

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA DESCONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES DE BACURIZEIRO (*Platonia insignis* Mart.)**ESTABLISHMENT OF PROTOCOL FOR DECONTAMINATION OF LEAF EXPLANTS OF *Platonia insignis* Mart.**

Maurício Reginaldo Alves dos Santos¹
Sâmela Emanuela da Silva Chagas²
Milene de Castro Melo Guimarães³

RESUMO: O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie arbórea nativa da Amazônia Oriental Brasileira. É consumido *in natura* e utilizado na fabricação de sorvetes, doces, compotas e sucos. Objetivou-se neste trabalho o estabelecimento de um protocolo eficiente de descontaminação de explantes foliares, visando à sua introdução em estudos de calogênese e embriogênese somática. As folhas foram lavadas em água destilada com auxílio de esponja e detergente. Em câmara de fluxo laminar, as folhas foram imersas em álcool a 70% (v/v) por 1 minuto e em seguida em soluções de hipoclorito de cálcio nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 2,5, 5,0 e 10,0% (p/v), durante 30 minutos, sendo, em seguida, segmentadas em fragmentos de 1 cm², os quais foram inoculados em meio de cultivo MS. Metade dos explantes foi inoculada com a epiderme adaxial em contato com o meio de cultura e a outra metade com a epiderme abaxial voltada para o meio. Cada unidade experimental foi constituída de 10 explantes. Os cultivos foram mantidos no escuro, a 24±2°C. Sete dias após a inoculação foram avaliadas as porcentagens de contaminação fúngica e bacteriana, e de explantes necrosados. Os tratamentos mais eficazes para a desinfestação foram as concentrações de 0,25, 0,5 e 0,75% de hipoclorito de cálcio, resultando em descontaminação total dos explantes, sendo que os tratamentos com 1,0, 1,25, 2,5, 5,0 e 10,0% de hipoclorito de cálcio resultaram em alto nível de necrose (100%), independente da superfície da folha em contato com o meio. Os explantes com superfície abaxial em contato com o meio continuaram verdes, enquanto os explantes com a superfície adaxial em contato com o meio necrosaram. Considerando-se as variáveis avaliadas, recomenda-se a utilização de 0,25% de hipoclorito de cálcio e a posição do explante com a epiderme abaxial em contato com o meio de cultura.

PALAVRAS-CHAVE: *Platonia insignis*. Cultura de tecidos vegetais. Hipoclorito de cálcio. Estabelecimento *in vitro*. Descontaminação de explantes.

ABSTRACT: *Platonia insignis* Mart. is a bush species native to the Eastern Brazilian Amazon. It is consumed *in natura* and in preparations like ice cream, sweeties, jams and juices. The objective of this work was the establishment of an efficient protocol for surface sterilization of leaf explants aiming at its introduction in callogenesis and somatic embryogenesis studies. The leaves were washed with distilled water and a detergent agent. In a laminar flow hood they were immersed in alcohol 70% (v/v) for 1 minute and then immersed in calcium hypochlorite solutions 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 2.5, 5.0 or 10.0% (w/v) during 30 minutes, rinsed three times in distilled water, and cut in 1cm² fragments, which were inoculated in MS medium. Half of the explants were inoculated with the abaxial epidermis in contact with the medium and half with the adaxial epidermis facedown. Each experimental unit was represented by 10 explants. The cultures were kept in the dark at 24±2°C. Seven days after inoculation the percentages of contamination and necrosis of the explants were evaluated. The most efficient were the concentrations of 0.25, 0.5 and 0.75% calcium hypochlorite, which resulted in total sterilization of the explants. Treatments with 1.0, 1.25, 2.5, 5.0 and 10.0% calcium hypochlorite resulted in high level of necrosis (100%), independent of the side in contact with the medium. All the abaxial side facedown explants kept green and the adaxial ones became necrotic. It is recommendable 0.25% calcium hypochlorite in the surface sterilization and the abaxial epidermis in contact with the culture medium.

KEYWORDS: *Platonia insignis*. Plant tissue culture. Calcium hypochlorite. *In vitro* establishment. Explant decontamination.

