

ELISANDRA FRANCISCO DE SOUZA

ESTUDO ANATÔMICO DE GALHAS INDUZIDAS PELA
BACTÉRIA *Rhodococcus fascians* EM PLANTAS DE *Acacia*
mearnsii

CURITIBA
2000

ELISANDRA FRANCISCO DE SOUZA

ESTUDO ANATÔMICO DE GALHAS INDUZIDAS PELA
BACTÉRIA *Rhodococcus fascians* EM PLANTAS DE *Acacia*
mearnsii

Monografia apresenta à disciplina Estágio em
Botânica, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marguerite G. G.
Quoirim

Coorientadora: Prof^a Dr^a Cleusa Bona

CURITIBA
2000

**“Quem é sábio procura aprender,
mas os tolos estão satisfeitos com
a sua própria ignorância”.**

Provérbios 15.14

**A minha mãe Geni F. de Souza
com muito carinho.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Professora Marguerite G. G. Quoirim pelos ensinamentos em mais de um ano de estágio. Pelas bibliografias cedidas para o desenvolvimento da monografia.

Agradeço a Kelly, colega de turma e companheira em um ano de estágio, pelos momentos de descontração, mesmo nas horas mais difíceis de trabalho.

Agradeço a professora Cecília Iritani, professora responsável pelo Laboratório de Micropropagação Vegetativa, pelo uso do laboratório e dos equipamentos no processo de inoculação.

Agradeço a professora Cleusa Bona, que me ensinou todas as técnicas histológicas, e que com muito atenção me ajudou a fotografar e a descrever os resultados obtidos. Agradeço à mesma professora, responsável pelo laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica da UFPR, local onde foram realizadas as fotos, pelo material cedido para as fotografias e pelo auxílio na utilização dos microscópios.

Agradeço ao professor Yedo Alquini, professor responsável pelo laboratório de Microtecnia Vegetal do Departamento de Botânica da UFPR, pelo uso dos equipamentos necessários para a realização dos cortes e preparo das lâminas.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
1.0 INTRODUÇÃO	01
1.1 As acácias.....	01
1.2 <i>Acacia mearnsii</i>	01
1.3 A micropropagação da acácia negra.....	01
1.4 <i>Rhodococcus fascians</i>	02
1.5 As galhas.....	04
2.0 OBJETIVOS	05
3.0 MATERIAIS E MÉTODO	05
3.1 Material Vegetal.....	05
3.2 Escarificação e semeadura.....	05
3.3 Condições da câmara de crescimento.....	05
3.4 Meios de cultura e inoculação com <i>Rhodococcus fascians</i>	05
3.5 Técnicas histológicas.....	06
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	07
4.1 Figuras.....	10
5.0 CONCLUSÃO	17
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

RESUMO

A espécie *Acacia mearnsii* é uma dicotiledônea que quando infectada com a cepa D 188 da bactéria *Rhodococcus fascians* desenvolve no local de infecção, na altura do nó cotiledonar, má formações conhecidas como galhas. Estas são cobertas por pequenas folhas. Estas galhas são formadas a partir de citocininas secretadas pela bactéria. A análise anatômica destas galhas mostra as modificações ocorridas no meristema apical e nos primórdios foliares, como consequência da presença de compostos secretados pela bactéria.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 As acácias

Pertencentes à família das Leguminosas, as acácias são árvores que vivem nos mais variados ambientes, sendo mais abundantes em regiões tropicais, o que implica em climas quentes e condições úmidas (BAILEY e BAILEY, 1976). Essas plantas geralmente apresentam folhas compostas, alternas e inflorescências vistosas (CORREIA, 1995). São originárias da Austrália e foram introduzidas no Rio Grande do Sul em 1916. Sua cultura foi sendo incrementada e hoje espalha-se por todo o Brasil (RIZZINI e MORS, 1995).

A habilidade das espécies de acácias de crescerem rapidamente em solos pobres levou a difundir seu uso em florestas, parques, em obras de estabilização de solos ou reflorestamento nas zonas de áreas degradadas (NAT. ACAD. SC., 1980).

1.2 *Acacia mearnsii*

A *Acacia mearnsii* (acácia negra) é cultivada na região Sul do Brasil onde é utilizada para a produção de taninos destinados à indústria de curtume. Na medicina, a raiz é utilizada para a produção de essências (RIZZINI e MORS, 1995). A madeira é uma alternativa econômica e tecnicamente importante, tanto para produção de energia quanto para a indústria de celulose.

