

Antibioticoterapia em microplantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus*)

Antibiotic therapy in Pineapple (*Ananas comosus*) microplants

Gabriela Ferraz Leone^I Cristina Vieira de Almeida^{II} Monita Fiori de Abreu-Tarazi^{III}
Katherine Derlene Batagin-Piotto^I Fabiane Aparecida Artioli-Coelho^I Marcílio de Almeida^{I*}

RESUMO

Com o intuito de avaliar os efeitos da antibioticoterapia no crescimento de plantas micropropagadas de abacaxizeiros, bem como na comunidade bacteriana endofítica da espécie, realizaram-se análises moleculares. Verificou-se a presença de endófitos no interior das microplantas, mesmo após 30 dias de cultivo em meio de cultura MS, suplementado com diferentes antibióticos, e analisou-se o crescimento da parte aérea e radicular das microplantas. Decorrido o período de 30 dias de cultivo, constatou-se ainda a presença de bactérias endofíticas, no entanto, as microplantas apresentaram acentuada redução no crescimento da parte aérea e radicular, evidenciando assim a influência da microbiota endofítica no crescimento das microplantas *in vitro* e a importância da manutenção do equilíbrio endófitos/microplanta.

Palavras-chave: endófitos, antibióticos, bactérias, cultura axênica, micropropagação.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the antibiotic therapy effects in the growing of micropropagated pineapple plants as well as in the community of the endophytic bacterial of the species. It was performed molecular analyzes and verified the presence of endophytes within microplants even after 30 days of culture on MS medium supplemented with different antibiotics and analyzed the development growth of shoots and roots of microplants. After the period of 30 days of cultivation, even being checked the presence of endophytic bacteria, it was verified that the microplants showed reduction of the growing of shoots and roots, thereby demonstrating the influence of *in vitro* endophytic microorganisms in the

development of microplants, and the importance of maintaining it in equilibrium with endophytes/ microplants.

Key words: endophytes, antibiotics, bacteria, axenic culture, micropropagation.

INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são definidos como aqueles que vivem no interior das plantas, sem produzir estruturas externas visíveis ou lesões ao seu hospedeiro, partilhando da nutrição e proteção deste, têm distinção dos patógenos, por não causarem doenças e dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície do vegetal (AZEVEDO, 1998). Essa definição dos microrganismos é puramente didática, sendo que um endófito pode tornar-se patogênico de acordo com condições ambientais às quais é submetido (SILVA, 2006).

Em plantas cultivadas *in vitro*, a presença de microrganismos junto ao meio de cultura, muitas vezes, está associada à contaminação, sendo assim sua presença indesejada, já que um dos objetivos desta técnica é justamente a obtenção de plantas axênicas, ou seja, totalmente isentas de microrganismos (LEIFERT & CASSELLS, 2001).

A contaminação microbiana, quando presente, é vista como uma séria ameaça ao sucesso

^IPrograma de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: mdalmeida@usp.br. *Autor para correspondência.

^{II}InVivoPalm Consultoria E.D.B. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil.

^{III}VIVATI Plant Breeding, Abadia de Goiás, GO, Brasil.

da micropropagação (THOMAS, 2004). No entanto, trabalhos como o de ALMEIDA et al. (2009) e ABREU-TARAZI et al. (2010) comprovaram a presença de bactérias em plantas micropropagadas saudáveis e assintomáticas (sem manifestação de colônias bacterianas no meio de cultura), quebrando, desta forma, o paradigma de que plantas cultivadas *in vitro* são axênicas.

No cultivo *in vitro*, considera-se que a manifestação de colônias microbianas no meio de cultura, quando não ocorre nos primeiros dias após a introdução do material, não é caracterizada como contaminação, considerando-se o fato de não afetarem o crescimento do vegetal e, muitas vezes, apresentam associações benéficas com ele (ALMEIDA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2009; ABREU-TARAZI et al., 2010; BATAGIN-PIOTTO, 2013).

Atualmente, avalia-se a possibilidade de não se descartar plantas *in vitro* que apresentem manifestação de colônias bacterianas, e sim controlar o desenvolvimento e multiplicação destas, baseado na possibilidade de esses microrganismos endofíticos serem vitais para o crescimento das microplantas. Isso se dá em razão da estreita relação entre o endófito e o hospedeiro, a qual envolve processos de co-evolução, influenciando na fisiologia do vegetal, bem como otimizando o crescimento e a adaptação das plantas às diferentes condições de cultivo, seja *in vitro* ou *in vivo* (ALMEIDA et al., 2009).

