

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

MATHEUS AUGUSTO SACHETIM

**CONTROLE DE BACTÉRIAS NO CULTIVO *IN VITRO* DE HÍBRIDOS
COMERCIAIS DE *EUCALYPTUS***

**Ilha Solteira
2022**

MATHEUS AUGUSTO SACHETIM

**CONTROLE DE BACTÉRIAS NO CULTIVO *IN VITRO* DE HÍBRIDOS
COMERCIAIS DE *EUCALYPTUS***

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira –
Unesp como parte dos requisitos para
obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Profa. Dra. Gláucia Amorim Faria
Orientadora

Me. Samira Rangel do Prado Frade
Coorientadora

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA

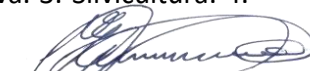
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

S121c Sachetim, Matheus Augusto.
Controle de bactérias no cultivo *in vitro* de híbridos comerciais de *Eucalyptus* / Matheus Augusto Sachetim. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2022
57 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (graduação em Engenharia Agrônômica) -
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2022

Orientadora: Glaucia Amorim Faria
Co-orientador: Samira Rangel do Prado Frade
Inclui bibliografia

1. Manifestação bacteriana. 2. Propagação vegetativa. 3. Silvicultura. 4.
Biotecnologia florestal.



Erika Renata Bocchi Lomba
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Supervisora Técnica de Seção
CRB/8 -10792

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Ilha Solteira

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA

ATA DA DEFESA – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Controle de bactérias no cultivo *in vitro* de híbridos comerciais de *Eucalyptus*"

ALUNO: MATHEUS AUGUSTO SACHETIM

RA: 162055196

ORIENTADOR: Profa. Dra. Gláucia Amorim Faria

CO-ORIENTADOR: Samira Rangel do Prado Frade (Doutoranda Agronomia FEIS/UNESP)

Aprovado (X) - Reprovado () pela Comissão Examinadora.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Gláucia Amorim Faria
Presidente (Orientador)

Otávio Ananias Pereira da Silva Ribeiro
Doutorando Agronomia FEIS/UNESP

Dra. Elisângela de Souza Miranda Muynarsk
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP

Aluno: Matheus Augusto Sachetim

Ilha Solteira (SP) 16 de novembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, que me deram todo apoio moral quanto financeiro para que eu pudesse viver meu sonho que era estudar em uma universidade pública no curso de Engenharia Agrônômica. Sair da zona rural do interior de Olímpia e conseguir chegar onde cheguei hoje foi um caminho longo e cheio de altos e baixos, mas consegui com a realização deste trabalho finalizar esta etapa mais importante da minha vida que é a faculdade, e nada disso teria acontecido sem o apoio dos meus pais Ivone e Celso.

Também gostaria de agradecer aos meus amigos Felipe, Marta, Karina, Natália, Evandro, Camila, Marielle, Luiza, Suellen, Gisele e Lucas por compartilharem um pouco dos meus sonhos e me ajudarem nos momentos mais difíceis que foram estes últimos meses.

Por fim, gostaria de agradecer à minha coorientadora Samira tanto pela amizade quanto pela parceria durante o desenvolvimento deste projeto que partiu do zero, e a minha gestora Luiza pela amizade e por me ajudar a entender que coisas novas e sair da zona de conforto é de extrema importância para o desenvolvimento e realização tanto pessoal quanto profissional.

Contudo, agradeço à minha orientadora Gláucia pela parceria desde 2019 e ao Instituto SENAI de Inovação Biomassa pela minha primeira experiência profissional como estagiário e por dar todo apoio estrutural para realização deste trabalho.

RESUMO

A contaminação bacteriana é um dos principais problemas que ocorrem na cultura de tecidos vegetais. Tendo como prioridade para o estabelecimento de protocolos a obtenção de explantes axênicos, o uso de antibióticos nos meios de cultivo vem se tornando uma alternativa para o controle destas contaminações, evitando descarte e perda de material vegetal de grande valor genético. Este trabalho teve como objetivo isolar e realizar testes de sensibilidade para controle de duas bactérias (B6 e B11) com ocorrência frequente no cultivo *in vitro* de um híbrido comercial de eucalipto, aos antibióticos ampicilina (Ampicillin sodium salt) e tetraciclina (Tetracycline hydrochloride), a fim de entender qual o antibiótico e a concentração mais eficaz para o controle destas bactérias durante o cultivo *in vitro* da cultura. Para tal, foram realizados dois experimentos: no experimento I foi averiguada a sensibilidade das bactérias aos antibióticos, pelo teste de antibiograma por disco-difusão com discos de papel em ágar contendo seis concentrações (0; 100; 200; 300; 400 e 500 mg L⁻¹) dos antibióticos com cinco repetições cada em Delineamento Inteiramente Casualizado, sendo avaliado o diâmetro médio do halo formado após 24 horas. No experimento II a fim de analisar a resposta da interação entre planta, bactéria e antibiótico, foi realizado o ensaio *in vitro* utilizando os dois melhores tratamentos obtidos no experimento I, compostos por 20 unidades experimentais cada, em Delineamento Inteiramente Casualizado, avaliando-se por meio de escala de notas o vigor, oxidação dos explantes e a manifestação bacteriana após 28 dias em sala de crescimento. Os melhores resultados obtidos no experimento I foram com o antibiótico tetraciclina nas concentrações de 400 e 500 mg L⁻¹ para B6 e B11, respectivamente. No experimento II, foi verificado que a tetraciclina teve efeito fitotóxico, promovendo redução do vigor e aumento da oxidação dos explantes, apesar de controlar a contaminação durante o cultivo *in vitro* do eucalipto.

Palavras-chave: manifestação bacteriana; propagação vegetativa; silvicultura; biotecnologia florestal.

ABSTRACT

Bacterial contamination is one of the main problems occurring in plant tissue culture. Considering as a priority for the establishment of protocols to obtain axenic explants, the use of antibiotics in the culture media has become an alternative for the control of these contaminations and avoiding the discard and loss of plant materials of great genetic value. This work aimed to isolate and perform sensitivity and control tests of two bacteria (B6 and B11) commonly found in *in vitro* culture of a commercial hybrid of *Eucalyptus* using the antibiotics ampicillin (Ampicillin sodium salt) and tetracycline (Tetracycline hydrochloride), in an attempt to understand which antibiotic and concentration are more effective to control these bacteria while growing the culture *in vitro*. Two experiments were performed, in part I of the experiment, to determine the sensitivity of the selected bacteria to the antibiotics, the antibiogram test was performed by disc-diffusion with paper discs on agar containing six different concentrations (treatments) of 0; 100; 200; 300; 400 and 500 mg L⁻¹ of the antibiotics and five repetitions each, in completely randomized design Completely Randomized Design, and the average diameter of the halo formed after 24 hours was evaluated. In part II of the experiment, in order to analyze the response of the interaction between plant, bacteria and antibiotic, the *in vitro* assay was performed with the two best treatments obtained in part I composed of 20 experimental units each, in Completely Randomized Design, and it was evaluated through a scale of notes the vigor, oxidation of the explants and bacterial manifestation after 28 days in the plant growth room. The best results obtained in part I for bacterial growth inhibition were with the tetracycline antibiotic at concentrations of 400 and 500 mg L⁻¹ for B6 and B11, respectively. In part II, since tetracycline has a phytotoxic effect, the results obtained showed a reduction in vigor and an increase in oxidation of the explants, but the contamination was controlled during the *in vitro* cultivation of the *Eucalyptus* explants.

Keywords: bacterial manifestation; vegetative propagation; forestry; forest biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Cepas selecionadas no cultivo <i>in vitro</i> de híbridos comerciais de eucalipto.....	23
Figura 2	- Cepas selecionadas no cultivo <i>in vitro</i> de híbridos comerciais de eucalipto.....	24
Figura 3	- Cepas selecionadas no cultivo <i>in vitro</i> de híbridos comerciais de eucalipto não caracterizadas como bactérias.....	25
Figura 4	- Mensuração do halo de inibição.....	28
Figura 5	- Disposição dos tratamentos no antibiograma por disco-difusão em ágar.....	29
Figura 6	- Escala de notas para variável vigor e oxidação dos explantes.....	32
Figura 7	- Antibiograma por disco-difusão em ágar para as bactérias B6 e B11 submetidas aos antibióticos ampicilina e tetraciclina.....	34
Figura 8	- Regressão do fator concentração da solução antimicrobiana de Tetraciclina para bactéria B6 em relação ao diâmetro médio do halo de inibição formado.....	36
Figura 9	- Regressão do fator concentração da solução antimicrobiana de Tetraciclina para bactéria B11 em relação ao diâmetro médio do halo de inibição formado.....	36
Figura 10	- Desdobramento dos fatores concentração e antibiótico para bactéria B6 em relação ao diâmetro médio do halo de inibição formado.....	38
Figura 11	- Desdobramento dos fatores concentração e antibiótico para bactéria B11 em relação ao diâmetro médio do halo de inibição formado.....	38
Figura 12	- Média das notas atribuídas para variável vigor dos explantes em relação aos 14 e 28 DAI para as bactérias B6 e B11.....	40
Figura 13	- Vigor dos explantes ao decorrer do ensaio.....	41
Figura 14	- Média das notas atribuídas para variável oxidação em relação aos 14 e 28 DAI para as bactérias B6 e B11.....	42

Figura 15 - Desenvolvimento dos explantes contaminados com a bactéria B6 no meio de cultivo com adição de 400 mg L ⁻¹ de tetraciclina aos 14 e 28 DAI.....	43
Figura 16 - Desenvolvimento dos explantes contaminados com a bactéria B11 no meio de cultivo com adição de 500 mg L ⁻¹ de tetraciclina aos 14 e 28 DAI.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Composição do meio de cultivo sais WPM.....	30
Tabela 2	- Variáveis e parâmetros utilizados para atribuição de notas.....	32
Tabela 3	- Resumo da análise de variância e médias dos tratamentos para os fatores bactérias, antibióticos, concentrações e suas interações no controle bacteriano no cultivo <i>in vitro</i> de hídridos de eucalipto, Três Lagoas, Brasil.....	33
Tabela 4	- Valores médios do halo de inibição das bactérias B6 e B11 formados quando submetidos aos antibióticos ampicilina e tetraciclina.....	34
Tabela 5	- Médias do desdobramento do fator concentração com o fator antibiótico.....	37
Tabela 6	- Análise de variância e médias para as variáveis vigor dos explantes (VE) e oxidação (OXI) para B6 e B11.....	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

½MS	Meio Murashige e Skoog com a metade da concentração de sais
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
DAI	Dias após a inoculação
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
MB	Manifestação Bacteriana
MIC	Mínima Concentração Inibitória
MS	Meio Murashige e Skoog
OXI	Oxidação
UFC	Unidade Formadora de Colônias
VE	Vigor do Explante
WPM	Meio Wood Plant Medium

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	MICROPROPAGAÇÃO.....	16
2.2	MEIOS DE CULTURA.....	17
2.3	CONTAMINAÇÃO E MANIFESTAÇÃO MICROBIANAS.....	18
2.4	ANTIMICROBIANOS DE OCORRÊNCIA NATURAL.....	19
2.5	USO DE ANTIBIÓTICOS NA MICROPROPAGAÇÃO.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	EXPERIMENTO I: isolamento, testes de sensibilidade e controle.....	21
3.1.1	Caracterização dos microrganismos	21
3.1.2	Preparo do antibiograma	27
3.1.2.1	<i>Preparo das soluções e concentrações dos antibióticos</i>	27
3.1.2.2	<i>Preparo do inóculo</i>	27
3.1.2.3	<i>Antibiograma</i>	28
3.2	EXPERIMENTO II: resposta da interação entre planta, bactéria e antibiótico.....	29
3.2.1	Preparo da etapa <i>in vitro</i>	29
3.2.1.1	<i>Preparo do meio de cultivo</i>	30
3.2.1.2	<i>Padronização do inóculo</i>	31
3.2.1.3	<i>Experimento <i>in vitro</i></i>	31
4	RESULTADOS	33
4.1	EXPERIMENTO I: isolamento, testes de sensibilidade e controle.....	33
4.2	EXPERIMENTO II: resposta da interação entre planta, bactéria e antibiótico.....	38
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	47

REFERÊNCIAS.....	48
-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

O setor florestal no Brasil, segundo dados da Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ, 2021), chegou à marca de 7,47 milhões de hectares de áreas plantadas com eucalipto, possuindo grande importância ao desenvolvimento nos locais de cultivo, promovendo mudanças econômicas, novas oportunidades de empregos diretos e indiretos, principalmente gerando renda para famílias (PALACIO; ANDRES, 2021).

Pertencente à família Myrtaceae, originárias da Austrália, Indonésia e de Timor, existem variadas espécies, subespécies e híbridos conhecidos do gênero *Eucalyptus* que possuem alto potencial de produtividade nas zonas tropicais, grande plasticidade de adaptação a ambientes heterogêneos e podem ser utilizadas para diversas finalidades dependendo das propriedades físicas e químicas da madeira (PIRES *et al.*, 1981; RODRIGUES *et al.*, 1986; DRUMOND *et al.*, 1998; JUNIOR, 2002).

O método tradicional de propagação das espécies de eucalipto, apesar de proporcionar inúmeros benefícios, como a conservação de características genotípicas, com a passagem de geração para geração dos seus componentes genéticos aditivos e não aditivos da planta; podem ocasionar a redução da base genética dos plantios, a não ocorrência de ganhos genéticos e principalmente a redução da estimulação do enraizamento em algumas espécies ou clones (FERRARI *et al.*, 2004). Nesse aspecto, a micropropagação do eucalipto torna-se ferramenta importante para a necessidade de clonar espécies ou híbridos que tenham altas taxas de crescimento, tolerância a altas temperaturas, salinidade, resistência a pragas e doenças, além de poder obter o rejuvenescimento de tecidos provindos de matrizes (DUTRA *et al.*, 2009).

A micropropagação é uma ferramenta da biotecnologia vegetal que se baseia na totipotência das células vegetais, as quais regridem ao seu estado indiferenciado, se multiplicam e/ou redefinem nova via metabólica para gerar novas células, tecidos (SOUZA *et al.*, 2018) e até mesmo reproduzir genótipos superiores por meio de pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) isolados de um organismo e cultivados em um meio nutritivo (GATTI *et al.*, 2016). Esta técnica é a aplicação mais prática e de maior impacto, sendo que podemos obter dentro deste cultivo a limpeza clonal e aceleração dos métodos convencionais de propagação, multiplicação de espécies de difícil propagação, rejuvenescimento de espécies adultas, conservação de germoplasma, bem como utilizar essas técnicas nos programas de melhoramento

genético (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; LIMA; MORAES, 2006; PALMA *et al.*, 2011).

Durante o processo de micropropagação as contaminações ou manifestações de bactérias, fungos e leveduras são um dos seus principais entraves, pois o ambiente de cultivo é favorável para o desenvolvimento destes microrganismos, que acabam competindo com o material vegetal por nutrientes minerais, vitaminas e carboidratos do meio de cultura, interferindo assim na multiplicação, alongamento ou enraizamento dos cultivos (DANTAS *et al.*, 2002; KLOEPPER *et al.*, 1989).