É uma árvore de importância econômica também na África e Índia. Sua origem de clima sub-tropical permite seu perfeito desenvolvimento na América do Sul em climas de 17° a 23°C (NAT. ACAD. SC., 1980).

1.3 A micropropagação da Acácia negra

O processo de propagação vegetativa por micropropagação foi aplicado à espécie *Acacia mearnsii* por vários autores (CORREIA & GRAÇA, 1995; HUANG *et al.*, 1994). Utilizou-se o método de divisão de micro-estacas obtidas a partir de brotos (cada micro-estaca contendo uma gema axilar). Contudo, o material jovem utilizado na presente pesquisa apresenta uma taxa de multiplicação relativamente baixa (2 a 2,5 por

mês) (SANTOS & QUOIRIN, 1999) quando, para outras espécies lenhosas, como *Eucalyptus*, taxas de 5 a 6 por mês são alcançadas.

1.4 *Rhodococcus fascians*.

A bactéria Gram-positiva *Rhodococcus fascians* (TILFORD), (*Phytomonas fascians* (TILFORD, 1936), *Corynebacterium fascians* (TILFORD E DOWSON, 1942)) infecta grande variedade de dicotiledôneas e monocotiledôneas, resultando na indução de má formações, conhecidas como galhas (centros meristemáticos múltiplos e primórdios de brotos que não se alongam).

Nas dicotiledôneas, no local de infecção desenvolvem-se galhas que são cobertas por pequenas folhas, processo chamado de “fasciação” (FINAL SCIENTIFIC REPORT, 1998). Ocorre ainda a inibição da dominância apical resultando na formação de galhas em diferentes níveis de desenvolvimento (VEREECKE *et al.*, 1997).

Em monocotiledôneas a infecção resulta na deformação de bulbos e/ou na formação de vários brotos alongados (FINAL SCIENTIFIC REPORT, 1998).

Muitas espécies pertencentes as famílias Brassicaceae, Salicaceae, Compositae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Liliaceae, Papaveraceae, Gramineae e Fabaceae podem ser infectadas por *R. fascians* (FINAL SCIENTIFIC REPORT, 1998).

A utilização desta bactéria para obtenção de galhas constitui um novo método de micropropagação *in vitro*, uma vez que permite a proliferação de gemas a partir de tecidos meristemáticos (VEREECKE *et al.*, 2000).

A infecção de uma planta intacta pode ser obtida por infiltração sob vácuo, onde as plantas permanecem em uma suspensão bacteriana, ou aplicando a bactéria em uma superfície ferida. Outra maneira menos eficiente é aplicar a bactéria no substrato de crescimento ou sobre a superfície intacta da planta. Explantes tais como discos foliares também podem ser infectados com êxito, dando origem a galhas com folhas. Cultura de células e de calos infectados reagem da mesma maneira.

No caso da cepa D188, a propriedade de induzir a fasciação está relacionada com a presença de um plasmídeo linear de ± 200 kb, pFiD188, que carrega vários loci envolvidos na formação da galha. Mutações no locus *faz* tornam a bactéria não patogênica. Uma mutação no locus *att* provoca uma fasciação atenuada resultando em

galhas pequenas que se formam mais devagar. Finalmente, uma mutação no locus *hyp* provoca uma hiperfasciação levando à formação de galhas maiores, se comparadas com o tipo selvagem (CRESPI *et al.*, 1995). Genes cromossômicos da bactéria estão igualmente envolvidos no processo de infecção, uma vez que eles têm efeito sobre a sobrevivência de *R. fascians* como endofítica ou epifítica (GOETHALS, não publicado).

A formação de galhas resulta da modificação do balanço hormonal nos tecidos infectados. Os sintomas de fasciação se parecem com os efeitos da aplicação de diferentes concentrações de citocininas. Porém, são diferentes desses últimos devido à presença de primórdios não alongados e à ausência de brotos alongados. O estímulo de substâncias de crescimento endógeno ou reguladores químicos de crescimento acelera o metabolismo celular ativando a divisão (GEORGE, 1993).