Considerando todos os possíveis benefícios que a microbiota bacteriana endofítica apresenta aos seus hospedeiros, o controle desses microrganismos mostra-se de fundamental importância para o crescimento da planta, sendo o uso de antibióticos e biocidas uma alternativa viável para se evitar o descarte dessas culturas (LEONE, 2013). Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da antibioticoterapia no crescimento de microplantas de abacaxizeiros, bem como a presença ou ausência de comunidades bacterianas endofíticas na referida espécie após tratamento com antibióticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas microplantas assintomáticas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill), cv. 'IAC Gomo-de-mel', cultivadas em meio de cultura líquido, com a metade da concentração de sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30g L⁻¹), em três tipos de antibióticos (Cefalexina, Ampicilina, Ciprofloxacina combinados entre si), na concentração de 100mg L⁻¹, sendo o pH ajustado para 5,8±1.

Os meios de cultura foram autoclavados e, após atingirem a temperatura ambiente, em câmara de

fluxo laminar, os antibióticos foram filtro-esterilizados e acrescidos ao meio de cultura na concentração acima mencionada. As microplantas foram mantidas em condição estática (sem agitação), em sala de crescimento, com temperatura, fotoperíodo e irradiância controladas (25±2°C, 16 horas e 42μmol m⁻² s⁻¹, respectivamente).

O delineamento em esquema fatorial 5x6 inteiramente casualizado, com cinco repetições tratamento⁻¹, sendo um grupo controle (T1: ausência de antibióticos (controle) e quatro tratamentos constituídos de combinações de antibióticos (T2: Cefalexina + Ampicilina + Ciprofloxacina; T3: Cefalexina + Ampicilina; T4: Cefalexina + Ciprofloxacina e T5: Ampicilina + Ciprofloxacina) e 6 tempos de avaliação (5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de cultivo).

Após 30 dias em antibioticoterapia, realizou-se a extração do DNA total das amostras, de acordo com o descrito por FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), utilizando-se 200mg de tecido fresco de amostras de raízes e parte aérea das microplantas, seguida da amplificação do gene 16S rRNA por PCR. Foi empregado, primeiramente, o seguinte conjunto de oligonucleotídeos: fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e rD1 (5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3') (WEISBURG et al., 1991), visando confirmar a presença de DNA bacteriano nas amostras das estruturas vegetais. Para garantir que o DNA bacteriano encontrado fosse realmente procedente de alguma bactéria endofítica, e não resultante de um possível fragmento de 16S rRNA cloroplastidial, utilizou-se o produto extraído da primeira PCR e realizou-se uma nova PCR. Para tanto, foram utilizados os oligonucleotídeos f799 (5' AAC MGG ATT AGA TAC CCK G 3'), específico para DNA bacteriano (CHELIUS & TRIPLETT, 2001), em conjunto com o iniciador r1492 (5' TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (HEUER et al., 1997).

Durante os 30 dias de tratamento, para verificar possíveis alterações no crescimento das microplantas, a cada cinco dias, foram aferidos os comprimentos da parte aérea e radicular delas, em decorrência do tempo de acondicionamento e/ou dos diferentes antibióticos utilizados. Os dados de comprimento da parte aérea e comprimento do sistema radicular foram transformados com n^{0,5} e submetidos à Análise de Variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As microplantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. 'IAC Gomo-de-mel',

testadas no presente trabalho, apresentaram-se assintomáticas, sem qualquer evidência de contaminação microbiana durante todo o cultivo *in vitro*. Muitos são os autores que consideram comunidades endofíticas como crípticas, já que não apresentam sintomas em seus hospedeiros e não são detectadas por técnicas de histoquímica, microscopia e de isolamento. Entretanto, estudos com plantas *in vitro* indicam a existência de comunidades bacterianas não cultiváveis, as quais só podem ser identificadas por meio de análises moleculares, sendo as mais recentes baseadas no gene 16S rRNA (ABREU-TARAZI et al., 2010).