A contaminação bacteriana em especial, uma das mais frequentes na micropropagação, pode ocorrer por vários fatores, como oriundas dos próprios tecidos dos explantes, ambientes laboratoriais sem limpeza adequada, uso de instrumentos e materiais não esterilizados e a manipulação incorreta ou descuidada do material vegetal em capela de fluxo laminar (LATA *et al.*, 2006; THOMAS; ASWATH, 2014). Além disso, a intensidade de contaminação pode variar de acordo com o tipo e origem do explante, época do ano e das condições ambientais na hora da retirada do propágulo da planta-mãe, sendo mais intensificada quando em espécies tropicais, devido a presença de uma complexa comunidade biológica, chamada de microbioma (KNEIFEL; LEONHARDT, 1992; DUTRA *et al.*, 2009; JIMTHA *et al.*, 2014).

De modo a evitar contaminações *in vitro* são utilizados protocolos de desinfestação no estabelecimento de diferentes culturas, estes são de extrema importância a fim de obter um material vegetal axênico ao longo de todo o cultivo (ESPOSITO-POLESI *et al.*, 2013, 2015, 2017). Visando controlar bactérias durante o ciclo *in vitro* do material vegetal, é realizada a utilização de alguns antibióticos para o controle de microrganismos contaminantes, podendo estes serem incorporados ao meio de cultivo após sua autoclavagem, sólido, semi-líquido ou líquido sob agitação durante minutos, horas ou dias (LEIFERT *et al.*, 1991).

Em bactérias, os ribossomos, parede celular, membrana plasmática, enzimas envolvidas na biossíntese, elementos de replicação e transcrição de DNA são importantes alvos dos antibióticos que são classificados dependendo da sua estrutura molecular, mecanismos de ação e espectro de vida, apresentando toxicidade seletiva, inibindo ou matando o patógeno sem afetar o hospedeiro. Dentro dos fármacos antimicrobianos de ocorrência natural e bastante utilizados na cultura de tecidos temos o grupo dos antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclinas (MADIGAN *et al.*, 2016).

Para se obter sucesso no uso destes antibióticos deve-se em uma etapa anterior selecionar, isolar, caracterizar e realizar testes de sensibilidade das bactérias por meio de antibiogramas de disco-difusão em ágar (BAUER *et al.*, 1966), concentração mínima inibitória (CMI), microdiluição em caldo, diluição em ágar, entre outros, visto que o uso de antibióticos inadequadamente pode causar fitotoxicidade ao tecido vegetal e se tornar uma técnica onerosa pelo alto custo dos antimicrobianos. Desta maneira, os antibióticos contribuem para que o destino de materiais de alto valor genético e comercial que foram contaminados possa vir a ser outro, que não o descarte (LEIFERT *et al.*, 1991; TENG; NICHOLSON, 1997; CLSI, 2019; ESPOSITO-POLESI, 2011; ESPOSITO-POLESI *et al.*, 2015, 2017).

O controle de microrganismos por meio de antibióticos no cultivo *in vitro* de eucalipto estão sendo cada vez mais estudados, tanto no desenvolvimento de protocolos quanto nos estudos relacionados à comunidade bacteriana existente durante seu cultivo (ESPOSITO-POLESI *et al.*, 2015; LEONE, 2013; LEONE *et al.*, 2019; ESPOSITO-POLESI, 2020). Alguns estudos recentes mostram que o antibiótico Timentin quando adicionado ao meio de cultura apresenta o controle de manifestações bacterianas no processo de micropropagação de eucalipto (LEONE, 2013; LEONE *et al.* 2019).

Devido a eliminação desses microrganismos serem de fundamental importância na propagação *in vitro* de culturas de interesse econômico e o uso de antibióticos ser uma alternativa viável para evitar o descarte das mesmas, este trabalho teve como objetivo isolar, realizar testes de sensibilidade e controle de duas bactérias (B6 e B11) com ocorrência frequente no cultivo *in vitro* de um híbrido comercial de eucalipto aos antibióticos ampicilina (Ampicillin sodium salt) e tetraciclina (Tetracycline hydrochloride), a fim de entender qual o antibiótico e a concentração mais eficaz para o controle destas bactérias durante o cultivo *in vitro* da cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROPROPAGAÇÃO

A propagação *in vitro* é uma ferramenta da biotecnologia vegetal que se refere às técnicas de cultura em meio nutritivo, em condições assépticas, de células, tecidos ou órgãos de plantas, sob condições controladas de luminosidade e temperatura

capaz de reproduzir genótipos superiores (GATTI *et al.*, 2016). A partir da propagação de células ou tecidos de um único material vegetal, pode-se obter uma nova planta geneticamente idêntica à planta-mãe (TORRES *et al.*, 2000; DAVEY e ANTHONY, 2010; BRONDANI *et al.*, 2012).

Durante o processo de micropropagação inclui-se a seleção, desinfestação, multiplicação, alongamento e enraizamento dos propágulos após sucessivos subcultivos (DUTRA *et al.*, 2009). Com isto, é um método de propagação vegetativa assexuado amplamente estudado em diferentes espécies vegetais a fim de se obter material propagativo em quantidade e qualidade (COSTA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Considerada uma tecnologia produtiva, a micropropagação apresenta vantagens como alta taxa de multiplicação, rapidez do processo, baixo custo a longo prazo, espaço reduzido, controle ambiental e redução de tempo (GUERRA *et al.*, 2016).

Segundo Paz *et al.* (2012) e Wiecheteck (1990), alguns clones de eucalipto possuem alta produtividade, porém são de difícil propagação. Em contraponto, o cruzamento para produzir um grande número de híbridos é difícil, e a seleção de genótipos para características importantes requerem muitos anos, tornando o melhoramento demorado e trabalhoso, além das dificuldades na indução do enraizamento. A fim de propagar materiais genéticos para atender a demanda da produção florestal, desenvolver abordagens biotecnológicas selecionando genótipos com características de alta aptidão são essenciais para alcançar maior produtividade em sistemas de plantio, visto que além dos programas de melhoramento genético de plantas, a micropropagação tem sido utilizada para reprodução, limpeza clonal, conservação de germoplasma e para rejuvenescimento de matrizes adultas com idade elevada (CARVALHO *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

2.2 MEIOS DE CULTURA

O primeiro meio de cultura desenvolvido para plantas foi o de White (1951). Por outro lado, a primeira aplicação comercial da micropropagação foi realizada por Morel (1960) em orquídeas a partir de ápices caulinares. Dez anos depois da difusão do meio de cultivo para plantas, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas e é até hoje um dos mais utilizados. Um tempo depois, o meio WPM - Wood Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1981) foi

desenvolvido para um grupo específico de explantes com intenção de sempre ter à disposição plantas saudáveis e axênicas (CABRAL *et al.*, 2003).

Em relação à composição do meio de cultivo contendo macro, micronutrientes, carboidratos, vitaminas e em alguns casos reguladores de crescimento, podem variar de semi-sólido a líquido, de acordo com o protocolo para a espécie propagada (GUERRA *et al.*, 2016). Em geral, vários estudos também apontam que o meio MS, é comumente utilizado completamente ou modificado com metade da concentração de sais (½MS), a fim de otimizar o desenvolvimento de explantes e reduzir custos (VILLA *et al.*, 2006; SANTOS, 2007; VILLA *et al.*, 2008; AYUB *et al.*, 2010; LEE e WETZSTEIN, 1990; SUDARSONO; GOLDY, 1991). O meio WPM, com composição mais diluída de nutrientes, é amplamente utilizado no cultivo *in vitro*, sendo indicado para determinados grupos de plantas como, arbustos e árvores lenhosas (TORRES *et al.*, 1998; MELO *et al.*, 1999).

2.3 CONTAMINAÇÃO E MANIFESTAÇÃO MICROBIANAS

Na cultura de tecidos, é necessário controlar e prevenir os microrganismos que crescem no meio de cultivo pelo fato da umidade, temperatura e pH do mesmo fornecerem um ambiente propício ao seu avanço, além de que podem interferir no desenvolvimento do explante se tornando uma das principais causas da perda e descarte de material vegetal (DANTAS *et al.*, 2002; ESPOSITO-POLESI *et al.*, 2015). No caso de bactérias, às vezes permanecem ocultas ou adormecidas na endosfera do material vegetal e passam despercebidas (THOMAS; PRAKASH, 2004; LEIFERT; CASSELLS, 2001). A contaminação normalmente pode ocorrer quando não se estabeleceu um protocolo de assepsia adequado aquela espécie, ou por falhas na assepsia de ferramentas, meio de cultivo, operador, manipulação dentro da câmara de fluxo laminar, etc. Nesse contexto, a proliferação microbiana é um importante ponto de controle e cuidado na cultura de tecidos (THOMAS; ASWATH, 2014).

Os danos causados por este tipo de contaminação quando não são controlados, passam a competir pelos nutrientes presente no meio de cultivo, alterando o desenvolvimento normal e multiplicação do material vegetal, além de que alguns microrganismos produzem toxinas que interferem na taxa de crescimento ou até morte da planta (RAZDAN, 2003; PEREIRA *et al.*, 2014). Outro fator que pode estar relacionado às constantes contaminações está ligado a origem e estado

nutricional das plantas doadoras, que dependendo se são mantidas em ambientes protegidos, a desinfestação dentro do laboratório pode ser mais eficiente quando comparamos com materiais cultivados em campo (DUTRA *et al.*, 2009).

Quando falamos sobre contaminação e manifestação microbiana, existem algumas controversas. Assim como todos os seres vivos, as plantas possuem seu próprio microbioma e abrigam uma grande quantidade de microorganismos, e dependendo da região da planta em que estes microorganismos colonizam são chamados de epifíticos ou endofíticos (RYAN *et al.*, 2008; IKEDA *et al.*, 2010; PINI *et al.*, 2012; JIMTHA *et al.*, 2014). Denominamos contaminação, quando bactérias epifíticas crescem no meio de cultivo de maneira rápida, dias ou horas após a inoculação do material vegetal, que muitas vezes ocorre por falhas no processo de assepsia (PANICKER *et al.*, 2007). Por essa razão, o processo de desinfestação é de extrema importância a fim de eliminar os microorganismos epifíticos que podem comprometer o desenvolvimento do material vegetal *in vitro* (DUTRA *et al.*, 2009).

Por outro lado, quando as bactérias endofíticas crescem no meio de cultivo, denominamos manifestação, por surgirem de maneira lenta ou até mesmo depois de anos e vários subcultivos da introdução do material (ABREU-TARAZI *et al.*, 2010; ESPOSITO-POLESI *et al.*, 2015, 2017). Após algum estresse de qualquer natureza (temperatura, pH, luminosidade, composição do meio, etc.) os denominados microorganismos endofitos latentes se manifestam e dependendo da origem, material genético e tipo de espécie propagada haverá uma resposta em relação à condição estressante que pode resultar na sobrevivência ou morte do explante (BUCHANAN *et al.*, 2000). Porém, vale ressaltar que nem sempre estas manifestações endofíticas podem desenvolver alterações na fisiologia da planta (PIOTTO, 2013).

Contudo, para minimizar os efeitos colaterais dos contaminantes e controlá-los, diferentes protocolos de desinfestação durante a introdução dos explantes *in vitro* e o tratamento nas etapas seguintes como a manutenção com antimicrobianos vêm sendo utilizados para melhor efetividade dos cultivos (ESPOSITO-POLESI, 2011).

2.4 ANTIMICROBIANOS DE OCORRÊNCIA NATURAL

Segundo Madigan *et al.* (2016) os fármacos antimicrobianos são compostos capazes de matar ou controlar o crescimento de microorganismos. A grande maioria destes fármacos possuem toxicidade seletiva, com o intuito de inibir ou matar o

patógeno sem causar efeitos colaterais ao hospedeiro. São classificados de acordo com sua estrutura molecular, mecanismo de ação e espectro de atividade, se dividindo em dois grandes grupos, fármacos antimicrobianos sintéticos e antibióticos. Os antibióticos ou também denominados fármacos antimicrobianos de ocorrência natural, são agentes microbianos produzidos pelos próprios microrganismos, variando de fungos e bactérias pertencentes ao domínio *Eukarya*.

Estes fármacos podem variar de pequeno espectro, quando são eficazes contra um dos grupos de bactérias, à amplo espectro, quando são eficazes contra ambos os grupos. Estas substâncias chamadas de antimicrobianas nocivas para as bactérias podem matá-las (ação biocida) ou inibir seu crescimento (ação bacteriostática) (FOX, 2006).

Os antibióticos β -lactâmicos são compostos inibidores da síntese de parede celular, possuindo o anel β -lactâmico como uma das suas principais características. Dentre os principais antibióticos deste grupo temos: penicilina, ampicilina, ceftriaxona, timentin, carbenicilina e cefotaxima. São em geral bactericidas inibindo bactérias Gram-positivas (penicilina) e Gram-negativas (ampicilina e carbenicilina) (MADIGAN *et al.*, 2016; TAMBARUSSI, 2009; HOLFORD; NEWBURY, 1992).

Outro grupo de antimicrobianos são as tetraciclina. Tem como sua estrutura básica um sistema de anel naftaceno, inibidora da síntese de proteínas, interferindo na subunidade ribossomal 30S, que consiste em um antibiótico de amplo espectro de ação bacteriostática. Nestes, junto aos β -lactâmicos são os dois grupos mais importantes de antibióticos na medicina (MADIGAN *et al.*, 2016).

É válido lembrar que os antibióticos laboratoriais se diferem dos biocidas ou antimicrobianos comerciais por serem geralmente mais específicos e, portanto, mais propensos a causar resistência bacteriana quando utilizado incorretamente (BALLANTYNE; JORDAN, 2004). Estes antibióticos estão sendo cada vez mais aplicados para prevenção ou eliminação dos contaminantes no cultivo *in vitro* de plantas, e são estudados tanto sua composição química quanto a interação destes fármacos quando em contato com o material vegetal de diferentes culturas, tentando manter sua utilidade como agentes antimicrobianos evitando efeitos negativos no cultivo (PALÚ *et al.*, 2011; LEONE, 2013).

2.5 USO DE ANTIBIÓTICOS NA MICROPROPAGAÇÃO

Como relatado anteriormente, ter como base da micropropagação a obtenção de plantas saudáveis e axênicas durante o cultivo *in vitro* é um pré-requisito. E quando as contaminações ou manifestações bacterianas epifíticas ou endofíticas surgem durante este tipo de cultivo podem ser extremamente prejudiciais, acarretando na redução das taxas de crescimento, reprodução e enraizamento, assim como dependendo da situação, pode levar à morte dos explantes. (CABRAL *et al.*, 2003; ESPOSITO-POLESI, 2011; FANG; HSU, 2012).