As linhagens virulenta e não virulenta da bactéria *R. fascians* secretam citocininas quando em meio de cultura líquido. Foram detectados 11 tipos diferentes de citocininas em culturas de *R. fascians*. Entretanto estas citocininas são formadas pela bactéria independente de sua patogenicidade. A origem das citocininas secretadas é discutida assim como a sua significância no processo de fasciação das plantas (EASON *et al.*, 1996).

Um dos genes do locus *faz* codifica a isopentil transferase (IPT) que está envolvida na biossíntese de citocinina. Este é homólogo ao gene da isopentil transferase da *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi* (EASON *et al.*, 1996).

Alguns trabalhos apresentam a hipótese segundo a qual novos compostos são produzidos pela bactéria e estão ligados a uma ruptura no balanço hormonal da planta, provocando a formação de galhas (VEREECKE *et al.*, 2000). Outros trabalhos tentam provar que no início da infecção por *Rhodococcus fascians*, a bactéria produziria moléculas de citocininas que irão auxiliar no processo inicial de formação da galha. Nestas estruturas jovens há interações metabólicas entre a planta e a bactéria que resultam na produção de compostos específicos da galha atuando como indutores da expressão do gene *faz*. As citocininas modificadas, que são secretadas pela bactéria, provocam a diferenciação posterior das galhas e o crescimento (GOETHALS *et al.*, 1995).

1.4 As galhas

As galhas são constituídas por uma proliferação dos tecidos meristemáticos infectados pela bactéria (GOETHALS, 1996).

Cada galha pode ser considerada como uma planta altamente condensada onde a produção amplificada de primórdios e meristemas (apicais e axilares) está limitada a uma região compactada pela supressão dos processos de alongamento e dominância apical. A análise morfológica dessas galhas sugere uma distribuição espacial dos primórdios de acordo com as regras fundamentais da filotaxia. A bactéria pode ser destruída por agentes bactericidas e as galhas cultivadas em um meio desprovido de reguladores de crescimento e contendo bactericidas. Esse tratamento provoca o crescimento de vários brotos independentes, uma vez que a ação da bactéria foi eliminada. Cada broto pode ser transferido a um meio fresco e produzir um clone fértil. Este efeito é ainda mais dramático quando as galhas são mantidas no escuro, onde são produzidas grande quantidades de brotos estiolados, que podem ser cultivados até formarem plantas normais (VERECKE *et al.*, 2000).

Resultados preliminares obtidos por SANTOS, S.C.L. & QUOIRIN, M. (1999) mostram o desenvolvimento de galhas a partir do nó cotiledonar de *Acacia mearnsii*. Desta maneira, as gemas que se desenvolveram nas galhas, proporcionaram uma taxa de multiplicação de 3,5 a 3,7 por mês, ou seja maior do que aquela obtida por micropropagação tradicional que é de 2 a 5.

A utilização de *Rhodococcus fascians* para obtenção de galhas constitui um novo método de micropropagação *in vitro*, uma vez que permite a proliferação de gemas a partir de tecidos meristemáticos. A vantagem do método é que a adição de reguladores do crescimento ao meio de cultura não é necessária. De outro lado, se evita o risco da variação genética ou epigenética que acontece às vezes durante a micropropagação. Os problemas de vitrificação associados ao uso de uma citocinina sintética desaparecem.

Além disso, seria possível implementar um método de transformação genética da acácia negra, combinando o uso de *Agrobacterium tumefaciens* (para introdução de DNA exógeno nas células vegetais) e *Rhodococcus fascians* (para obtenção de gemas múltiplas a partir de meristemas transformados).

2.0 OBJETIVOS

- Estudar a anatomia de galhas de *Acacia mearnsii*, obtidas a partir do cultivo *in vitro*, através da observação microscópica.

3.0 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Material vegetal:

Sementes de *Acacia mearnsii* foram obtidas da empresa TANAGRO (RS).

3.2 Escarificação e Semeadura:

As sementes de *Acacia mearnsii* foram fervidas durante um minuto em água deionizada e desinfetadas com a utilização de hipoclorito de sódio 5 % por 10 minutos. Após três lavagens com água estéril, foram postas a germinar em vidros estéreis contendo algodão embebido com meio mineral MS líquido (MURASHIGE & SKOOG, 1962). As sementes foram incubadas em câmara de crescimento, pelo período de uma semana.