A PCR, utilizando os primers f799 e r1492, permite a amplificação de dois produtos, um mitocondrial de aproximadamente 1090pb e outro bacteriano de 735pb, os quais podem ser separados eletroforéticamente em gel de agarose (CHELIUS & TRIPLETT, 2001), como pode ser verificado na figura 2. Nessa imagem, observa-se um produto de 700pb a 800pb e outro de 1000pb a 1100pb, corroborando os resultados apresentados por ABREU-TARAZI et al. (2010), com a mesma espécie utilizada no presente trabalho, (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. 'IAC Gomo-de-mel'), confirmando, dessa forma, a presença de DNA bacteriano associado ao vegetal.

De acordo com avaliações ao longo do período de trinta dias de tratamento, comparou-se o comprimento da parte aérea e do sistema radicular das microplantas de abacaxizeiros, observando-se, assim, que os indivíduos submetidos aos antibióticos, em comparação com os pertencentes ao grupo controle (isento de antibióticos), apresentaram menor crescimento da parte aérea, bem como do sistema radicular (Tabelas 1 e 2), evidenciando a interferência destes compostos no crescimento das microplantas. O mesmo fato foi observado por ABREU-TARAZI et al. (2010)

e LEONE (2013), em trabalhos que fizeram uso de tratamentos com combinações de antibióticos em plantas micropropagadas. Eles verificaram, comparativamente, alterações no crescimento das microplantas, sendo, em todos os referidos trabalhos, o tratamento com maiores médias em relação ao crescimento do vegetal, o grupo controle (isento de antibióticos).

Não foram identificadas diferenças significativas na taxa de crescimento das microplantas entre os seis tempos de cultivo das microplantas submetidas aos diferentes tratamentos. Contudo, foi possível notar que há uma tendência crescente para a taxa de crescimento da parte aérea e raízes de 5 para 30 dias, sendo mais acentuada no tratamento controle (T1). Em relação às avaliações realizadas na taxa de crescimento das microplantas, entre os tratamentos após trinta dias de cultivo, foi possível notar que aquelas pertencentes ao grupo controle (T1) apresentaram taxa de crescimento da parte aérea e sistema radicular, significativamente maior que nos demais (12,9 e 10,3cm, respectivamente). Nos tratamentos acrescidos com antibióticos, houve redução no crescimento como um todo, sendo T4 o tratamento com o menor valor para a parte aérea (5,3cm) e T3 o menor valor para as raízes (2,0cm). Contudo, os tratamentos T2, T3, T4 e T5 não apresentaram diferenças significativas entre si, possuindo assim um padrão de comportamento similar em relação à taxa de crescimento da parte aérea.

Quanto o crescimento das raízes, T2, T3 e T4 apresentaram as menores médias, e estatisticamente iguais entre si. O tratamento T5 diferiu dos demais, mostrando a segunda maior média, sendo inferior apenas ao tratamento T1. Embora as médias do crescimento da parte aérea dos tratamentos T2-T5, apresentaram-se estatisticamente iguais entre si, pode-se notar que o tratamento T5 (Ampicilina + Ciprofloxacina) foi também aquele que apresentou

Tabela 1 - Avaliação do comprimento (cm) da parte aérea de microplantas de abacaxizeiro ao longo do ensaio de antibioticoterapia. Sendo T1: ausência de antibióticos (controle); T2: Cefalexina + Ampicilina + Ciprofloxacina; T3: Cefalexina + Ampicilina; T4: Cefalexina + Ciprofloxacina e T5: Ampicilina + Ciprofloxacina.

Tratamentos	-----Tempo de cultivo (dias)-----					
	5	10	15	20	25	30
T1	9,5 Aa	10,4 Aa	11,0 Aa	11,8 Aa	12,4 Aa	12,9 Aa
T2	4,6 Ba	4,8 Ba	4,9 Ba	4,9 Ba	5,3 Ba	5,7 Ba
T3	4,6 Ba	4,8 Ba	4,9 Ba	5,0 Ba	5,2 Ba	5,4 Ba
T4	5,2 Ba	5,2 Ba	5,2 Ba	5,2 Ba	5,2 Ba	5,3 Ba
T5	6,7 Ba	6,9 Ba	7,1 Ba	7,2 Ba	7,2 Ba	7,2 Ba

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. CV (%) = 22,9.

Tabela 2 - Avaliação do comprimento (cm) radicular de microplantas de abacaxizeiro ao longo do ensaio de antibioticoterapia. Sendo T1: ausência de antibióticos (controle); T2: Cefalexina + Ampicilina + Ciprofloxacina; T3: Cefalexina + Ampicilina; T4: Cefalexina + Ciprofloxacina e T5: Ampicilina + Ciprofloxacina.