Considerando sua relevância nas indústrias médica, veterinária e farmacêutica, desde a década de 1950, pesquisas têm sido realizadas estudando o uso de antibióticos contra bactérias em plantas, tentando usar o potencial bactericida ou bacteriostático dos antibióticos para evitar as contaminações ou manifestações de algumas bactérias *in vitro*, desde o desenvolvimento de protocolos de assepsia à tratamentos curativos, podendo os mesmos serem adicionados ao meio de cultura ou submetendo os explantes a banhos sob agitação (ANDERSON; GOTTLIEB, 1952; LEIFERT *et al.*, 1991; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PEREIRA *et al.*, 2003 ; KULKARNI *et al.*, 2007). Ainda assim, testes preliminares de sensibilidade dos antibióticos as bactérias estudadas são de extrema importância para evitar efeitos negativos como desenvolvimento de resistência, fitotoxicidade e redução da capacidade de regeneração do material (TENG; NICHOLSON, 1997; SILVA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A fim de verificar qual antibiótico e a concentração mais eficaz para o controle de duas bactérias encontradas durante o cultivo *in vitro* de explantes de eucalipto, nos ensaios realizados no laboratório de bioprocessos e micropropagação do Instituto SENAI de Inovação Biomassa, localizado no município de Três Lagoas (MS), foram realizados dois experimentos:

3.1 EXPERIMENTO I: isolamento, testes de sensibilidade e controle

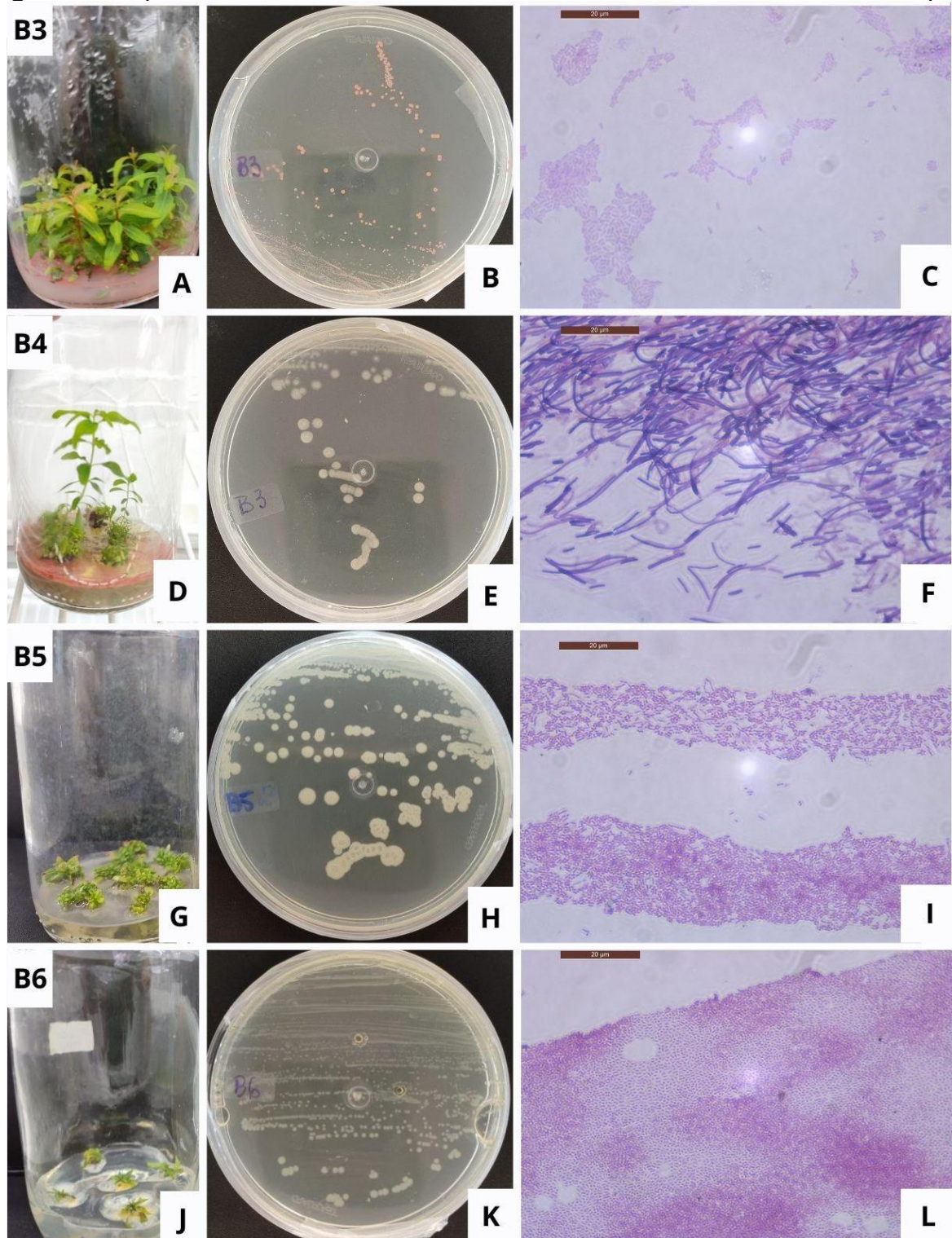
3.1.1 Caracterização dos microrganismos

Com o intuito de conhecer e selecionar os microrganismos presentes no cultivo *in vitro* de um híbrido comercial de eucalipto, foram selecionadas dez cepas visualmente diferentes. Para isto, foi realizado o teste de coloração de Gram (GRAM, 1884) com o intuito de diferenciar as bactérias entre Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com a sua estrutura molecular. Assim, de acordo com o protocolo para preparação das lâminas foi utilizado o kit para realização da Coloração de Gram desenvolvido pelo laboratório LABORCLIN (2018).

Uma vez que se trabalhava com amostras diretas, esta foi espalhada no centro de uma lâmina limpa e desengordurada, em seguida foi fixada passando-a pela chama de um bico de Bunsen, deixando esfriar. Para a coloração, o material na lâmina foi primeiramente coberto com solução de violeta genciana por um minuto. Em seguida, a lâmina foi coberta com o lugol fraco por um minuto. Posteriormente, o lugol foi removido da lâmina gotejando sobre a solução descolorante até que o líquido se tornasse incolor (em torno de 15 segundos), por fim a lâmina foi coberta com solução de fucsina para Gram por 30 a 60 segundos. Após as etapas anteriores realizadas, lavou-se a lâmina com água corrente, deixando secar na posição vertical.

A partir da análise no microscópio óptico Leica DM4 B, utilizando a objetiva de imersão (1000x de aumento total), com auxílio do óleo de imersão Type F Immersion liquid, foi possível diferenciar os microrganismos. As células microbianas que apresentaram a coloração púrpura foram consideradas Gram-positivas ao passo que as coradas em tonalidade avermelhada foram consideradas Gram-negativas, conforme as figuras 1, 2, 3 e tabela 1 com a caracterização dos microrganismos isolados.

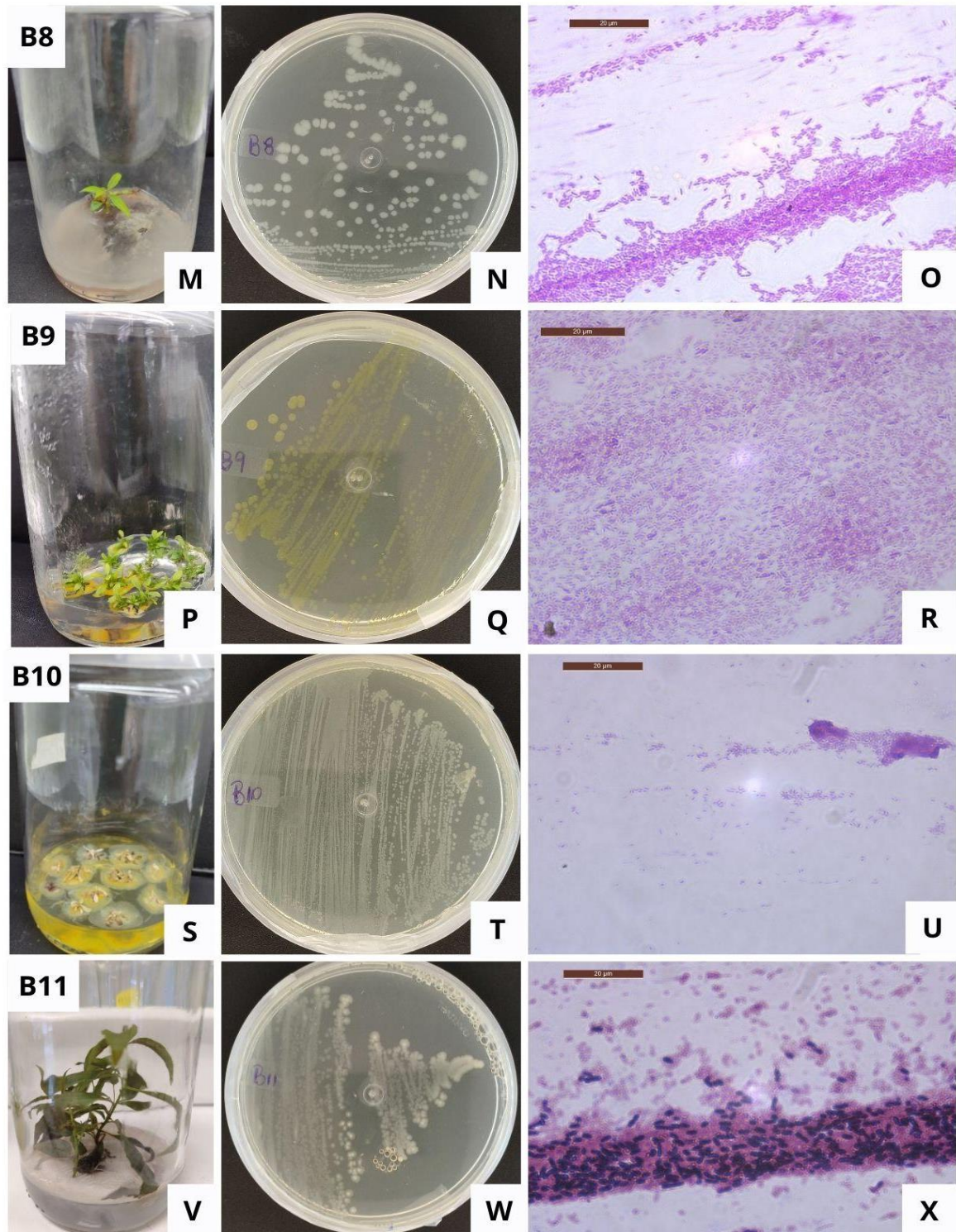
Figura 1 - Cepas selecionadas no cultivo *in vitro* de híbridos comerciais de eucalipto.



B3: bactéria B3 no cultivo *in vitro* de eucalipto (A), bactéria B3 estriada em meio de cultivo Nutrient Agar ISO (B), bactéria B3 em microscopia de imersão 20 µm (C). B4: bactéria B4 no cultivo *in vitro* de eucalipto (D), bactéria B4 estriada em meio de cultivo Nutrient Agar ISO (E), bactéria B4 em microscopia de imersão 20 µm (F). B5: bactéria B5 no cultivo *in vitro* de eucalipto (G), bactéria B5 estriada em meio de cultivo Nutrient Agar ISO (H), bactéria B5 em microscopia de imersão 20 µm (I). B6: bactéria B6 no cultivo *in vitro* de eucalipto (J), bactéria B6 estriada em meio de cultivo Nutrient Agar ISO (K), bactéria B6 em microscopia de imersão 20 µm (L).

Fonte: Próprio autor.

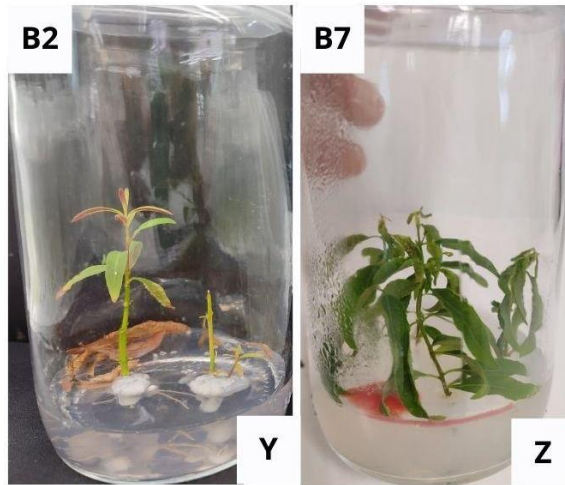
Figura 2 - Cepas selecionadas no cultivo *in vitro* de híbridos comerciais de eucalipto.



B8: bactéria B8 no cultivo *in vitro* de eucalipto (M), bactéria B8 estriada em meio de cultivo Nutrient Agar ISO (N), bactéria B8 em microscopia de imersão 20 µm (O). B9: bactéria B9 no cultivo *in vitro* de eucalipto (P), bactéria B9 estriada em meio de cultivo Nutrient Agar ISO (Q), bactéria B9 em microscopia de imersão 20 µm (R). B10: bactéria B10 no cultivo *in vitro* de eucalipto (S), bactéria B10 estriada em meio de cultivo Nutrient Agar ISO (T), bactéria B10 em microscopia de imersão 20 µm (U). B11: bactéria B11 no cultivo *in vitro* de eucalipto (V), bactéria B11 estriada em meio de cultivo Nutrient Agar ISO (W), bactéria B11 em microscopia de imersão 20 µm (X).

Fonte: Próprio autor.

Figura 3 - Cepas selecionadas no cultivo *in vitro* de híbridos comerciais de eucalipto não caracterizadas como bactérias.



B2: levedura B2 no cultivo *in vitro* de eucalipto (Y). B7: fungo filamentosso B7 no cultivo *in vitro* de eucalipto (Z).

Fonte: Próprio autor.

Quadro 1: Caracterização dos microrganismos isolados obtidos do cultivo *in vitro* de híbridos comerciais de eucalipto.

Características	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11
Cor ⁽¹⁾	x	Rosa	Branca	Creme	Creme	x	Branca	Amarela	Creme	Branca
Forma ⁽¹⁾	x	Circular	Circular	Circular	Circular	x	Circular/ Irregular	Circular	Circular	Irregular
Superfície ⁽¹⁾	x	Lisa	Rugosa/ Opaca	Rugosa/ Opaca	Lisa	x	Rugosa/ Opaca	Lisa/ Brilhante	Lisa	Rugosa/ Opaca
Tamanho da colônia	x	Pequena	Média	Média	Pequena	x	Grande	Grande	Pequena	Grande
Morfologia celular	x	Bastonete	Bastonete	Bastonete	Bastonete	x	Bastonete	Bastonete	Bastonete	Bastonete
Gram	x	-	+	-	-	x	-	-	-	+
Obs.	Levedura					Fungo filamentoso				

⁽¹⁾ Após 24 horas de cultivo em meio de cultura Nutrient Agar ISO a 28 °C em estufa bacteriológica.

Fonte: Próprio autor.

3.1.2 Preparo do antibiograma

Para averiguar a sensibilidade das bactérias selecionadas aos antibióticos ampicilina e tetraciclina utilizou-se a metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966) através do antibiograma por disco-difusão em ágar.

3.1.2.1 Preparo das soluções e concentrações dos antibióticos

Para o preparo da solução dos antibióticos ampicilina (Ampicillin sodium salt) e tetraciclina (Tetracycline hydrochloride), ambos da marca Sigma-Aldrich, primeiramente foram pesados 10 mg de cada um em balança analítica Shimadzu ATY 224. Após a pesagem, em câmara de fluxo laminar o material foi dissolvido em 10 mL de água destilada esterilizada com auxílio de uma micropipeta, na relação de 1mg/1mL, depois vertidos em um tubo falcon de 50 mL e agitados em vórtex modelo Q220, a fim de se obter uma solução homogênea.

Com as soluções preparadas, os tratamentos foram distribuídos em microtubos de 1,5 mL da seguinte maneira: T0 (0 mg L⁻¹); T1 (100 mg L⁻¹); T2 (200 mg L⁻¹); T3 (300 mg L⁻¹); T4 (400 mg L⁻¹) e T5 (500 mg L⁻¹) para os dois antibióticos escolhidos. Posteriormente, as diferentes concentrações dos antibióticos foram impregnadas em discos de papel Wathman nº1 (0,6 cm de diâmetro).