3.3 Condições da câmara de crescimento:

A temperatura foi de 25 +/- 2° C, o fotoperíodo de 16 horas e a luz fornecida por tubos fluorescentes, tipo “luz do dia” (aproximadamente 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

3.4 Meios de Cultura e Inoculação com *Rhodococcus fascians*:

A bactéria *Rhodococcus fascians* (cepas D 188) foi obtida do Instituto de Genética da Universidade de Gent, Bélgica. A bactéria foi cultivada em meio YEB, solidificado por 24 h, sendo em seguida transferida com palitos estéreis para frascos contendo 10 mL do meio YEB líquido e deixada em crescimento por 24 horas em agitação a 28° C.

Uma semana após a germinação, as plântulas foram colocadas nos frascos contendo a solução de bactéria e os frascos foram deixados no vácuo por cinco minutos. Logo após a plântulas foram transferida para vidros contendo meio mineral MS (MSO) adicionado de sacarose (0,1 %) e solidificado com ágar. Foi preparado um frasco controle, com plântulas não infectadas para comparar com as plântulas inoculadas.

Os vidros contendo as plântulas em meio MSO passaram a ser incubados na câmara de crescimento.

3.5 Técnicas histológicas

Para análise histológica foram confeccionadas lâminas permanentes. Foram coletadas de 2 a 5 plântulas a partir do quinto dia após a inoculação, dois dias antes da observação macroscópica das primeiras galhas. As coletas foram repetidas aproximadamente a cada três dias até o trigésimo dia após a inoculação (período em que não há mais crescimento notável das galhas), para se obter galhas em diferentes estágios de crescimento e desenvolvimento.

As plântulas coletadas foram retiradas do meio MSO e o hipocótilo e parte dos cotilédones foram retirados deixando bem aparente a região do nó cotiledonar, que é a parte de interesse.

O material foi fixado em F.A.A. 70 (SASS, 1951), a vácuo por 24 horas. Após 48 horas no fixador, o material foi transferido para álcool 70%, passando assim pelo processo de desidratação em série alcoólico-etílico e emblocado em historresina (GMA) de acordo com as técnicas de O'BRIEN (1964).

Foram realizados cortes longitudinais. As secções seriadas de espessura de 5-7 µm foram obtidas em micrótomo rotatório, distendidas em água morna e aderidas sobre lâmina. Coradas com solução aquosa de Azul de Toluidina (O'BRIEN, 1964) e a montagem com lamínula e Entelan.

As fôtos foram feitas através de fotomicrografia (MF) no microscópio ZEISS AXIOLAB e as escalas projetadas nas mesmas condições ópticas.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Acacia mearnsii* apresenta um rápido desenvolvimento *in vitro* sendo possível observar todas as características morfológicas, macroscopicamente, em uma planta com 20 dias de semeadura. A figura 01 mostra uma planta controle (sem a presença da bactéria). As galhas podem ser observadas macroscopicamente a partir do décimo dia de inoculação (Fig. 02). O desenvolvimento das galhas se dá acima do nó cotiledonar, na região das gemas axilares e meristema apical do caule, local de ação das citocininas produzidas pela bactéria, como descrito no relatório FINAL SCIENTIFIC REPORT (1998).

A estrutura do meristema apical, da planta controle de *A. mearnsii* é semelhante àquela descrita para as dicotiledôneas segundo ESAU (1974), ou seja, túnica com duas camadas de células e o corpo constituído por várias camadas celulares. O meristema apical mostra células de conteúdo denso e núcleo relativamente grande na região da túnica/corpo e procâmbio. As folhas jovens que circundam o meristema apical apresentam células epidérmicas mucilaginosas (Fig. 03).

Acacia mearnsii, após sete dias de contato com a bactéria, mostra o meristema apical do caule com alto desenvolvimento meristemático entre os primórdios foliares (Fig. 04). As células desta região apresentam citoplasma denso e núcleos relativamente grandes. Células epidérmicas mucilaginosas estão presentes nas folhas jovens e tricomas glandulares se desenvolvem na região axilar (Fig. 05). Nessa região axialr pode ser observado o início de formação das galhas (Fig. 06). VEREECKE *et al.* (1997) registrou, para tabaco inoculado com *Rhodococcus fascians*, mudanças qualitativas e quantitativas nos conteúdos fenólicos das galhas. Seções de galhas de tabaco foram analisadas mostrando a presença de muitas células meristemáticas, como observado em *Acacia mearnsii*. VEREECKE *et al.* (2000) descreve o desenvolvimento de galhas nas regiões do meristema axilar em *Atropa belladonna* formadas a partir da presença da *R. fascians*, esta situação foi registrada em *Acacia mearnsii* (Fig. 06).