Tratamentos	-----Tempo de cultivo (dias)-----					
	5	10	15	20	25	30
T1	7,80 Aa	8,10 Aa	8,60 Aa	9,40 Aa	9,90 Aa	10,30 Aa
T2	1,34 Ca	1,34 Ca	1,50 Ca	1,60 Ca	2,00 Ca	2,10 Ca
T3	1,60 Ca	1,90 Ca	1,90 Ca	1,90 Ca	1,90 Ca	2,00 Ca
T4	1,96 Ca	1,98 Ca	1,98 Ca	2,38 Ca	2,60 Ca	2,70 Ca
T5	5,00 Ba	5,00 Ba	5,10 Ba	5,20 Ba	5,50 Ba	5,80 Ba

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. CV = 48,4.

a segunda maior média para essa característica (7,2cm), de forma similar ao que foi observado para o crescimento das raízes. Os dois antibióticos utilizados no tratamento T5 (Ampicilina e Ciprofloxacina) são pouco solúveis ou insolúveis em água, podendo ter encontrado algumas dificuldades para chegar à parte aérea, não afetando então a microbiota endofítica. Isso leva a crer que, provavelmente, o efeito destes dois antibióticos pode ter sido minimizado durante o transporte ao longo do corpo vegetal, pois, de acordo com ABREU-TARAZI et al. (2010), o transporte em maior escala é controlado por membranas celulares, dependendo, portanto, da natureza química do soluto.

Essa queda no crescimento, observada em microplantas de abacaxizeiro submetidas à antibioticoterapia, em relação ao controle, era de se esperar, visto que, de acordo com ABREU-TARAZI et al. (2010), o contato direto das raízes com a solução no meio de cultura, provavelmente, favorece a absorção dos antibióticos, o qual pode ter alterado a estrutura e diversidade da comunidade bacteriana endofítica presente nesse órgão e, conseqüentemente, alterado fenômenos morfológicos exclusivos do sistema radicular das microplantas. Adicionalmente, o autor ressalta que a ação de antibióticos no sistema radicular, dependendo de seu potencial de ação, pode influenciar indiretamente no crescimento da planta como um todo, limitando seu desenvolvimento.

De acordo com AKELLO et al. (2007), bactérias endofíticas estão diretamente relacionadas com o metabolismo das microplantas, por proporcionar diversos benefícios ao hospedeiro, como aumentar a produção de biomassa, crescimento e sobrevivência, principalmente nas fases de aclimatização.

Dessa forma, pode-se levar em consideração que o uso dos respectivos antibióticos pode ter ocasionado desequilíbrio na comunidade

endofítica das microplantas, o que, por sua vez, pode ter afetado o metabolismo do vegetal. Assim, acredita-se que a alteração no crescimento das microplantas, submetidas à antibioticoterapia, pode ser decorrente não apenas do modo de ação direta de cada antibiótico no metabolismo das plantas, mas também alterando a microbiota bacteriana endofítica e conseqüentemente a especificidade existente entre as bactérias endolíticas e seu hospedeiro, inibindo a possível ação benéfica ou mesmo nula que esses microrganismos apresentam no metabolismo do vegetal. Trabalhos como o de BATAGIN-PIOTTO (2013) demonstram que a especificidade dessa interação endófito/microplanta vai muito além da espécie, podendo até se tratar de uma especificidade entre clones ou mesmo entre indivíduos do mesmo clone. Além disso, ABREU-TARAZI et al. (2010) salientaram que cada microplanta apresenta uma resposta distinta à antibioticoterapia, confirmando, assim, a especificidade dessa interação endófito/microplanta, bem como os resultados observados no presente trabalho quanto as respostas dos clones a cada antibiótico ou mesmo combinação deles.