3.1.2.2 Preparo do inóculo

Para o preparo da suspensão bacteriana foram incubadas inicialmente duas bactérias denominadas (B6 e B11) observadas com maior frequência no cultivo *in vitro* de híbridos comerciais de eucalipto. Foram repicadas em tubo de ensaio até o crescimento de suas colônias em meio de cultivo Nutrient Agar ISO inclinado. Após 24 horas em estufa bacteriológica a 28°C, foi preparado o inóculo, fazendo uma suspensão direta com 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) no tubo de ensaio com auxílio de uma micropipeta, em câmara de fluxo laminar. Em sequência, foi feita a raspagem dos microrganismos na superfície do meio de cultivo com auxílio de uma alça bacteriológica estéril, e a solução foi vertida em um tubo falcon de 50 mL e agitado no vórtex modelo Q220, para se obter uma suspensão homogênea.

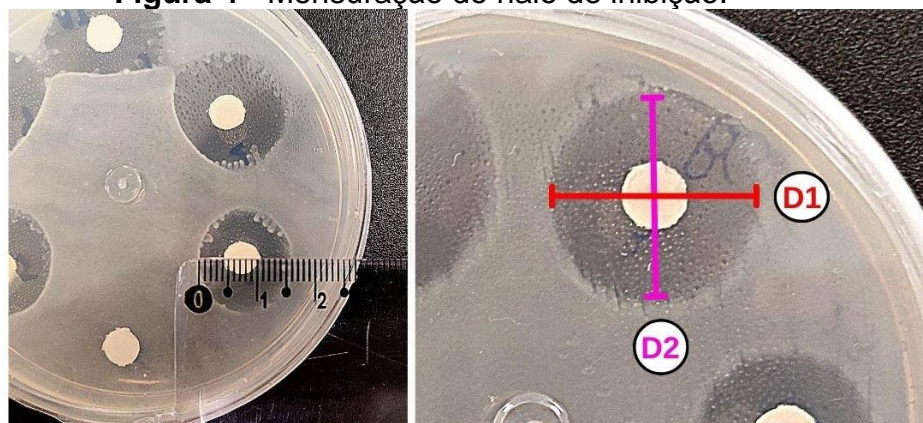
3.1.2.3 Antibiograma

Com as etapas anteriores realizadas, a suspensão das bactérias preparadas no tópico 3.1.2.2 foram inoculadas em placas de Petri descartáveis de 90x15 mm contendo meio de cultivo Nutrient Agar ISO, esfregando-se um bastonete com ponta de algodão em toda a superfície estéril do ágar. Este procedimento foi realizado outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se o bastonete na margem da placa. A tampa foi deixada entreaberta de três a cinco minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de umidade seja absorvido antes de se aplicar os discos.

Em sequência, com auxílio de uma pinça previamente esterilizada, seis discos de papel antimicrobianos, sendo um para cada tratamento, foram colocados equidistantes por três centímetros na superfície da placa semeada, e pressionados de maneira que houvesse contato completo com a superfície do ágar.

Após a montagem do experimento, as placas foram mantidas em estufa bacteriológica à temperatura de 28 °C e, após 24 horas mediu-se o comprimento do halo de inibição com o auxílio de uma régua nos dois sentidos da circunferência a fim de se obter uma média (figura 4).

Figura 4 - Mensuração do halo de inibição.

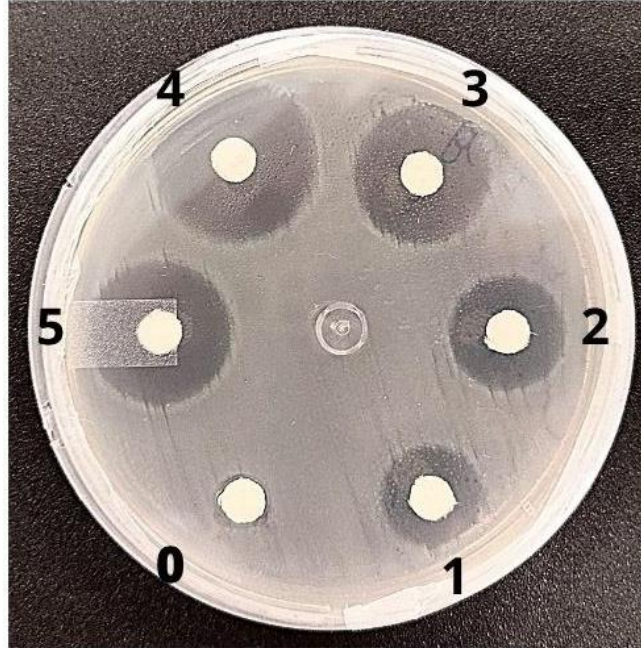


D1 (diâmetro um) e D2 (diâmetro dois).
Fonte: Próprio autor.

O experimento foi realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 2 x 6, sendo duas cepas (B6 e B11), dois antibióticos

(ampicilina e tetraciclina) e seis concentrações diferentes dos antibióticos (0; 100; 200; 300; 400 e 500 mg L⁻¹) e cada tratamento foi constituído por cinco discos de papel, ou seja, cinco repetições, como mostrado na figura 5.

Figura 5 - Disposição dos tratamentos no antibiograma por disco-difusão em ágar.



Fonte: Próprio autor.

Os dados foram analisados através do software SISVAR (FERREIRA, 2019), sendo realizada a análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de F a 5% de probabilidade para detectar as diferenças estatísticas entre os fatores. Para os fatores com seis níveis (variáveis quantitativas) foi realizada a análise de variância na regressão, sendo o modelo polinomial selecionado com base no *p*-valor significativo (0,05) dos coeficientes de determinação (R^2) superiores.

3.2 EXPERIMENTO II: Resposta da interação entre planta, bactéria e antibiótico

3.2.1 Preparo da etapa *in vitro*

A partir dos resultados obtidos no experimento I, as concentrações dos antibióticos que resultaram em maior significância na análise estatística foram utilizadas neste experimento II.

3.2.1.1 Preparo do meio de cultivo

Foi preparado meio de cultura com sais WPM (tabela 2), acrescido de 500 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 50 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 15 g L⁻¹ de sacarose e 2,7 g L⁻¹ de phytigel, com pH do meio ajustado em 5,8, autoclavado a 121 °C (1 kg cm⁻²) durante 20 minutos.

Após a autoclavagem, com o meio de cultura ainda morno, foi incorporado em câmara de fluxo laminar o antibiótico tetraciclina em duas concentrações: 400 mg L⁻¹ para a B6 e 500 mg L⁻¹ para B11, em seguida homogeneizado e vertido 10 mL em tubos de ensaio autoclavados.

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo sais WPM.

Nutriente	WPM (mg L⁻¹)
Macronutrientes	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556,000
NH ₄ NO ₃	400,000
KNO ₃	0
CaCl ₂ .2H ₂ O	96,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000
K ₂ SO ₄	990,000
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300
H ₂ BO ₃	6,200
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600
KI	0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,250
CoCl ₂ .6H ₂ O	0
Ferro – EDTA	
Na ₂ EDTA	37,250
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,850
Vitaminas	
Tiamina.HCl	1,000
Ácido Nicotínico	0,500
Piridoxina – HCl	0,500
Glicina	2,000
Mio-inositol	100,000

Dados adaptados de Xavier *et al.* (2009).

3.2.1.2 Padronização do inóculo

As bactérias em questão foram estriadas em tubo de ensaio com meio de cultivo Nutrient Agar ISO inclinado. Após 24 horas em estufa bacteriológica a 28°C foi preparado o inóculo fazendo uma suspensão direta com 4mL de água destilada esterilizada acrescido no tubo de ensaio com auxílio de uma micropipeta, em câmara de fluxo laminar. Com isto foi realizada a raspagem dos microrganismos na superfície do meio com auxílio de uma alça bacteriológica estéril, e a solução foi vertida em um tubo falcon de 13 mL e agitado no vórtex modelo Q220, para obter uma suspensão homogênea.

Para padronização do inóculo, esta suspensão foi analisada em espectrofotômetro GEHAKA VIS-380G UV-Visível em comprimento de onda de 600 nm. Após a primeira leitura foi realizada uma diluição da amostra de 1:3, buscando uma absorbância entre 0,5 e 0,6 para que fosse atingido a quantidade de células 10^8 UFC/mL. Com isso, na segunda leitura obtivemos absorbância de 0,534 e 0,634 de densidade óptica para a B6 e B11 respectivamente, resultando assim em uma solução padronizada.

3.2.1.3 Experimento *in vitro*

Após as etapas realizadas acima, em câmara de fluxo laminar, explantes de um híbrido comercial de eucalipto axênicos já estabelecidos *in vitro* durante a fase de multiplicação, tiveram sua base mergulhada em solução padronizada do inóculo por cinco segundos e posteriormente foram introduzidos nos tubos de ensaio contendo meio de cultivo WPM com antibiótico.

Os explantes foram então mantidos em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 28 dias.

O experimento foi conduzido em DIC, sendo observadas as respostas ao longo do tempo dos ensaios: T1 (B6 + 400 mg L^{-1} tetraciclina) e T2 (B11 + 500 mg L^{-1} tetraciclina). A unidade experimental foi constituída de 20 tubos de ensaio contendo um explante em cada tubo.

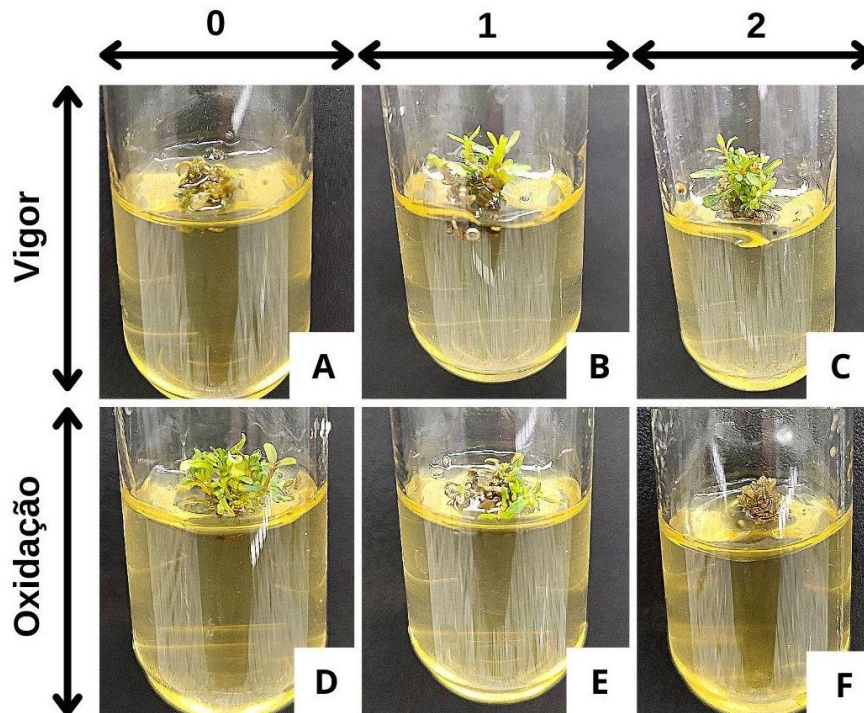
Aos 14 e 28 dias após a inoculação (DAI) foram avaliados por meio de atribuição de notas, segundo método adotado por Esposito-Polesi (2011), os parâmetros de vigor e manifestação bacteriana. Além disso, a oxidação dos explantes foi avaliada indiretamente por meio da avaliação do escurecimento do meio de cultura ou da planta como proposto por Oliveira *et al.* (2016). Os parâmetros utilizados como referência para as atribuições de notas estão apresentados na tabela 3 e figura 6.

Tabela 2 - Variáveis e parâmetros utilizados para atribuição de notas.

Variáveis	Pontuação atribuída para os parâmetros adotados
Vigor dos explantes	0 - Nulo - senescência ou morte do explante
	1 - Médio - crescimento reduzido do explante
	2 - Alto - crescimento ativo do explante
Manifestação bacteriana	0 - Nulo - manifestação ausente
	1 - Médio - manifestação moderada
	2 - Alto - manifestação intensa
Oxidação dos explantes	0 - Nulo - sem oxidação do explante
	1 - Médio - reduzida oxidação do explante
	2 - Alto - alta oxidação do explante

Fonte: Próprio autor.

Figura 6 - Escala de notas para variável vigor e oxidação dos explantes.



Senescência ou morte do explante (A), crescimento reduzido do explante (B), crescimento ativo do explante (C), sem oxidação do explante (D), reduzida oxidação do explante (E) e alta oxidação do explante (F).

Fonte: Próprio autor.

Os dados obtidos neste experimento II foram analisados através do software SISVAR (FERREIRA, 2019), sendo realizada a análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para detectar as diferenças estatísticas entre o fator avaliado (dias).

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO I: isolamento, testes de sensibilidade e controle

A partir da análise de variância, os fatores isolados (antibiótico e concentração), assim como a interação entre eles apresentaram resultados significativos ($p < 0,01$) (tabela 4). Isso evidencia que o uso dos antibióticos ampicilina e tetraciclina nas concentrações utilizadas promoveram efeito nas bactérias estudadas.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância e médias dos tratamentos para os fatores bactérias, antibióticos, concentrações e suas interações no controle bacteriano no cultivo *in vitro* de hídridos de eucalipto, Três Lagoas, Brasil.

FV	DM		
	GL	QM	p-valor
Bactérias	1	0,0013	0,79 ^{ns}
Antibióticos	1	67,3500	0,00 ^{**}
Concentrações	5	3,1297	0,00 ^{**}
Bactérias*Antibiótico	1	0,0013	0,79 ^{ns}
Bactérias*Concentrações	5	0,0330	0,14 ^{ns}
Antibióticos*Concentrações	5	3,1297	0,00 ^{**}
Bactérias*Antibióticos*Concentrações	5	0,0330	0,14 ^{ns}
Média Geral		0,7491	
CV (%)		18,70	
Bactérias		Médias	
B6		0,7458	
B11		0,7525	
Antibióticos		Médias	
Ampicilina		0,0000	
Tetraciclina		1,4983	
Concentrações (mg L⁻¹)		Médias	
0		0,0000	
100		0,6550	
200		0,8125	
300		0,9500	
400		1,0500	
500		1,0275	

** e ^{ns}, significativo a 1% e não-significativo, respectivamente, pelo Teste F.

Fonte: Próprio autor.

Com base no teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro e nas médias observadas, o antibiótico tetraciclina apresentou o melhor desempenho em comparação a ampicilina (tabela 5), pois obtivemos o crescimento do halo de inibição nos tratamentos os quais discos de papel foram impregnados com o antibiótico tetraciclina, por outro lado, aqueles impregnados com o antibiótico ampicilina não apresentaram crescimento do halo, ou seja, não ocorreu a inibição (figura 7).