A plântula com onze dias de inoculação apresenta desenvolvimento na região do meristema apical devido a formação de protuberâncias (galhas) causadas pela presença da bactéria. Segundo ESAU (1974), a zona periférica do meristema apical apresenta

forte atividade mitótica, o que leva a crer que a presença de substâncias liberadas pela bactéria *R. fascians* acelera ainda mais o metabolismo celular levando à formação de galhas em toda a região meristemática da planta inclusive nas folhas jovens (Fig. 07). Para VEREECKE *et al.* (1997), a infiltração a vácuo de tabaco com *R. fascians* provoca um acúmulo do 7-metil esculina, derivada da coumarina, na planta. Segundo esse autor esta substância poderia estar relacionada com o aparecimento de galhas nos meristemas axilares e nas nervuras das folhas.

Em plântulas com doze dias de inoculação (Fig. 08) observou-se um aumento no número de galhas quando comparadas com plântulas com onze dias de inoculação (Fig. 07) mostrando a ação intensa das substâncias liberadas pela bactéria. Para BINS *et al.* (1987) a citocinina exógena controlaria a divisão celular intensa em algumas espécies de dicotiledôneas.

Estas protuberâncias (galhas) estão presentes também nos pecíolos (Fig. 09) mostrando que a atuação da bactéria se faz em toda a região do caule e nas folhas jovens. Entretanto em infecções via infiltração realizadas por VEREECKE *et al.* (1997), em plantas de tabaco, as galhas se formam nas margens das folhas e nas nervuras.

A colonização da plântula pela bactéria é tão intensa que pode ser observada microscopicamente, em plântulas com apenas doze dias de inoculação (Fig. 10), onde a bactéria está presente, na região periférica do meristema.

Em *Acacia mearnsii*, o desenvolvimento acelerado pela bactéria se dá essencialmente nos meristemas apicais. Segundo VEREECKE *et al.* (1997), a infecção por *R. fascians* afeta as espécies arbóreas nos meristemas localizados nos ápices dos brotos, como registrado em *Acacia mearnsii*. VEREECKE *et al.* (2000) comparou uma planta controle de *Atropa belladonna* com plantas com galhas da mesma espécie, o autor observou que a bactéria acelerou o processo de expansão dos meristemas laterais da planta mas não provocou o alongamento dos meristemas intercalares (Fig. 10a). Para *Atropa belladonna*, o autor diz que a presença de citocinina exógena provoca a formação de galhas com centros meristemáticos múltiplos, acelerando o processo de desenvolvimento lateral mas tem pouco efeito no desenvolvimento do meristema intercalar. O mesmo é observado para a *Acacia mearnsii* que aparentemente não sofre nenhuma alteração em seus meristemas intercalares com a presença de citocinina

(Fig.11 e 12). As células da região apical apresentam citoplasma mais denso que a planta controle e núcleos grandes, sendo possível até mesmo localizarmos o nucléolo (fig.13). Estudos realizados por ESTRUCH *et al.* (1991) e JAZIRI *et al.* (1994) mostram que a super produção de citocininas poderia induzir a divisão celular aumentando assim o desenvolvimento da planta e sua diferenciação celular.

FIGURAS



Fig 01- Aspecto da planta de *Acacia meathii* sem agente molucante com 30 dias de semeadura. 02-Planta com agente molucante com 30 dias de molucação.