Por meio da análise molecular, observou-se que, mesmo com a utilização de diferentes antibióticos, não houve a eliminação total dos microrganismos endofíticos (Figuras 1 e 2), sugerindo que a comunidade endofítica, provavelmente, foi alterada em detrimento de algumas comunidades afetadas pela presença dos antibióticos, o que, por sua vez, pode ter ocasionado alterações homeostáticas, que influenciaram drasticamente na manutenção e diversidade microbiana, bem como no crescimento das microplantas. Segundo THOMAS (2004), mesmo com tratamentos de desinfestação na introdução do material *in vitro*, bem como o uso de antibióticos durante o cultivo, constata-se a sobrevivência da

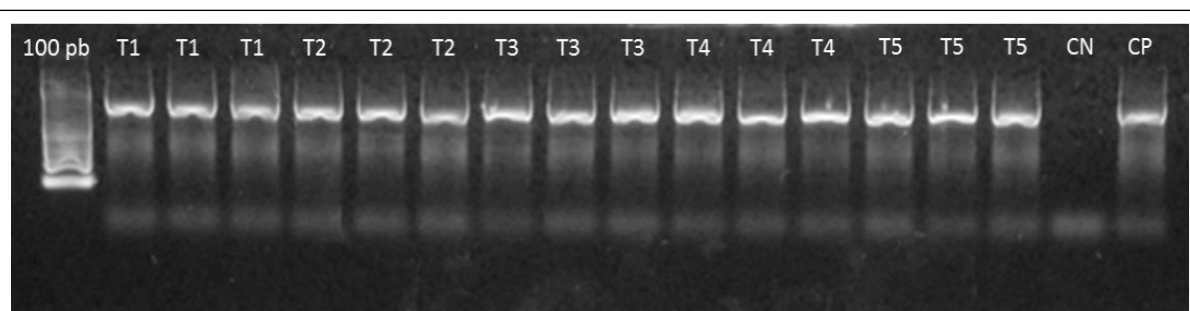


Figura 1 - Resultado da amplificação do gene 16S rRNA de Bacteria com os oligonucleotídeos fD1 e rD1 a partir do DNA total de microplantas de abacaxizeiros cv. IAC Gomo-de-mel. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo. PM – padrão de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Sendo T1: ausência de antibióticos (controle); T2: Cefalexina + Ampicilina + Ciprofloxacina; T3: Cefalexina + Ampicilina; T4: Cefalexina + Ciprofloxacina e T5: Ampicilina + Ciprofloxacina, CP – controle positivo, CN – controle negativo. O comprimento dos fragmentos de PCR apresentaram os mesmos padrões descritos por ABREU-TARAZI et al. (2010).

microbiota bacteriana endofítica e, algumas vezes, embora não tenha sido o caso neste trabalho, pode ocorrer o aparecimento de manifestações bacterianas em meio de cultivo de microplantas até então caracterizadas axênicas.

Cabe ressaltar que, assim como observado no presente trabalho, até o momento, não existe ainda uma real comprovação da efetividade do uso de antibióticos para minimizar as manifestações bacterianas endofíticas *in vitro*, a não ser que as microplantas sejam tratadas de maneira intensiva durante um longo período com antibióticos (DEBERGH & VANDERSCHAEGHE, 1988). No entanto, receia-se que este tratamento possa acarretar fitotoxicidade nas plantas e por fim comprometa seu desenvolvimento e crescimento.

Como foi observado, mesmo com a utilização de antibióticos durante 30 dias de cultivo, constatou-

se a presença de bactérias endofíticas nos tecidos das microplantas de abacaxi (Figura 2), resultados esses que corroboram e reafirmam a inexistência de plantas axênicas, como relatado por ABREU-TARAZI et al. (2010) e LEONE (2013). Entretanto, é importante lembrar que, ao longo do tratamento, não foram observadas manifestações bacterianas no meio de cultura. Dessa forma, e com base nos resultados obtidos no presente trabalho, cabe ressaltar a importância da associação das bactérias endofíticas e seus respectivos hospedeiros durante os processos de micropropagação, a qual deve ser mantida durante todo o cultivo *in vitro*.

CONCLUSÃO

A antibioticoterapia em abacaxizeiros cultivados *in vitro* não removeu totalmente a microbiota bacteriana endofítica das microplantas