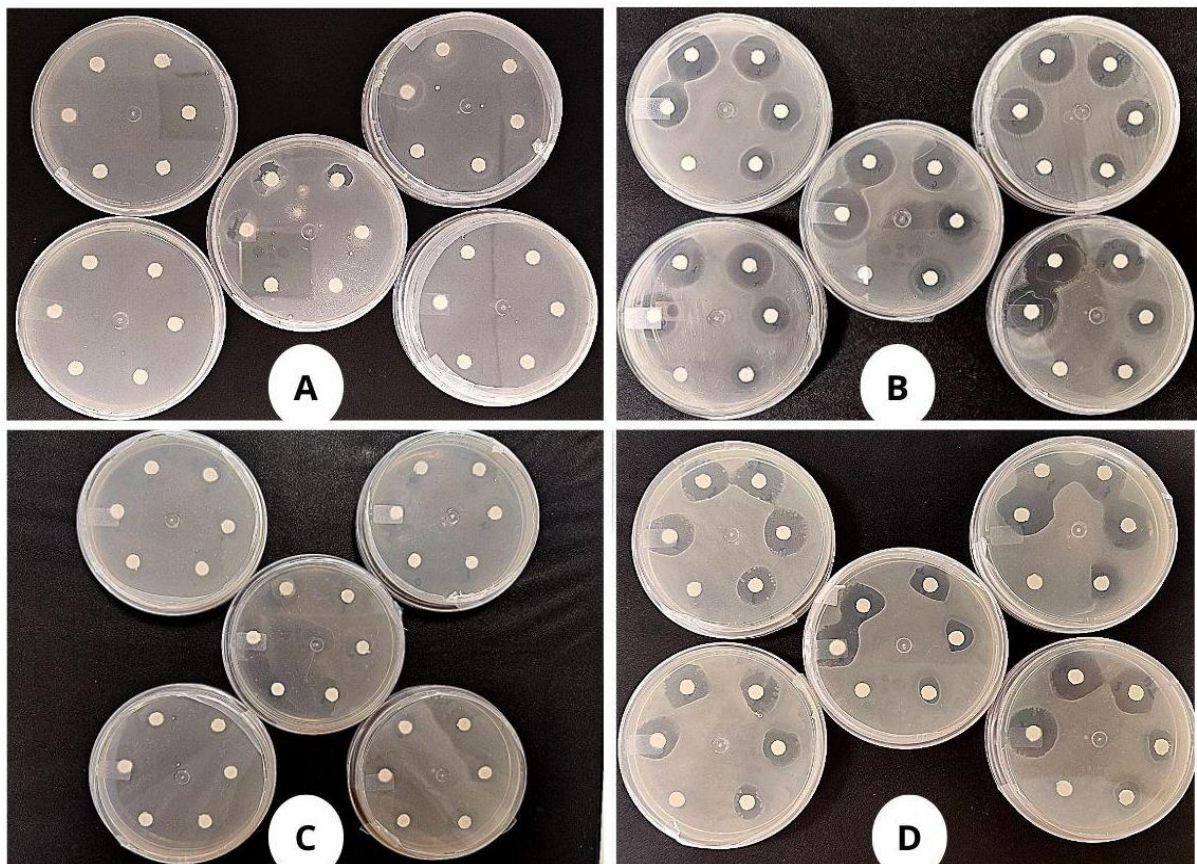
Tabela 4 - Valores médios do halo de inibição das bactérias B6 e B11 formados quando submetidos aos antibióticos ampicilina e tetraciclina.

Antibiótico	Médias	
	B6	B11
Ampicilina	0,000 b	0,000 b
Tetraciclina	1,491 a	1,505 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

Figura 7 - Antibiograma por disco-difusão em ágar para as bactérias B6 e B11 submetidas aos antibióticos ampicilina e tetraciclina.



Bactéria B6 + antibiótico ampicilina (A), bactéria B6 + antibiótico tetraciclina (B), bactéria B11 + antibiótico ampicilina (C) e bactéria B11 + antibiótico tetraciclina (D).

Fonte: Próprio autor.

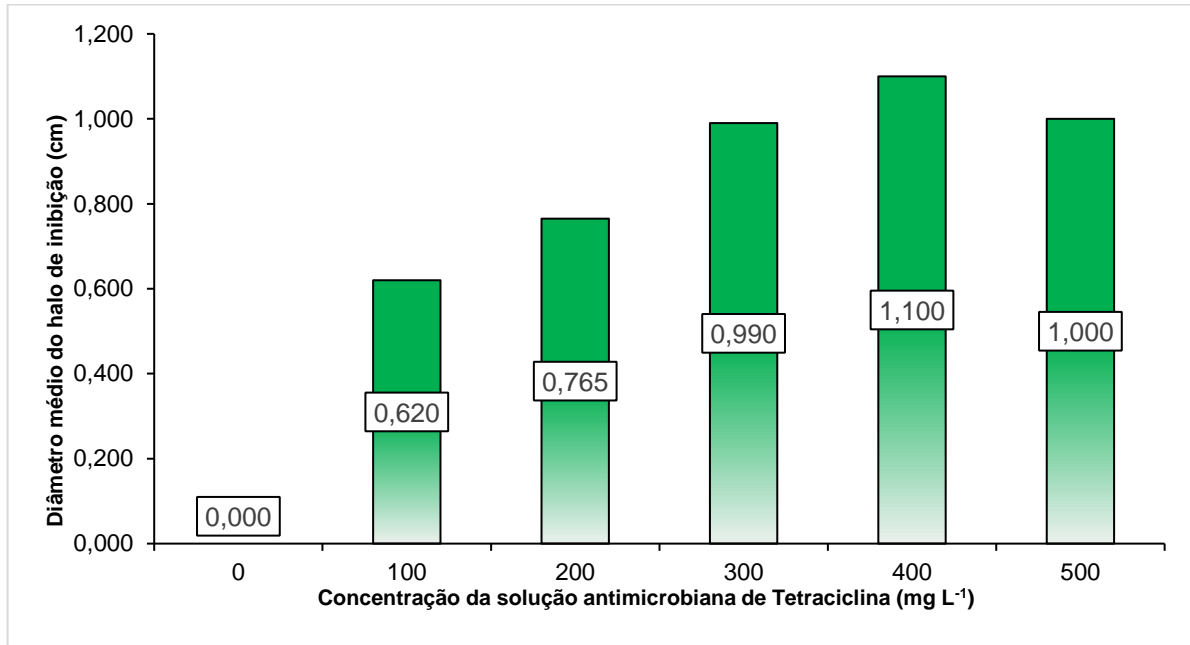
A ampicilina é um antimicrobiano semi-sintético da classe dos β -lactâmicos. Sendo assim, tem como sua morfologia a presença de um anel β -lactâmico, e como mecanismo de ação interfere na síntese de parede celular das bactérias impedindo a transpeptidação. Derivada da penicilina G que tem como alvo principal bactérias Gram-positivas, a ampicilina possui uma mudança química na estrutura da penicilina G, alterando desta forma as suas características. Com isto, a ampicilina assim como a carbenicilina são antibióticos que também são eficazes contra bactérias Gram-negativas (MADIGAN *et al.*, 2016).

Embora a ampicilina seja um antibiótico de amplo espectro, ou seja, eficaz contra ambos os grupos, e de ação bactericida, quando controla o microrganismo erradicando-o, no antibiograma por disco-difusão estudado independente das bactérias selecionadas serem dos dois grupos B6 (Gram-negativa) e B11 (Gram-positiva), não obtivemos efetividade deste antibiótico no controle das cepas, independente da concentração.

A tetraciclina, pertencente à classe das tetraciclinas, possui na sua morfologia-base a presença de um anel naftaceno o qual atacam as bactérias interferindo na síntese de proteínas, bloqueando o receptor na unidade ribossomal 30S que se liga ao t-RNA durante a tradução gênica. Este antibiótico é um dos antimicrobianos de ocorrência natural que possui amplo espectro e ação bacteriostática, ou seja, inibe o desenvolvimento das bactérias (ANVISA, 2007; MADIGAN *et al.*, 2016).

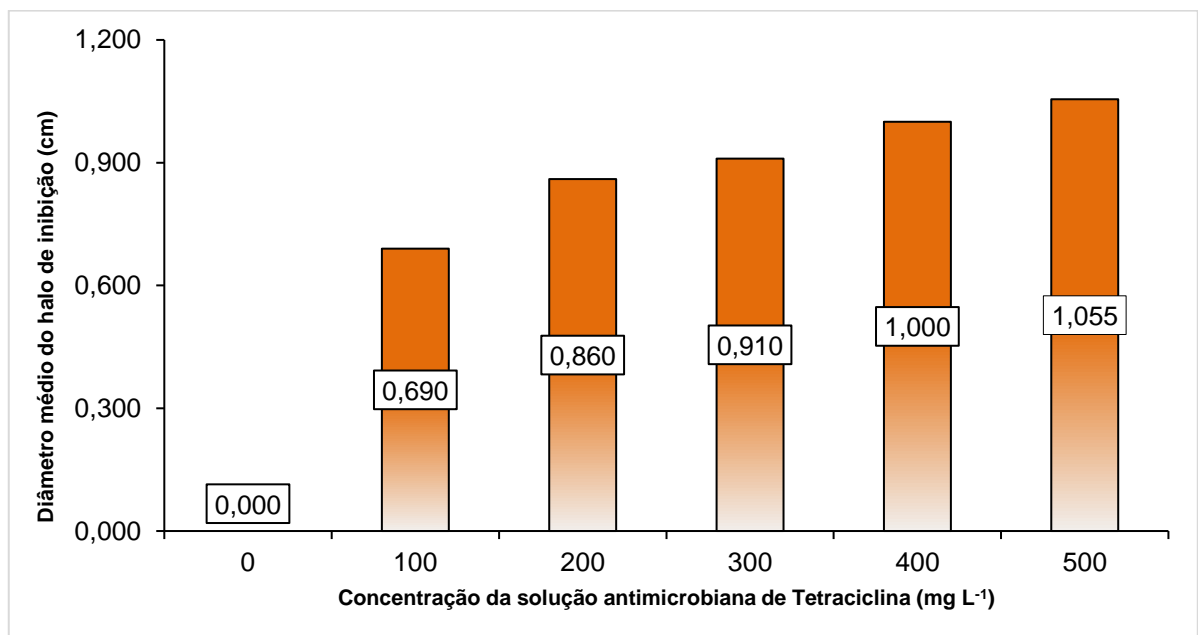
Pela análise de regressão, observamos que, quanto maior a concentração utilizada, melhor e mais rápida foi a efetividade no controle das bactérias estudadas (B6 e B11) por meio do antimicrobiano tetraciclina (figura 8 e 9).

Figura 8 - Regressão do fator concentração da solução antimicrobiana de Tetraciclina para bactéria B6 em relação ao diâmetro médio do halo de inibição formado.



Fonte: Próprio autor.

Figura 9 - Regressão do fator concentração da solução antimicrobiana de Tetraciclina para bactéria B11 em relação ao diâmetro médio do halo de inibição formado.



Fonte: Próprio autor.

Para cada bactéria, foi possível evidenciar diferença estatística entre os antibióticos testados e suas concentrações (tabela 6). Para a bactéria denominada B6, a partir da análise de regressão observamos que o antibiótico tetraciclina na concentração de 400 mg L⁻¹ apresentou melhor desempenho no teste de sensibilidade quando comparado às demais concentrações, mostrando maior diâmetro de halo (figura 10).

Por outro lado, para a bactéria denominada B11, a partir da análise de regressão obtivemos que o antibiótico tetraciclina na concentração de 500 mg L⁻¹ apresentou melhor resposta ao teste de sensibilidade apontando maior diâmetro de halo (figura 11).

Tabela 5 - Médias do desdobramento do fator concentração com o fator antibiótico.

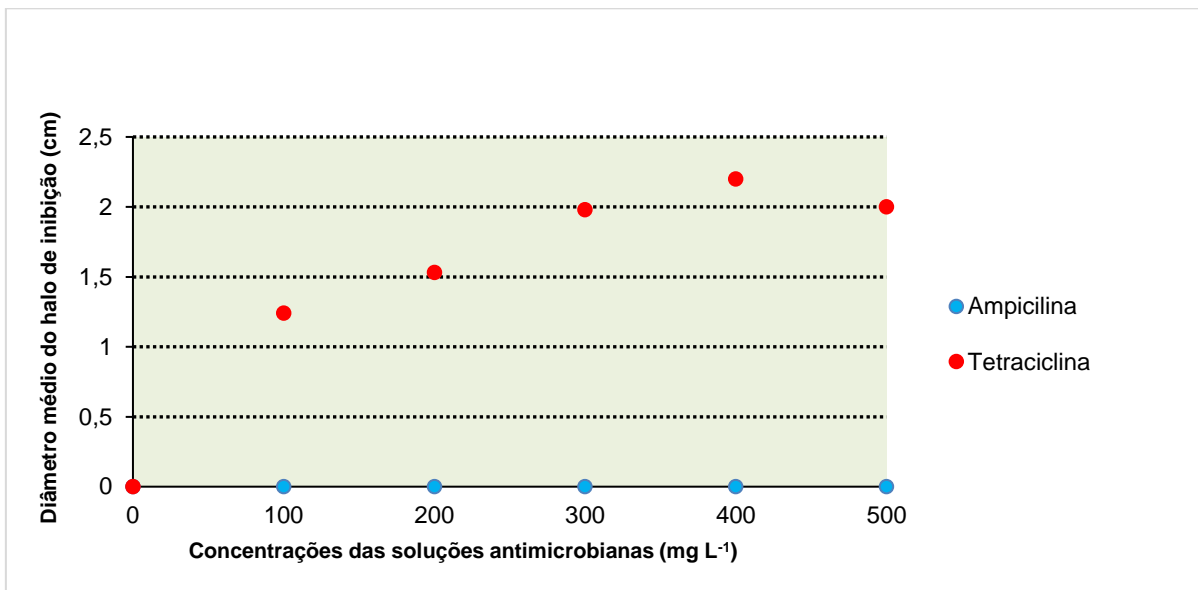
		Halo de inibição (cm)			
		B6		B11	
	Antibiótico	Ampicilina	Tetraciclina	Ampicilina	Tetraciclina
Concentrações (mg L⁻¹)	0	0,000 A	0,000 A	0,000 A	0,000 A
	100	0,000 B	1,240 A	0,000 B	1,380 A
	200	0,000 B	1,530 A	0,000 B	1,720 A
	300	0,000 B	1,980 A	0,000 B	1,820 A
	400	0,000 B	2,200 A	0,000 B	2,000 A
	500	0,000 B	2,000 A	0,000 B	2,110 A
Regressão		-	97,82%	-	98,94%

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

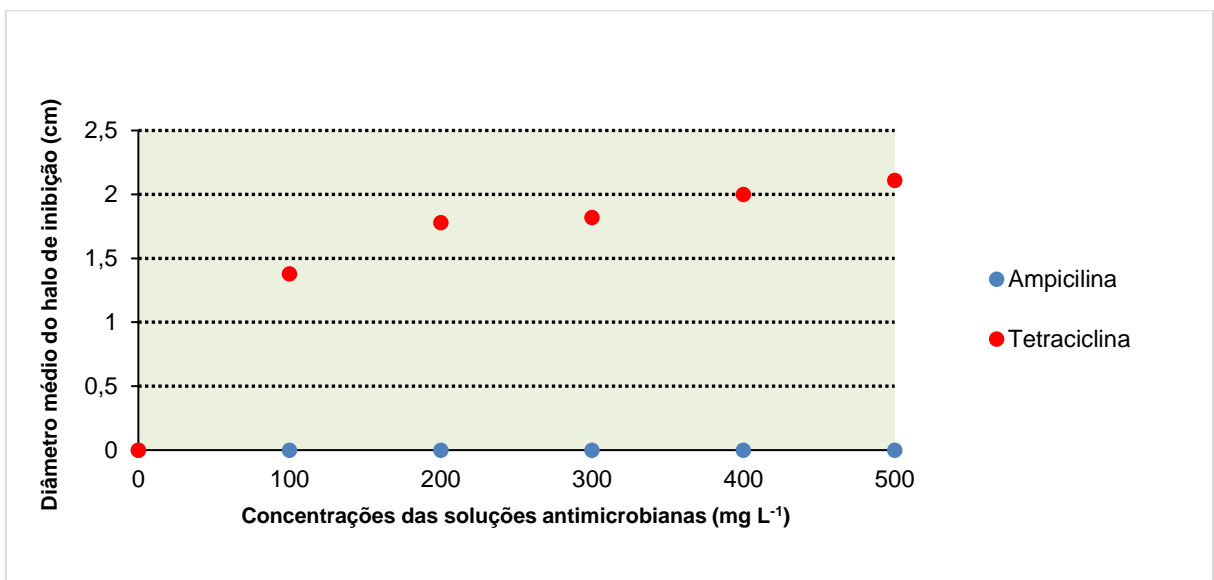
Entre os dois antimicrobianos testados tanto para bactéria B6 quanto para bactéria B11, a ampicilina em todas as concentrações utilizadas não promoveu o crescimento do halo de inibição. Por outro lado, a tetraciclina em todos os tratamentos, exceto o tratamento controle, apresentou crescimento do halo de inibição em ambas bactérias, mostrando maior efetividade no controle a partir do antibiograma utilizado.