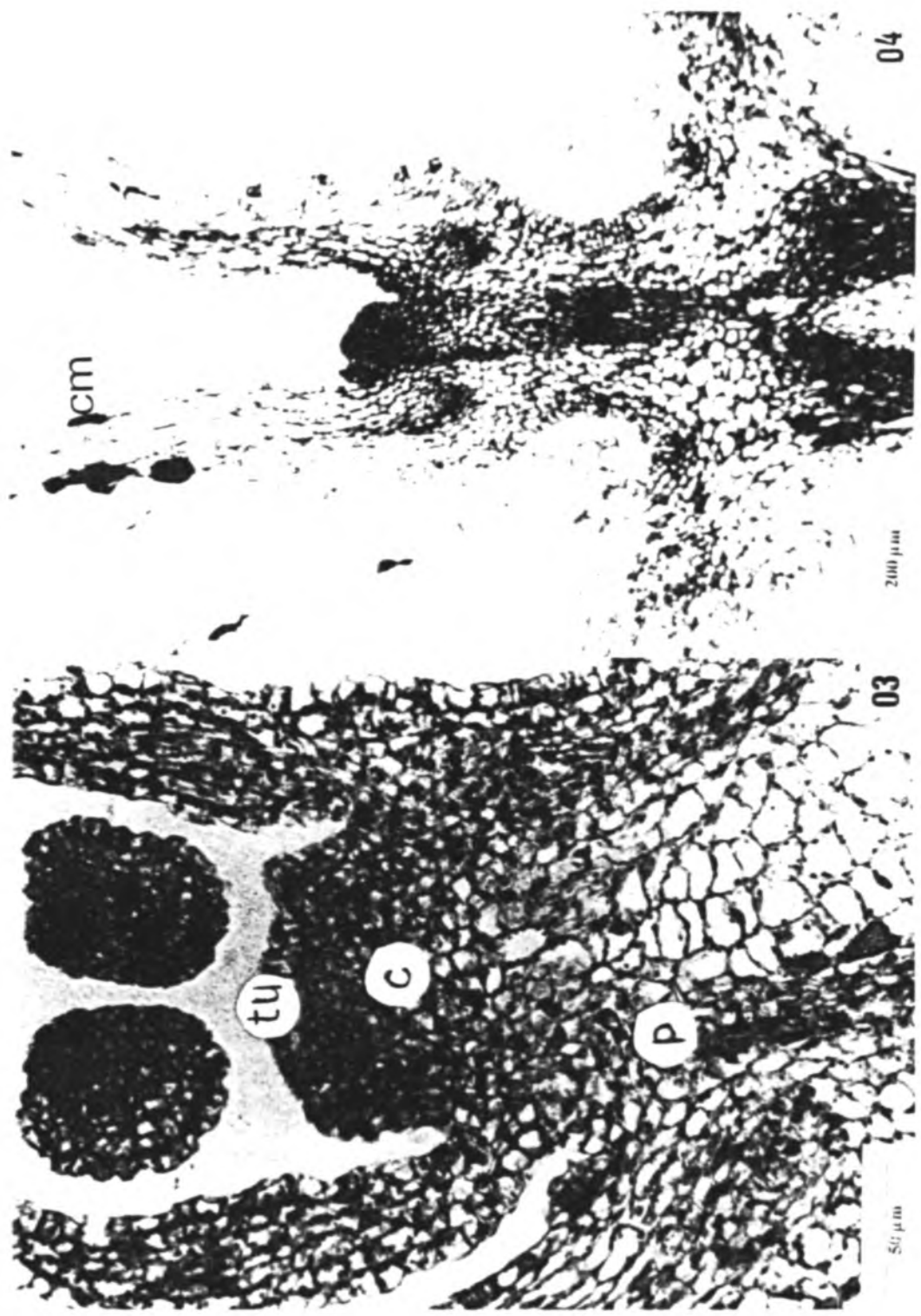


Fig 03- Seção longitudinal do ápice caulinar de uma plântula controle. (tu) tunica, (c) corpo, (p) procâmbio; 04- Seção longitudinal do ápice do caule de uma plântula com 7 dias de inoculação, (cm) células mucilaginosas.

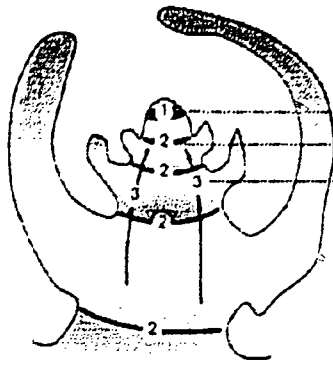


Fig. 05 e 06- Secções longitudinais do ápice do caule de plântula, com 7 dias de *nodulização*, destacando o início de formação das palhas: (→) (t) tricoma glandular na região azilar; (tu) túnica; (c) corpo



Fig.07 a 10- Seções longitudinais do ápice caulinar. 07- galhas com 11 dias de inoculação nos primórdios foliares e na região apical; 08- Galhas com 12 dias de inoculação; 09- Galhas no pecíolo de uma plântula com 12 dias de inoculação; 10- Bactéria *Rhodococcus fascians* (\Rightarrow) na periferia do meristema apical. (tu) túnica; (c) corpo; (g) galhas.