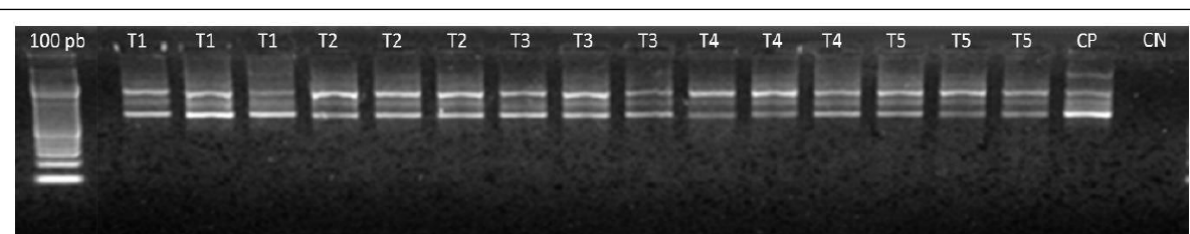


Figura 2 - Resultado da amplificação do gene 16S rRNA de Bacteria purificado, com os oligonucleotídeos f799 e r1492 para exclusão do gene 16S cloroplastidial a partir do DNA total de microplantas de abacaxizeiros cv. IAC Gomo-de-mel. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo. PM – padrão de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Sendo T1: ausência de antibióticos (controle); T2: Cefalexina + Ampicilina + Ciprofloxacina; T3: Cefalexina + Ampicilina; T4: Cefalexina + Ciprofloxacina e T5: Ampicilina + Ciprofloxacina, CN – controle negativo. O comprimento dos fragmentos de PCR apresentaram os mesmos padrões descritos por ABREU-TARAZI et al. (2010).

e, embora não tenha ocasionado fitotoxicidade nelas, observou-se que houve uma desaceleração no crescimento do vegetal. Esse fato se deve provavelmente ao desequilíbrio ocasionado pela antibioticoterapia nas comunidades bacterianas endofíticas das microplantas. Sendo assim, considera-se de extrema importância que o uso de antibióticos seja feito de maneira controlada, visando a manutenção do equilíbrio endófitos/microplanta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro. À InVivoPalm Consultoria, Estudo e Desenvolvimento Biológico Ltda., pelo auxílio científico prestado para a realização do trabalho, e ao Dr. Fernando Angelo Piotto, pelo suporte nas análises dos dados.

REFERÊNCIAS

- ABREU-TARAZI, M.F. et al. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.26, p.555-560, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-009-0191-3>>. Acesso em: 16 jul. 2013. doi: 10.1007/s11274-009-0191-3.
- AKELLO, J. et al. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal Invertebrate Pathology**, v.96, p.34-42, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201107000444>>. Acesso em: 16 jul. 2013.
- ALMEIDA, C.V. et al. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.25, p.1757-1764, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-009-0073-8>>. Acesso em: 16 jul. 2013. doi: 10.1007/s11274-009-0073-8.
- ALMEIDA, C.V. et al. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.467-470, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v40n5/24428.pdf>>. Acesso em: 28 maio 2014.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p.117-137. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000112&pid=S0044-967200400020000600005&lng=en>. Acesso em: 25 maio 2014.
- BATAGIN-PIOTTO, K.D. **Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**. 2013. 165f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Curso de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, SP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-10062013-170117/pt-br.php>>. Acesso em: 18 nov. 2013.
- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The Diversity of *Archaea* and *Bacteria* in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbiology Ecology**, v.41, p.252-263, 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002480000087>>. Acesso em: 16 jul. 2013. doi: 10.1007/s002480000087.
- DEBERGH, P.C.; VANDERSCHAEGHE, A.M. Some symptoms indicating the presence of bacterial contaminants in plant tissue culture. **Acta Horticulturae**, v.255, p.77-81, 1988. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/225/225_8.htm>. Acesso em: 18 nov. 2013.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. (EMBRAPA CENARGEN. Documentos, 20). Disponível em: <<http://www.cnaf.embrapa.br>>. Acesso em: 16 jul. 2013.
- HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.3233-3241, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168621/pdf/633233.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2013. doi: 0099-2240/97/\$04.0010.
- LEIFERT, C.; CASSELLS, A.C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, v.37, p.133-138, 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11627-001-0025-y.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2013. doi: 10.1079/IVP2000129.
- LEONE, G.F. **Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto**. 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Curso de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, SP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-10092013-160116/pt-br.php>>. Acesso em: 18 nov. 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v.15, p.473-497, 1962. Disponível em: <<http://essm.tamu.edu/media/46257/murashigeandskoogintropapersjanick.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2013. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- SILVA, M.E. **Comunidades fúngicas endofítica, epifítica e rizosférica em diferentes ecossistemas**. 2006. 97f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, RS. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/7325/000542237.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25 maio 2014.
- THOMAS, P. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. **Current Science**, v.87, p.67-72, 2004. Disponível em: <http://www.currentscience.ac.in/Downloads/article_id_087_01_0067_0072_0.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2013.
- WEISBURG, W.G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207061/>>. Acesso em: 16 jul. 2013.