Figura 10 - Desdobramento dos fatores concentração e antibiótico para bactéria B6 em relação ao diâmetro médio do halo de inibição formado.



Fonte: Próprio autor.

Figura 11 - Desdobramento dos fatores concentração e antibiótico para bactéria B11 em relação ao diâmetro médio do halo de inibição formado.



Fonte: Próprio autor.

4.2 EXPERIMENTO II: resposta da interação entre planta, bactéria e antibiótico

Com base nos resultados da análise de variância (tabela 7), foi possível observar que as respostas das plantas expostas as bactérias e as concentrações do

antibiótico tetraciclina promoveram resultados distintos em relação as variáveis avaliadas. Para a variável vigor dos explantes foram encontrados resultados significativos ($p < 0,01$) para bactéria B11 e não significativos ($p > 0,05$) para bactéria B6. Para a variável oxidação na bactéria B6 não obtivemos resultados significativos, ao contrário da bactéria B11 onde resultados significativos a 5% foram obtidos. Por outro lado, para a variável manifestação bacteriana não houve diferença estatística a partir da análise de variância, pois o controle das bactérias foi efetivo, não ocorrendo sua presença durante o ensaio.

Tabela 6 - Análise de variância e médias para as variáveis vigor dos explantes (VE) e oxidação (OXI) para B6 e B11.

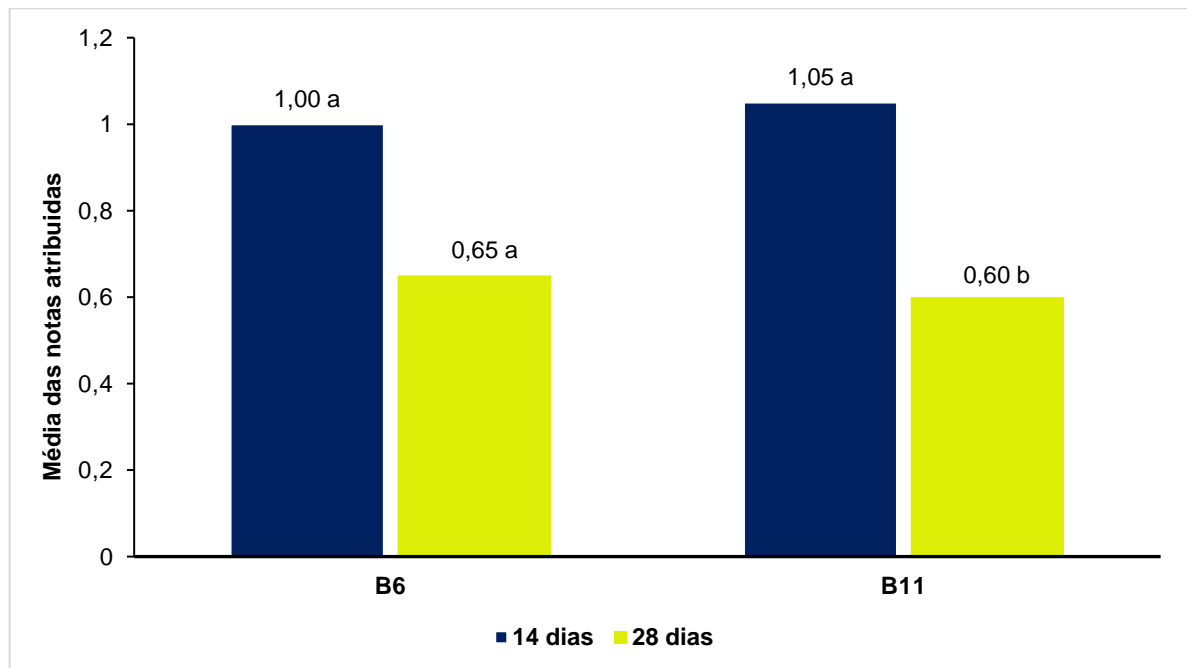
FV	B6		B11	
	VE	OXI	VE	OXI
Dias	1,225 ^{ns}	0,625 ^{ns}	2,025 ^{**}	1,225 [*]
Média Geral	0,825	1,275	0,825	1,225
CV (%)	69,66	34,49	61,40	36,87

*, ** e ^{ns}, significativo a 5%, 1% e não-significativo, respectivamente, pelo Teste F.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com a escala de notas utilizada neste trabalho e pelo teste de Tukey a 5% de significância (figura 12) foi possível observar que o vigor dos explantes na bactéria B6 não apresentaram diferença estatística em relação aos dias de avaliação. Em contrapartida, para a bactéria B11 obtivemos diferença estatística.

Figura 12 - Média das notas atribuídas para variável vigor dos explantes em relação aos 14 e 28 DAI para as bactérias B6 e B11.



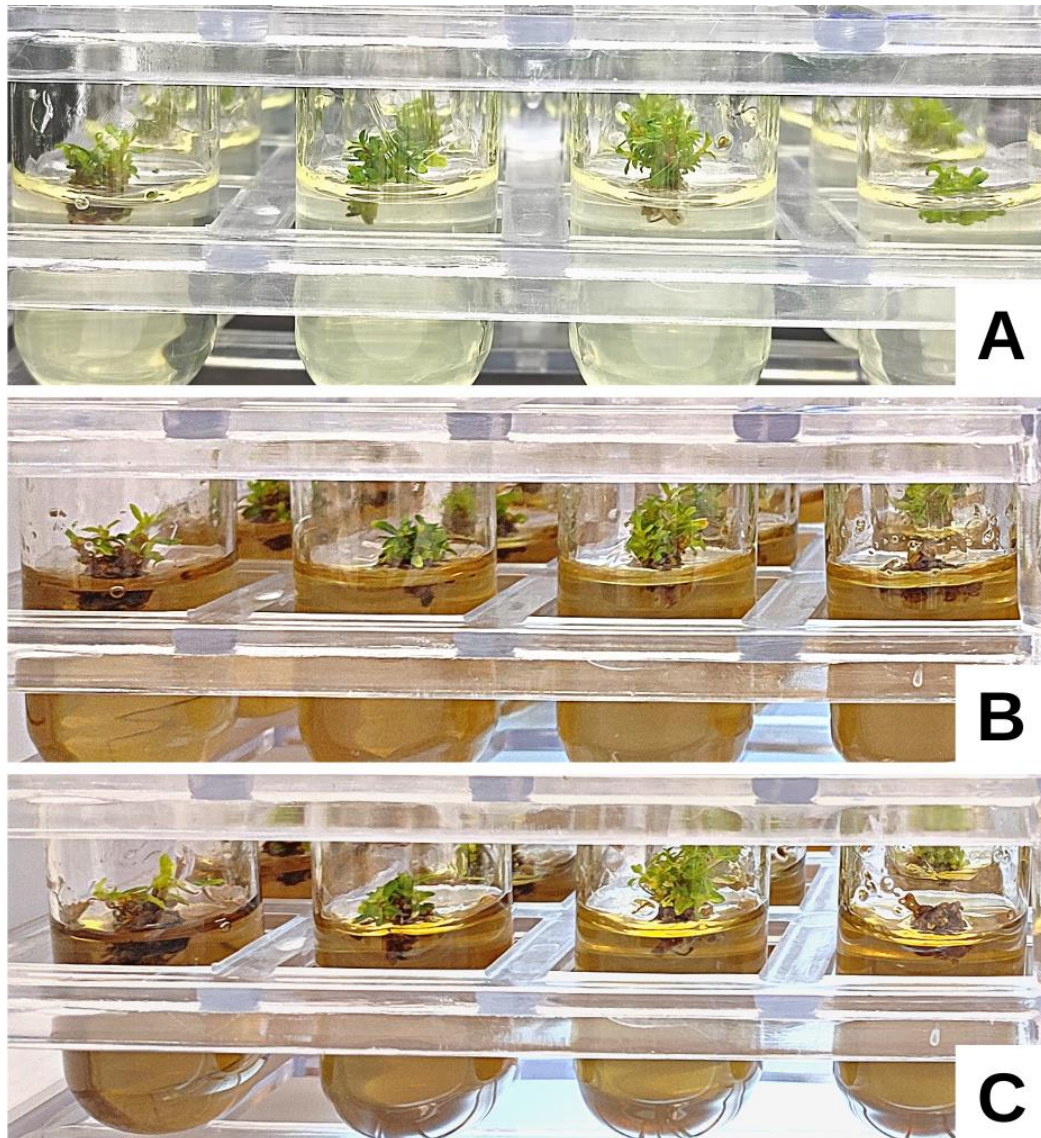
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

Baseado na figura 12 podemos observar que da primeira para a segunda avaliação em relação a bactéria B6 e B11 os ensaios exibiram uma queda no vigor dos explantes, seguida da morte do mesmo na região inferior ao decorrer do ensaio, se aproximando da pontuação atribuída como nula, em que ocorre a senescência ou morte do explante, podendo este efeito ter tido influência ou não do antimicrobiano utilizado ou da bactéria, alterando negativamente esse parâmetro, inibindo o desenvolvimento vegetal.

Na figura 13 podemos nos atentar à diferença visual entre as observações realizadas no ensaio ao dia da inoculação, 14 DAI e 28 DAI em relação ao vigor dos explantes.

Figura 13 - Vigor dos explantes de eucalipto ao decorrer do ensaio.

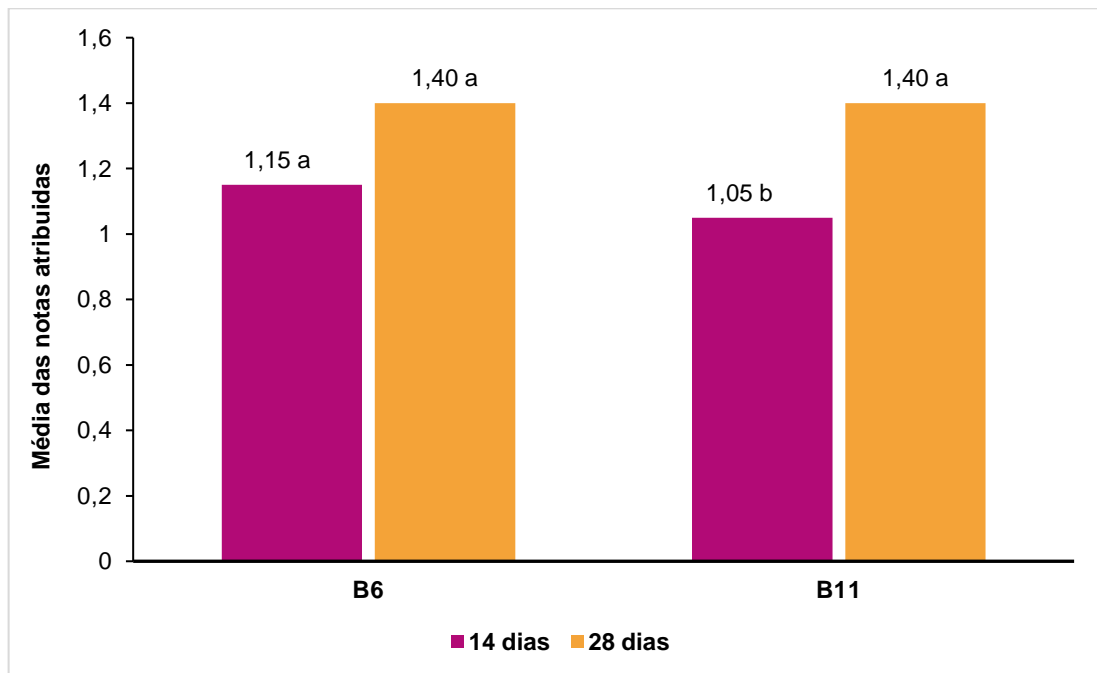


Vigor dos explantes após a inoculação (A), vigor dos explantes aos 14 DAI (B) e vigor dos explantes aos 28 DAI (C).

Fonte: Próprio autor.

Com relação a variável oxidação dos explantes, segundo o teste de Tukey a 5% de significância, para a bactéria B6 não obtivemos diferença estatística em relação aos dias de avaliação. Já para a bactéria B11 a diferença estatística foi notada comparando as médias das notas obtidas nas duas avaliações (figura 14).

Figura 14 - Média das notas atribuídas para variável oxidação em relação aos 14 e 28 DAI para as bactérias B6 e B11.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

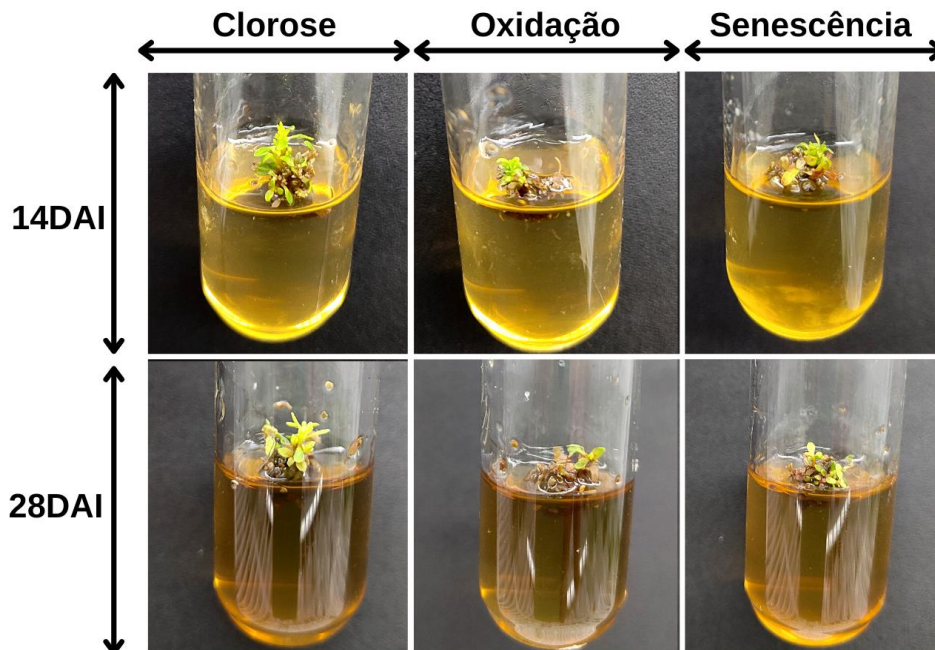
Fonte: Próprio autor.