10a



	Normal plant	<i>P. fascians</i>	Exogenous Cytokinin
1. Leaf formation	+	+++	++
2. Lateral expansion	+	++	+
3. Elongation intercalary meristem	+	---	+/-

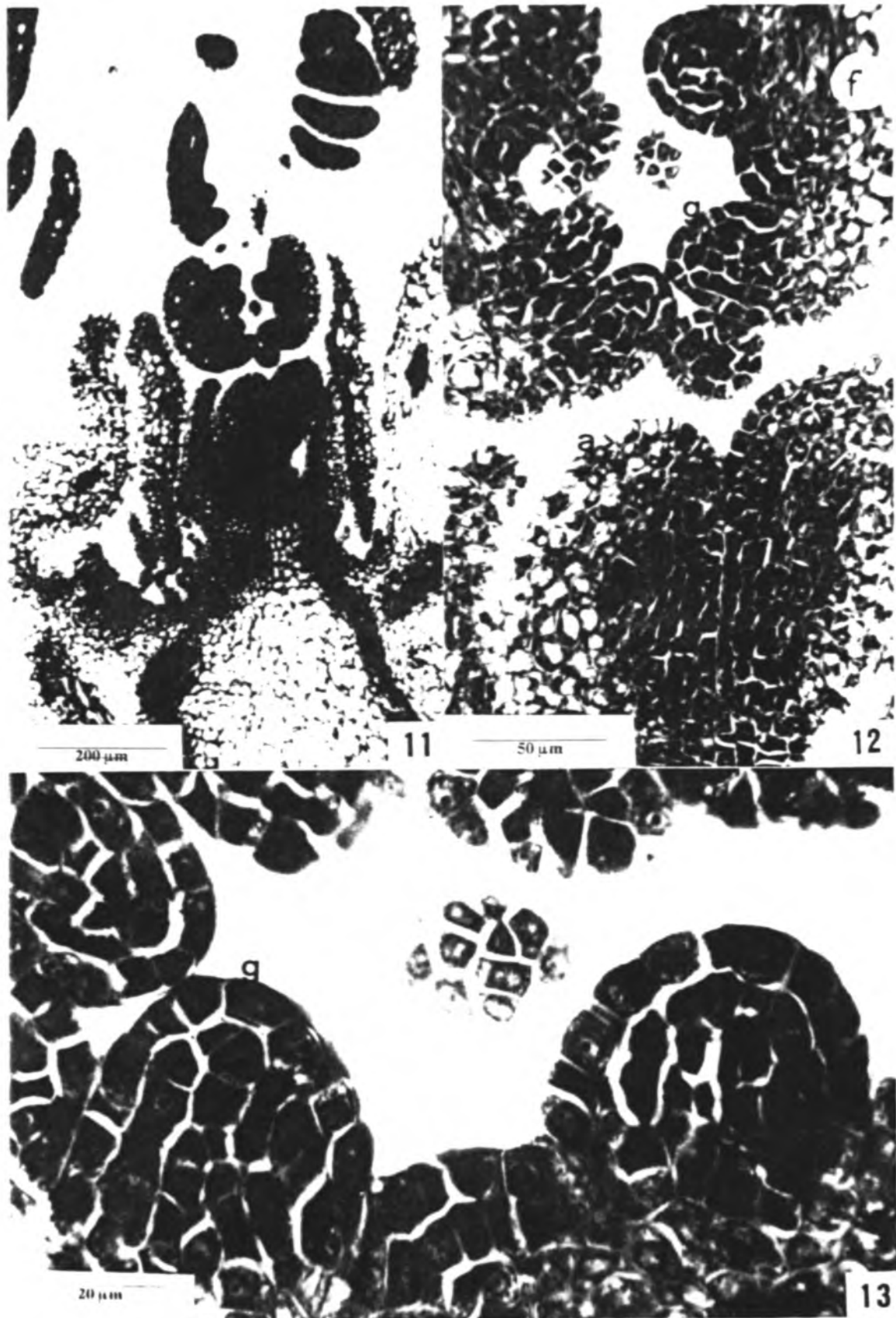


Fig. 11 a 13- Seções longitudinais do meristema apical do caule em plântulas com 22 dias de inoculação, evidenciando a formação de galhas. 11- Vista geral; 12- Por menor do ápice do caule e folhas jovens; 13- Por menor de galhas na região das folhas. (a) ápice do caule; (f) folhas; (g) galhas.

