URQUIAGA, S. & DOBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil*, v. 219, p.153-159, 2000a.
- ROSSIGNOL, M; BASSET, A.; ESPELL, O. & BOCCARD, F. NKBOR, a mini-Tn10-based transposon for random insertion in the chromosome of Gram-negative bacteria and the rapid recovery of sequences flanking the insertion sites in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, v.152, p. 481-485, 2001.
- RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; SANTOS, D.R. & AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cação (*Theobroma cação* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom disease. *International Journal of Biological Sciences*, v. 1, p. 24-33, 2005.
- VAURAMO, S.; PASONEN, H.L.; PAPPINEN, A. & SETALA, H. Decomposition of leaf litter from chitinase transgenic silver birch (*Betula pendula*) and effects on decomposer populations in a field trial. *Applied Soil Ecology*, v. 32, p. 338-349, 2006.
- WATRUD, L.S.; MISRA, S.; GEDAMU, L.; SHIROYAMA, T.; MAGGARD, S. & DI GIOVANNI, G. Ecological risk assessment of alfalfa (*Medicago varia* L.) genetically engineered to express a human metallothionein (hMT) gene. *Water Air and Soil Pollution*, v.176, p. 329-349, 2006.
- WEI, G., KLOPPER, J.W. & TUZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, v. 86, p. 221-224, 1996.
- WEI, X.D.; ZOU, H.L.; CHU, L.M.; LIAO, B.; YE, C.M. & LAN, C.Y. Field released transgenic papaya effect on soil microbial communities and enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences-China*, v.18, p. 734-740, 2006.