Na figura 14 podemos observar que da primeira para segunda avaliação a oxidação apresentou um aumento, se mantendo entre a escala de nota média e alta atribuída para oxidação dos explantes. Neste caso, as concentrações do antibiótico tetraciclina utilizadas ou o período do subcultivo da cultura (28 dias).

Nas observações visuais, foi possível constatar para ambas as bactérias que toda a base do explante mergulhada no inóculo e que estava em contato com o meio de cultivo apresentou escurecimento logo nos primeiros dias *in vitro*, assim como o próprio meio de cultivo, ocorrendo em sequência a morte das folhas das extremidades para o centro do explante (figura 15 e 16).

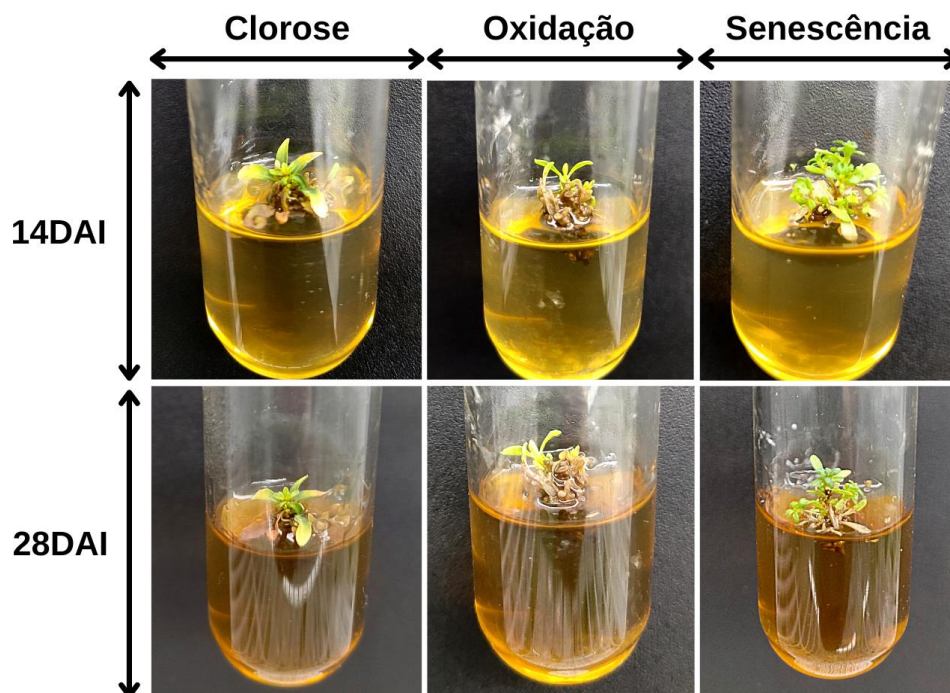
Além das características constatadas acima, a clorose e a senescência das folhas também foram observados ao decorrer dos 28 dias de avaliação como mostrado na (figura 15 e 16). Estes aspectos gerais se mostraram presentes desde a primeira avaliação aos 14 DAI se tornando mais persistentes na segunda avaliação aos 28 DAI.

Figura 15 - Desenvolvimento dos explantes contaminados com a bactéria B6 no meio de cultivo com adição de 400 mg L⁻¹ de tetraciclina aos 14 e 28 DAI.



Fonte: Próprio autor.

Figura 16 - Desenvolvimento dos explantes contaminados com a bactéria B11 no meio de cultivo com adição de 500 mg L⁻¹ de tetraciclina aos 14 e 28 DAI.



Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

Assim como Pereira *et al.* (2003) estudando o controle de bactérias endofíticas no cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* (batata) por meio de antibióticos, a tetraciclina apontou o maior espectro de ação em relação aos outros antibióticos testados controlando seis de oito estirpes isoladas, corroborando com nossos resultados.

Cunha *et al.* (2006) testando nove antibióticos por meio de antibiograma de disco-difusão para o controle de três bactérias fitopatogênicas que causam mancha foliar e senescência de folhas em mudas de *Eucalyptus* spp. (eucalipto), a oxitetraciclina foi efetiva na inibição de um destes isolados, e tal antibiótico faz parte da classe das tetraciclinas.

Dados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram relatados por Chanprame *et al.* (1996), em que o antibiótico ampicilina não foi eficaz nas concentrações testadas.

Andrade *et al.* (2008), desenvolvendo protocolos para descontaminação de explantes de *Mangifera indica* L. (mangueira), em que uma das bactérias endógenas estudadas apresentou resistência ao antibiótico ampicilina na concentração de 150 mg L⁻¹ assim como no antibiótico tetraciclina na mesma concentração.

Brandão *et al.* (2013), na germinação *in vitro* de sementes de *Copaifera multijuga* Hayne (copaíba), utilizaram o agente bactericida ampicilina na dose de 500 mg L⁻¹ e obtiveram 20% de contaminação bacteriana, demonstrando que o mesmo possui menor ação na assepsia de sementes. Em contrapartida, o mesmo autor trabalhando com a descontaminação de explantes de *Carapa guianensis* Aublet (andiroba) e *Protium spruceanum* Benth (breu branco), a ampicilina se mostrou eficiente, evidenciando as menores taxas de contaminação por bactérias.

Resultados semelhantes a esse autor, distintos dos verificados neste trabalho, foram encontrados para diversas culturas. Donato *et al.* (2005) testando dez antibióticos no controle de bactérias fixadoras de nitrogênio na cultura da *Saccharum* sp. (cana-de-açúcar), observou que entre amoxicilina e tetraciclina, a amoxicilina apresentou melhores resultados. O antibiótico amoxicilina pertencente a classe dos β -lactâmicos assim como a ampicilina que neste trabalho apresentou pior controle quando comparado a tetraciclina.

Araújo *et al.* (2012) com o objetivo de controlar contaminações na micropropagação de *Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh (camu-camuzeiro), obteve eficiência na suplementação do meio de cultura com o antibiótico ampicilina, mesmo na concentração mais baixa utilizada de 100 mg L⁻¹.

Resultado semelhante foi mostrado por Pereira *et al.* (2014), adicionando ao meio de cultura o antibiótico ampicilina sódica para o cultivo *in vitro* de *Musa sp.* (bananeira), que na concentração de 20 mg L⁻¹ tal antimicrobiano reduziu a contaminação por bactérias, além da taxa de oxidação dos explantes.

Palú *et al.* (2011) trabalhando no controle de bactérias endógenas na micropropagação de *Ficus carica* L. (figueira), adicionando seis diferentes tipos de antibióticos ao meio de cultivo, concluiu que a ampicilina sódica proporcionou 90% da sobrevivência dos explantes, além de inibir o crescimento de bactérias na concentração de 250 mg L⁻¹.

O uso da ampicilina no trabalho estudado por Pereira *et al.* (2003) e Silva *et al.* (2013) demonstrou seletividade no controle de bactérias isoladas durante o cultivo *in vitro* de algumas cultivares de batata e da cana de açúcar respectivamente.

Diante dos resultados dos trabalhos citados, nota-se que existem divergências em relação à ação dos antibióticos. A partir dos resultados alcançados neste trabalho, as concentrações do antibiótico tetraciclina apresentaram os melhores resultados para o controle das bactérias B6 e B11 nas concentrações de 400 e 500 mg L⁻¹ respectivamente.

Como relatado por Palú *et al.* (2011), as menores taxas de sobrevivência de explantes de figueira ocorreram na presença de 500 mg L⁻¹ do antibiótico tetraciclina adicionado ao meio de cultivo.

Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira e Fortes (2003) trabalhando com explantes de batatas, em que a tetraciclina causou efeito fitotóxico, não havendo sobrevivência a partir das concentrações de 128 mg L⁻¹ e redução da taxa de multiplicação a partir de 32 mg L⁻¹, o qual afetou severamente o desenvolvimento *in vitro* desta cultura.

Por conta de distúrbios na síntese proteica e ação inibitória na síntese de alguns compostos, os sistemas energéticos da planta são afetados por conta deste antibiótico, causando ação fitotóxica (PRADO FILHO, 1975; FALKINER, 1990).

Estes tipos de antibióticos por possuírem mecanismos de ação específicos para diferentes grupos de bactérias (síntese de parede celular, síntese proteica,

enzimas, entre outros), quando adicionados ao meio de cultivo podem apresentar respostas distintas para o material vegetal, no qual dependendo da concentração, problemas com fitotoxicidade podem surgir durante o ciclo *in vitro* da cultura (PEREIRA e FORTES, 2003; PALÚ, 2011; LEONE, 2019)

Segundo Relier *et al.* 2016, Pollock *et al.* 1983, Leifert *et al.* 1991 e Lima e Moraes 2006, tanto o controle de contaminações quanto o tratamento curativo do material vegetal com este antimicrobiano podem ter maior eficiência quando os tratamentos são realizados durante curtos períodos.

Embora seja considerada um antibiótico de amplo espectro, a tetraciclina tem utilidade limitada na cultura de tecidos justamente devido a sua alta fitotoxicidade. O sintoma mais comum deste distúrbio é a falta de produção de clorofila pela folha em virtude da destruição que o antibiótico causa nos cloroplastos, denominado de clorose (POLLOCK *et al.*, 1983).

Devido a destruição dos cloroplastos, a senescência foliar entra em processo, com a degradação de membranas, perda de estrutura, organização celular e função das organelas. Com isso, é atingido o estágio terminal do desenvolvimento biológico vegetal, sendo capaz de ocorrer na planta inteira ou limitado a alguns órgãos (THOMPSON *et al.*, 1998; BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; GAN e AMASINO, 1996).

Esta fase em questão pode ser acelerada sob as condições adversas que podem ocorrer durante o cultivo *in vitro* dos explantes e as altas concentrações do antibiótico tetraciclina, interferindo na sua sobrevivência (CUQUEL, 2000; PEREIRA e FORTES, 2003; PALÚ, 2011).

No cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, o processo de oxidação dos explantes pode ser comumente ocasionado pela liberação de exsudatos após ferimentos e injúrias realizado no repique dos mesmos antes da inoculação, que tornam o meio de cultivo escuro e apresentam escurecimento do material propagado (ANDRADE *et al.*, 2000; PAIVA e PAIVA, 2001).

Entretanto, apesar de ser um fator comum, segundo Ledo *et al.* (2002) a oxidação pode ser causada também pelos próprios compostos nutricionais e outros presentes no meio de cultura.

Com isso, a presença de agentes antimicrobianos no meio de cultura, como a tetraciclina, o antibiótico gentamicina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, tetraciclina, norfloxacina, oxitetraciclina, eritromicina e sulfato de canamicina, podem vir a ser

tóxicos para células vegetais, ocasionando oxidação e perda do desenvolvimento vegetativo dos explantes, tornando-se então não recomendados para uso na micropropagação de algumas culturas e espécies (LEONE, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2012; PALÚ *et al.*, 2011; PEREIRA e FORTES, 2003; CHANPRAME *et al.*, 1996; URSIC *et al.*, 1981; WATTS e KING 1973).

Estudos recentes realizado por Romadanova *et al.* 2022 tentando controlar contaminantes em culturas *in vitro* de *Malus* spp. (macieira), dá ênfase ao PPM™, um biocida e fungicida de amplo espectro, em que desde que foi introduzido no mercado têm obtido sucesso no controle de microrganismos na cultura de tecidos. É estável a autoclavagem e impede o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos, já testado na cultura da videira, citrus, mamão, macieira, entre outros (VOLK *et al.*, 2022; DIGONZELLI *et al.*, 2005; THOMAS, *et al.*, 2017; ROMADANOVA *et al.*, 2022).

Contudo, o estudo e o desenvolvimento de técnicas para controlar os microrganismos, que são uma ameaça contínua à cultura de tecidos vegetais tem sido com o avanço da biotecnologia na produção agrícola cada vez mais aprofundados e aperfeiçoados, otimizando a produção e incrementando novos protocolos assertivos ao mercado.

5 CONCLUSÕES

O antibiótico ampicilina não foi eficaz no controle das bactérias selecionadas no cultivo *in vitro* de híbridos comerciais de eucalipto.

O antibiótico tetraciclina foi eficaz no controle das bactérias B6 e B11 em concentrações a partir de 100 mg L⁻¹, tendo a melhor resposta de controle no uso de 400 mg L⁻¹ para B6 e 500 mg L⁻¹ para B11.

O antimicrobiano tetraciclina nas concentrações 400 e 500 mg L⁻¹ controlou a manifestação bacteriana, porém interferiu no desenvolvimento vegetativo *in vitro* dos explantes do híbrido comercial de eucalipto, apresentando baixo vigor e alta oxidação.

No cultivo *in vitro* de *Eucalyptus*, estudos comparativos entre os agentes antimicrobianos comerciais e os antibióticos laboratoriais devem ser realizados, tendo como foco o aperfeiçoamento dos protocolos de desinfestação que consigam controlar a contaminação microbiana sem que os agentes interfiram no desenvolvimento e crescimento da planta *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ABREU-TARAZI, M. F.; NAVARRETE, A. A.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, C. V.; TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, p. 555-560, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Antimicrobianos, bases teóricas e uso clínico: macrolídeos**. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/macrolideos.htm. Acesso em: 13 ago. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Antimicrobianos, bases teóricas e uso clínico: tetraciclina**. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/tetraciclina.htm. Acesso em: 13 ago. 2022.

ANDERSON, H. W.; GOTTLIEB, D. Plant disease control with antibiotics. **Economic Botany**, Saint Louis, v. 6, p. 294-308, 1952.

ANDRADE, S. R. M.; PINTO, A. C. Q.; FALEIRO, F. G.; CORDEIRO, M. C. R.; RAMOS, V. H. V.; TEIXEIRA, J. B. Desenvolvimento e avaliação de protocolos para descontaminação de explantes de mangueira visando a micropropagação. *In*: BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO, 153.,2005, Planaltina, DF. **Anais [...]** Planaltina, DF: Embrapa Cerrado, 2008.

ANDRADE, S. R. M.; OLIVEIRA, W. C.; JUNIOR, F. B. R.; CHARCHAR, M. J. A.; FALEIRO, F. G.; MEHTA, A.; TEIXEIRA, J. B.; PEIXOTO, J. R. Controle do crescimento e identificação de microrganismos contaminantes visando à micropropagação de gemas laterais de mangueira. *In*: BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO, 217.,2008, Planaltina-DF. **Anais [...]** Planaltina-DF: Embrapa Cerrado, 2008.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

ARAÚJO, M. C. R.; CASTRO, A. M.; CHAGAS, E. A.; SILVA, M. L.; COUCEIRO, M. A.; FLORES, P. S. Uso de antibióticos no controle da contaminação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais [...]** [S. l.: s. n.], 2012.

AYUB, R. A.; SPINARDI, B.; BASSO, M. F.; BIASI, L. A. Indução de multibrotação *in vitro* em videira cv. Bordô. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p. 675-681, 2010.

BALLANTYNE, B. e JORDAN, S. L. **Biocides**. *In*: MARRS, T.C.; BALLANTYNE, B. **Pesticide toxicology and international regulation**. Chichester:Wiley, 535p, 2004.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Cary, v. 45, p. 493-496, 1966.