5.0 CONCLUSÃO

A análise anatômica de galhas de *Acacia mearnsii* induzidas pela bactéria *Rhodococcus fascians* mostra que as substâncias liberadas pela bactéria, atuam nos meristemas apicais e nos primórdios foliares, provocando um aumento na divisão celular e conseqüentemente alterações morfológicas nestes locais.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, L.H., BAILEY, E.Z. *Acacia*. Hortus third. New York State College of the Agriculture and Life Sciences, Cornell University. New York: Mac Millan Publishing Company, 4, 1976.

BINNS, A.N., CHEN, R.H., WOOD, H.N., LYNN, D.G. Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: do cell wall components control cell division? Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 980-984, 1987.

CORREIA, D., GRAÇA, M.E.C. *In vitro* propagation of black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild). IPEF. 48/49: 117-125, 1995.

CRESPI, M., VEREECKE, D., TEMMERMAN, W., VAN MONTAGU, M., DESOMER, J. The *fas* operon of *Rhodococcus fascians* encodes new genes required for efficient fasciation of host plants. J. Bacteriol. 176: 2492-2501, 1995.

EASON, J.R., MORRIS, R.O., JAMESON, P.E. The relationship between virulence and cytokinin production by *Rhodococcus fascians*. Plant Pathology. Vol 45, nº 2 pp 323-331, 1996.

ESAU, K. Anatomia das plantas com sementes. 12ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 1974.

ESTRUCH, J.J., PRINSEN, E., VAN ONCKELEN, H., SCHELL, J., SPENA, A. Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. Science. 254:1364-1367, 1991.

FINAL SCIENTIFIC REPORT. Improving the growth of tropical nitrogen-fixing forest trees in the genera *Acacia* and *Casuarina* through tissue culture and genetic transformation, 1998.

GEORGE, E.F. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1, The Technology. 2^a ed. England : Excegenetics Limited, p. 15, 1993.

GOETHALS, K., VERRECKE, D., TEMMERMAN, W., MAES, T., KALKUS, J., SIMÓN-MATERO, C., VAN MONTAGU, M. Cytokinin production by the phytopathogenic bacterium *Rhodococcus fascians*. Med. Fac. Landbouwwet Univ. Gent, Belgium. 60/4 a: 1553-1558, 1995.

GOETHALS, K., VEREECKE, D., VAN MONTAGU, M. Molecular Analysis of the Phytopathogen *Rhodococcus fascians*, the cause of leafy gall formation. In Biology of Actinomycetes. V. Danilenko (Ed.). Moscow, 1996.

HUANG, F.H., AL-KHAYRI, J.M., GBUR, E.D. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. Tissue Culture Association, 1994.

JAZIRI, M., YOSHIMATSU, K., HOMÈS, J., SHIMOMURA, K. Traits of transgenic *Atropa belladonna* doubly transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. Plant Cell Tissue Organ Cult., 38:257-262, 1994.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-442, 1962.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. *Acacia mearnsii*. In: Firewood crops: shrubs and tree species for energy production. Washington, D.C. Nat. Acad. Press, p. 72-73, 1980.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N., Mc CULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma. 59: 368-373, 1964.

RIZZINI, C.T., MORS, W.B. Botânica econômica brasileira. 2^a ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições LTDA, 1995.

SANTOS, S.C.L., QUOIRIN, M. Regeneração de gemas em tecidos de *Racosperma* (ex-*Acacia*) e *Acacia mearnsii* cultivados *in vitro*. EVINCI, 1999.

SASS, J.E. Botanical microtechnique. 2ª ed. The Iowa State College Press, 1951.

TILFORD, P.E. Fasciation of sweet peas caused by *Phytomonas fascians* n. sp. J. Agric. Res. 53: 383-394, 1936.

VEREECKE, D., MESSENS, E., KLARSKOV, K., BRUYN, A.D., VAN MONTAGU, M., GOETHALS, K. Molecular analysis of the virulence determinants of the phytopathogen *Rhodococcus fascians*. Planta 201: 342-348, 1997.

VEREECKE, D., BURSENS, S., SIMON-MATEO, C., INZE, D., VAN MONTAGU, M., GOETHALS, K., JAZIRI, M. The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. Planta 210:241-251, 2000.