BRANDÃO, H. L. M.; SAMPAIO, P. T. B.; JARDIM, L. S. **Propagação *in vitro* de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), breu branco, (*Protium spruceanum* Benth.), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke)**. 2013. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, 2013.

BRONDANI, G. E.; ONDAS, H. W. W.; BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012.

BUCHANAN-WOLLASTON, V. The molecular biology of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 48, n. 307, p. 181-199, 1997.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, p.1158-1249, 2000.

CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L.; CARNEIRO, V. T. de C. **Introdução *in vitro* micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

CARVALHO, D. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; CARVALHO, C. R. Regeneração de plantas após fusão de protoplastos de tangelo 'Page' e toranja 'Lau Tau'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 329-332, 2007.

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; SANTOS, A. M. dos; CASTRO, E. M. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Modificações na anatomia foliar de bananeiras durante o processo de micropropagação. **Interciência**, Catanduva, v. 33, p. 663-667, 2008.

CUNHA, J. F.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Efeito *in vitro* de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 6, p. 871-876, 2006.

CUQUEL, F. L. **Senescência foliar e deficiência nutricional em plantas transgênicas de *Petunia x hybrida* contendo os genes *PtAG1rkn1* e *PtAG1ript***. 2000. 73 f. Tese (Doutorado em agronomia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo Piracicaba, 2000.

CHANPRAME, S.; TODD, J. J. WIDHOLM, J. M. Prevention of pink-pigmented methylotrophic bacteria *Methylobacterium mesophilicum* contamination of plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, p. 222-225, 1996.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 10. ed. Passo Fundo: Passo Fundo: RAPP, 2002. v. 10, p. 391-407.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture: essential methods**. Wiley: Chichester, 2010. 358 p.

DIGONZELLI, P.; DÍAZ, L.; CARRIZO DE BELLONE, S. Uso de PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar. **Rev. Fac. Agron.**, [s. l.], v. 22, p. 23–33, 2005.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; TAKAKI, G. M. C.; MARIANO, R. L. R.; MACIEL, G. A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 134-141, 2005.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p.49-59, 2009.

DRUMOND, M. A.; OLIVEIRA, V. R. de; CARVALHO, O. M. de. Comportamento silvicultural de espécies e procedências de Eucalyptus na região dos Tabuleiros Costeiros do Estado de Sergipe. **Revista Árvore** v. 22, n.1, p. 137-142, 1998.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 9, p. 533-541, 2011.

ESPOSITO-POLESI, N. P.; ALMEIDA, C. V.; ALMEIDA, M. Avaliação histoquímica de espécies de microplantas hospedeiras de endófitos. **Revista Biociências** 19: 61-71. 2013.

ESPOSITO-POLESI, N. P.; ANDRADE, P. A. M.; ALMEIDA, C. V.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, M. Endophytic bacterial communities associated with two explant sources of Eucalyptus benthamii Maiden & Cambage. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 31: 1737-1746. 2015.

ESPOSITO-POLESI, N. P.; ABREU-TARAZI, M. F.; ALMEIDA, C. V.; TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Investigation of endophytic bacterial community in supposedly axenic cultures of pineapple and orchids with evidence on abundant intracellular bacteria. **Current Microbiology**. v. 74, p. 103-113, 2017.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Contaminação versus manifestação endofítica: implicação no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia**. v. 71, 2020.

FALKINER, F. R. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. **International Association for Plant Tissue Culture Newsletter**, Calgary, n. 60, p. 14-21, 1990.

FANG, J. Y. e HSU, Y. R. Molecular Identification and Antibiotic Control of Endophytic Bacterial Contaminants from Micropropagated Aglaonema cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 110, p. 53–62, 2012.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 22 p. 2004.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019. ISSN 1983-0823. Disponível em: <http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>. Acesso em: 10 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

FIGUEIREDO, M. A.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C.; RODRIGUES, V. A. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 255-257, 2008.

FOX, A. 2022. **Antibiotics that Affect Plant Envelope**. Disponível em <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/antibiotics1.htm>. Acesso em: 15 ago. 2022.

GAN, S.; AMASINO, R. M. Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. **BioEssays**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 557-565, 1996.

GATTI, I.; GUINDÓN, F.; BERMEJO, C.; ESPÓSITO, A.; COINTRY, E. *In vitro* tissue culture in breeding programs of leguminous pulses: use and current status. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 127, n. 3, p. 543-559, 2016.

GUERRA, M. P.; FRAGA, H. P. F.; NODARI, R. O.; VIEIRA, L. N.; FRITSCHÉ, Y. **Biociência I**. Apostila v2016.1. Universidade Federal de Santa Catarina. 2016.

GRAM, H. C. Ueber die isolirte farbung der schizomyceten in schnitt und trockenpreparaten. **Fortschr Med**, Berlin, v. 2, p. 185–189.1884.

GRATTAPAGLIA, D. e MACHADO, M. A. Micropropagação. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI\Embrapa CNPH, Brasília. p. 183-260, 1998.

HOLFORD, P.; NEWBURY, H. J. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 11, p. 93-96, 1992.

IKEDA, S.; OKUBO, T.; ANDA, M.; NAKASHITA, H.; YASUDA, M.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; EDA, S.; MOMIYAMA, A.; TERASAWA, K.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 51, p. 1398-1410, 2010.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). **Relatório Anual IBÁ, 2021**. Disponível em: < <https://www.iba.org/publicacoes> >. Acesso em: 15 jul. 2022.

INSTITUTO DE PADRÕES CLÍNICOS E LABORATORIAIS - CLSI. **Manual de Antibiograma** [S. l.]: Laborclin produtos para laboratórios, 2019.

JIMTHA, J. C.; SMITHA, P. V.; ANISHA, C.; DEEPHI T.; MEEKHA, G.; RADHAKRISHNAN, E. K.; GAYATRI, G. P.; REMAKANTHAN, A. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 118, p. 57-66, 2014.

JUNIOR, L. S. **Caracterização silvicultural, botânica e tecnológica do *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake e de seu potencial para utilização em serraria.** 2001. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biochemical Science**, Amsterdam, v. 7, p. 39-44, 1989.

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

KULKARNI, A. A.; KELKAR, S. M.; WATVE, M. G.; KRISHNAMURTHY, K. V. Characterization and Control of Endophytic Bacterial Contaminants *in vitro* cultures of *Piper* spp., *Taxus baccata* subsp. *wallichiana*, and *Withania somnifera*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.53, p.63-74, 2007.

LABORCLIN (LB). **Coloração de GRAM.** Rev. 12. 2018. Registro ANVISA: 10097010-156. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/coloracao_de_gram_620520_620521_620181_621000_620511_620511_621218_621219_620515.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2022.

LATA, H.; LI, X. C.; SILVA, B.; MORAES, R. M.; HALDA-ALIJA, L. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated Echinaceae plants using 16S rRNA sequencing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, p. 353-359. 2006.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 604-607, dez. 2002.

LEE, N. e WETZSTEIN, H. Y. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mont Vernon, v. 115, n. 2, p. 324-329, 1990.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S. M.; WAITES, B.; CHEYNE, V. A.; WAITES, W. M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 71, n. 4, p. 307-330, 1991.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. ***In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 37, n. 2, p. 133-138, 2001.

LEONE, G. F. **Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

LEONE, G. F.; ANDRADE, P. A. M.; V. de A., C.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, M. Use of antibiotics to control endophytic bacterial growth migration onto culture medium in *Eucalyptus cloeziana* F. Muell.: A micropropagation approach. ***Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant***, Heidelberg, v. 55, p. 421-432, 2019.

LIMA, J. D. e MORAES, W. S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. ***Pesquisa Agropecuária Tropical***, Goiania, v. 36, p.13-19, 2006.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountains laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. ***Combined Proceedings International Plant Propagators Society***, Washington, v. 30, p. 327-421, 1981.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. ***Microbiologia de Brock***. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MELO, N. F. de; OKASAKI, W. Y.; LEITA, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). ***Ciência e Agrotecnologia***, Lavras, v. 23, n.1, p.102-107, 1999.

MOREL, G. Producing virus-free cymbidiums. ***American Orchid Society Bulletin***, [s. l.], v. 29, p. 495-497, 1960.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, J. P. de; COSTA, F. H. da S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia Sul Ocidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. ***Revista Brasileira de Fruticultura***, Jaboticabal, v. 31, p. 459-465. 2008.

OLIVEIRA, L. S. D.; XAVIER, A.; LOPES, A. P.; TAKAHASHI, E. K.; OTONI, W. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. ***Ciência Florestal***, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 235-247, 2016.

PAIVA, R. e PAIVA, P. D. O. ***Cultura de Tecidos***. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, 2001.

PALACIO, R. e ANDRES, A. **Produtividade e estado nutricional em plantações de eucalipto em função de variáveis edafoclimáticas**. 2011. 112 f. Dissertação

(Mestrado em Silvicultura e Manejo Florestal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

PALMA, D.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S.; FORTES, A. M. T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. **Current Agricultural Science and Technology**, [s. l.], v. 17, p. 174-184, 2011.

PALÚ, E. G.; CORRÊA, L. S.; SUZUKI, A.N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011.

PANICKER, B.; THOMAS, P.; JANAKIRAM, T.; VENUGOPALAN, R.; NARAYANAPPA, S. B. Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum "Arka Swarna" and activation of endophytic bacteria. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 43, p. 614-622, 2007.

PAZ, I. C. P.; SANTIN, R.C.M.; GUIMARÃES, A. M.; ROSA, O.P.P.; DIAS, A. C. F.; QUECINE, M.C.; AZEVEDO J.L.; MATSUMURA, A.T.S. Eucalyptus growth promotion by endophytic Bacillus spp. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, p. 3711-3720, 2012.

PEREIRA, J. E. S. e FORTES, G. R. L. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* de batata em meios semi-sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 11, p. 1273-1279, 2003.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. L. R. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, p. 827-834, 2003.

PEREIRA, G. A.; BOLIANI, A. C. FURLANI JÚNIOR, E. Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira 'Thap maeo'. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 61, p. 299-305, 2014.

PIOTTO, K. D. B. **Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. 2011. 157 f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PINI, F.; FRASCELLA, A.; SANTOPOLO, L.; BAZZICAPULO, M.; BIONDI, E. G.; SCOTTI, C.; MENGONI, A. Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. **BMC Microbiology**, London, v. 12, p. 1-10, 2012.

PIRES, I. E.; SOUZA, S. M. de; DRUMOND, M. A.; SILVA, H. D. da; LIMA, P. C. F.; RIBASKI, J. **Teste de procedência de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. na região do Nordeste semi-árido brasileiro**. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. CENTRO DE PESQUISA AGROPECUÁRIO DO TRÓPICO SEMI-ÁRIDO, PETROLINA, PE. Programa Nacional de Pesquisa Floresta; pesquisa florestal no Nordeste. Petrolina: [s. n.], 1981. p. 1- 11.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 2, p. 36-39, 1983.

PRADO FILHO, L. G. Emprego de antibióticos em agricultura. *In*: LACAZ, C.S. (coord.). **Antibióticos**. São Paulo: E. Blucher, 1975. p. 472-509.

RAZDAN, M. K. Aseptic manipulation. *In*: RAZDAN, M. K. (ed.). **Introduction to plant tissue culture**. 2nd ed. Enfield: Science, 2003. p. 35-40.

RELIER, S.; YAZDANI, L.; AYAD, O.; CHOQUET, A.; BOURGAUX, J. F.; PRUDHOMME, M.; PANNEQUIN, J.; MACARI, F.; DAVID, A. Antibiotics inhibit sphere-forming ability in suspension culture. **Cancer Cell Int.**, London, v. 16, n. 6, 2016.

RODRIGUES, L. C.; VASTANO JÚNIOR, B.; SILVA, A. P. Manejo e melhoramento de florestas de Eucalyptus em áreas de areias quartzozas na região nordeste do estado de São Paulo. **Silvicultura**, Maldonado, v. 11, n. 41, p. 104-110, 1986.

ROMADANOVA, N. V.; TOLEGEN, A. B.; KUSHNARENKO, S. V.; ZHOLDYBAYEVA, E. V.; BETTONI, J. C. Effect of Plant Preservative Mixture™ on Endophytic Bacteria Eradication from *In vitro* -Grown Apple Shoots. **Plants**, Basel, v.11, p. 1-12, 2022.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K. FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 278, p. 1-9, 2008.

SANTOS, R. P. **Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro***. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

SILVA, C. R.; SOUZA, C. E. R.; PAULA, F. de M. S. F.; MARINI, D. C. Avaliação da resistência da bactéria *Burkholderia brasiliensis* a antibióticos. **Foco**, [s. l.], n. 5, 2013.

SILVA, J.A.T.; NHUT, D.T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 97, p. 397–410, 2003.

SOUZA, J. C. D.; RESCAROLLI, C. L. D. S.; NUNEZ, C. V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018.

SUDARSONO, A.; GOLDY, R. G. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 3, p. 304-307, 1991.

TAMBARUSSI, E.V. **Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera***. 2009. 123 f. Dissertação

(Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2009.

TENG, W. L. e NICHOLSON, L. Pulse treatments of penicillin G and streptomycin minimize internal infections and have post treatment effects on the morphogenesis of ginseng root culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 531-535, 1997.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-CNPq, 1998. p. 87-132.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. e ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetais**. Brasília, DF: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 128 p.

THOMAS, P. e ASWATH, C. *In vitro* introduction of hardy alcohol resistant bacillus spp. through aseptically grown watermelon seedlings. **Advances in Microbiology**, Irvine, v. 4, p. 504-510, 2014.

THOMAS, P.; AGRAWAL, M.; BHARATHKUMAR, C. B. Use of Plant Preservative Mixture™ for establishing *in vitro* cultures from field plants: Experience with papaya reveals several PPM™ tolerant endophytic bacteria. **Plant Cell Rep.**, v. 36, p. 1717–1730, 2017.

THOMAS, P. e PRAKASH, G. S. Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years *in vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Plant, v. 40, p. 603-607, 2004.

THOMPSON, J. E.; FROESE, C. D.; MADEY, E.; SMITH, M. D.; HONG, Y. Lipid metabolism during plant senescence. **Progress in Lipids Research**, [s. l.], 37, n. 2/3, p. 119-141, 1998.

URSIC, D.; KEMP, J. D.; HELGESON, J. P. A new antibiotic with known resistance factors, G418, inhibits plant cells. **Bioch. Biófilos. Res.**, [s. l.], n. 101, p. 1031-1037, 1981.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SALLES PIO, L. A.; APARECIDA ASSIS, F. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira em variações do meio MS. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n.3, p. 345-349, 2006.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A.; ZÁRRAGA, D. Z. A. Efeito de concentrações de glicina e inositol no cultivo *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n.5, p. 1637-1642, 2008.

VOLK, G.M.; BONNART, R.; ARAÚJO DE OLIVEIRA, A. C.; HENK, A.D. Minimizing the deleterious effects of endophytes in plant shoot tip cryopreservation. **Appl. Plant Sci.**, v. 10, e11489, 2022.

WATTS, J. W. e KING, J. M. The use of antibiotics in the culture of non-sterile plant protoplasts. **Planta**, Heidelberg, n. 113, p. 271-277, 1973.

WIECHETECK, M. S. S. **Micropropagação de *Eucalyptus viminalis* Lahil L a partir de Material Juvenil**. 1990. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Paraná, 1990.

WHITE, P. R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 2, p. 231-244, 1951.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009. 272 p.