¹Biólogo, Doutor em Agronomia, Embrapa Rondônia, mauricio.santos@embrapa.br

²Bióloga, Especialista em Metodologia do Ensino Superior, Faculdade São Lucas, samelapvh@hotmail.com

³Bióloga, Mestranda em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Universidade Federal de Rondônia, milenemel_21@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie arbórea de uso múltiplo (fruto, madeira, látex) nativa da Amazônia Oriental Brasileira. Seus frutos ocupam posição de destaque na preferência dos consumidores dos estados do Pará, Piauí e Maranhão, onde se encontram diversificadas populações naturais (SOUZA et al., 2000).

O bacurizeiro pertence à família Clusiaceae, subfamília Clusioideae, gênero *Platonia*, espécie *Platonia insignis* Mart. (BRAGA, 1976). O nome genérico *Platonia* é uma homenagem ao filósofo grego Platão (BARROSO et al., 2002). A palavra *insignis* significa notável, insigne, importante, grande, que chama a atenção (RIZZINI & RIZZINI, 1983; FERREIRA, 1998), em referência indireta ao porte e à utilidade da planta, e também ao tamanho, sabor e aroma do fruto.

A palavra bacuri vem do tupi, onde “ba” significa – cair e “curi” – logo, isto é, o que cai logo que amadurece (FONSECA, 1954). O bacuri é um fruto do tamanho de uma laranja, redondo, com casca grossa, e de cor amarelo-citrina, contendo polpa viscosa e muito saborosa. Quando maduro, exala um perfume suave e fragrante, que se assemelha ao jasmim (FONSECA, 1954). A produção de bacuri não tem sido suficiente para atender à crescente demanda do mercado consumidor; portanto, a médio ou a longo prazos, essa espécie pode estabelecer-se como uma nova e excelente alternativa para os mercados interno e externo de frutas (SILVA et al., 2010). É consumido *in natura* e utilizado na fabricação de sorvetes, doces, compotas e sucos. Embora a espécie seja mais conhecida como planta frutífera, produz madeira com boas características físico-mecânicas, utilizada na fabricação de móveis, caibros, estacas, dormentes, ripas, embalagens pesadas e tacos (MAINIERI & LOUREIRO, 1964; LOUREIRO et al., 1979; MAINIERI & CHIMELO, 1989; PAULA & ALVES, 1997). Além de ser uma planta frutífera e madeireira, suas sementes podem ser utilizadas para extração de óleo, fornecendo ainda como subproduto um farelo que contém 16% de proteína (PESCE, 1941).

Contudo, por não constituir ainda uma cultura comercialmente estabelecida, a produção de frutos do bacurizeiro é decorrente, na quase totalidade, de atividades extrativistas, sendo raros os pomares com essa espécie. Entre os fatores limitantes

para o cultivo racional do bacurizeiro destacam-se: a falta de técnicas adequadas para a produção de mudas; o longo período de juvenilidade; e a heterogeneidade da produção de plantas propagadas por meio de sementes (RODRIGUES, 2000).

As folhas do bacurizeiro são opostas e simples, pecioladas, de textura subcoriácea a coriácea, obovadas, de formato elíptico-obovadas, ovadas ou elípticas, lâmina foliar simétrica, margens inteiras e bordos ondulados, medindo de 15 a 20 cm de comprimento e de 6 a 9 cm de largura. São lisas e verdes brilhosas na face superior. Apresentam ápice e base agudos, nervuras laterais densas, delicadas e numerosas, paralelinérveas, aproximadas entre si e salientes nas duas faces (MOURÃO & BELTRATI, 1995; MANICA, 2000).

A cultura de tecidos vegetais ou micropropagação é uma ciência que detém as técnicas por meio das quais pequenos fragmentos de tecido vegetal, designados explantes, são cultivados em meio nutritivo sob condições assépticas (REZENDE, 2005). A aplicação destas técnicas tem como principais vantagens o rápido aumento do número de indivíduos e a possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade (ECHEVERRIGARAY et al., 2001).

O cultivo *in vitro* é um método viável para propagação clonal e massal de diversas espécies florestais e vem sendo utilizado com sucesso. Entretanto, um dos maiores obstáculos no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias, além dos compostos fenólicos que provocam oxidação nos explantes. (THORPE et al., 1991; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; LANDA et al., 2000). Os fungos e bactérias agem de forma indireta, comprometendo o desenvolvimento normal dos cultivos pela competição por nutrientes e vitaminas do meio de cultura e pela produção de metabólitos fitotóxicos, como os ácidos láctico e acético e o cianeto (LIMA & MORAES, 2006).

Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes utilizadas como fonte de explantes são originadas do campo. Contudo, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de microorganismos, que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (MEDEIROS,

1999). A descontaminação consiste em eliminar estes microrganismos, porém preservando o material vegetal a ser regenerado (RAZDAN, 2003).

Várias substâncias germicidas à base de cloro são utilizadas para descontaminação dos explantes; as mais comuns são o hipoclorito de sódio, encontrado em formulações comerciais de água sanitária, ou hipoclorito de cálcio, encontrado na forma de pó em lojas de material para piscina (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Segundo Domini et al. (2005), o mecanismo de ação do cloro ativo não é bem conhecido, embora algumas hipóteses sugiram que há uma combinação com proteínas da membrana celular dos microrganismos, formando compostos tóxicos e levando à inibição das enzimas essenciais, provocando, assim, a necrose não só dos agentes infestantes mas também do material biológico.

A fim de contribuir com os estudos nessa cultura, objetivou-se o estabelecimento de um protocolo eficiente de descontaminação de explantes foliares de bacurizeiro, visando à sua introdução em sistemas de calogênese e embriogênese somática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas como fonte de explantes, folhas jovens, oriundas de bacurizeiros mantidos no campo experimental da Embrapa Rondônia, em Porto Velho-RO. Os materiais foram conduzidos ao laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, onde passaram por uma pré-limpeza, sendo lavadas em água destilada com auxílio de esponja e detergente. Em câmara de fluxo laminar, as folhas foram submersas em álcool 70% (v/v) por um minuto e em seguida em soluções de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 2,5, 5,0 e 10,0% (p/v) de hipoclorito de cálcio, durante 30 minutos, sendo em seguida enxaguadas três vezes com água destilada. As folhas foram segmentadas em placas de Petri, com a ajuda de bisturi, em fragmentos de 1 cm². Estes explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), sem reguladores de crescimento, acrescido de 3,0% de sacarose e solidificado com 0,8% de ágar, pH ajustado para 5,8. Metade dos explantes foi inoculada com a epiderme adaxial em contato com o

meio de cultura e a outra metade com o lado abaxial para baixo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada unidade experimental constituída de 10 explantes. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, no escuro, a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 7 dias verificaram-se as porcentagens de contaminação fúngica e bacteriana, e de explantes necrosados (FERREIRA et al., 2009). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, observa-se que todas as concentrações de hipoclorito de cálcio resultaram em 100% de descontaminação dos explantes, porém somente as concentrações 0,25, 0,5 e 0,75% por 30 minutos foram eficientes, quando os explantes foram inoculados com a superfície abaxial em contato com o meio de cultivo. Estes explantes, além de totalmente descontaminados, continuaram verdes, diferindo significativamente dos tratamentos nos quais os explantes foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultivo e também dos tratamentos com maiores concentrações de hipoclorito de cálcio, nos quais se observou necrose de todos os explantes, tanto do lado abaxial como do lado adaxial.

Tabela 1. Porcentagens de contaminação e necrose de explantes foliares de *Platonia insignis* Mart. submetidos à imersão em soluções de hipoclorito de cálcio durante 30 minutos e subsequente inoculação com as superfícies abaxial ou adaxial em contato com o meio de cultivo.

Hipoclorito de cálcio (%)	Superfície em contato com o meio	Contaminação (%)	Necrose (%)
0,25	Abaxial	0 (a)	0 (b)
0,25	Adaxial	0 (a)	100 (a)
0,50	Abaxial	0 (a)	0 (b)
0,50	Adaxial	0 (a)	100 (a)
0,75	Abaxial	0 (a)	0 (b)
0,75	Adaxial	0 (a)	100 (a)

1,00	Abaxial	0 (a)	100 (a)
1,00	Adaxial	0 (a)	100 (a)
1,25	Abaxial	0 (a)	100 (a)
1,25	Adaxial	0 (a)	100 (a)
2,50	Abaxial	0 (a)	100 (a)
2,50	Adaxial	0 (a)	100 (a)
5,00	Abaxial	0 (a)	100 (a)
5,00	Adaxial	0 (a)	100 (a)
10,0	Abaxial	0 (a)	100 (a)
10,0	Adaxial	0 (a)	100 (a)

*Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Santos et al. (2011), utilizando hipoclorito de cálcio a 5,0 e 10,0% obtiveram descontaminação de explantes foliares de *C. verticillata*, porém a maior concentração desta solução resultou em necrose dos explantes. Já Rocha et al. (2007) obtiveram resultados satisfatórios utilizando as concentrações de 5,0 e 10,0% de hipoclorito de cálcio em explantes de bananeira 'prata anã (ABB)'. Resultados similares foram observados por Cordeiro (1999), ao utilizar como desinfestante o hipoclorito de cálcio 5,0% em explantes foliares de *Coffea canephora* e *C. arábica*; e Heloir et al. (1997), em gemas axilares de videira *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir. Já Borelli et al. (1990) observaram altos índices de contaminação utilizando hipoclorito de cálcio nas concentrações de 1,0, 2,0, 4,0 e 6,0% em esporos *in vivo* e *in vitro* de pteridófitas (*Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook e *Cyanthea schanshin* Mart.); O tratamento mais eficiente foi o desinfestante a 2%. Ferrador & Marques (2005) obtiveram uma porcentagem de 30% de necrose ao utilizar o hipoclorito de cálcio a 10% em explantes de *Castanea sativa* Mill.

Um processo de desinfestação eficaz é aquele que combina baixas taxas de contaminação e de necrose, com a menor exposição possível ao agente descontaminante (TORRES et al., 1998). Deste modo, no presente estudo com explantes foliares de *Platonia insignis*, verificou-se que a imersão durante 30 minutos em soluções de 0,25, 0,5, 0,75% de hipoclorito de cálcio foram as mais

eficientes para a desinfestação, seguida de inoculação dos explantes com a superfície abaxial em contato com o meio para evitar a necrose dos mesmos.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos conclui-se que para evitar a contaminação *in vitro* de explantes foliares de bacurizeiro durante o estabelecimento, recomenda-se imersão em solução de hipoclorito de cálcio a 0,25% durante 30 minutos, com a superfície abaxial em contato com o meio, o que resulta em descontaminação total dos explantes, sem necrose dos tecidos, aumentando a percentagem de sobrevivência e estabelecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. Viçosa-MG: UFV, v. 1, 2 ed., 2002. 309p.

BORELLI, F. P.; CASTRO, C. E. F.; MATTHES L. A. F.; TOMBOLATO, A. F. C.; NAGA, V. Propagação de pteridófitas *in vitro* e *in vivo* através de esporos. **Bragantia**, v. 49, n. 2, p. 205-219, 1990.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. Mossoró: ESAM, 1976. 540p.

CORDEIRO, A. T. **Embriogenese somática e fusão interespecífica de protoplastos em Coffea**. 1999. 126p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1999.

DOMINI, L. P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A.P.; SOUZA, J.A.; VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.

ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L. B.; DELAMARE, A. P. L.; ZENI, A. L. B.; CARRER, R. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 257-276.

FERRADOR, S.; MARQUES, G. Contaminações Endógenas na Micropropagação de *Castanea sativa* Mill. **Acta Horticulturae**, v. 693, p. 349-354, 2005.

FERREIRA, A. G. **Dicionário de latim-português**. Lisboa: Porto, 1998. 1240p.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. **Saber Científico**, v. 2, n. 2, p. 37-44, 2009.

FONSECA, E. T. **Frutas do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Livro, 1954. 281p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998, v. 1, p. 183-260.

HELOIR, M. C.; FOURNIOUX, L.; OZIOL, L.; BESSIS, R. An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* L. Pinot Noir) using auxiliary-bud microcuttings. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, v. 49, p. 223-225, 1997.

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO FILHO, J. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24 (Ed. Especial), p. 56-63, 2000.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa aaa* cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 3, p. 181-186, 2006.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F.; ALENCAR, J. C. **Essências madeireiras da Amazônia**. Manaus: CNPq/INPA, v.1, 1979. 245p.

MAINIERI, C.; LOUREIRO, A. A. **Madeiras de *Simphonia globulifera* L., *Platonia insignis* Mart., *Moronobea coccinea* Aubl. e *Moronobea pulchra* Ducke (Gutiferaceae): estudo anatômico macro e microscópico, como contribuição para a sua identificação**. Belém: CNPq/INPA, 1964. 27p.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P. **Fichas de características de madeiras brasileiras**. São Paulo: IPT, 2 ed., 1989. 418p.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas, 1: técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biriba, carambola, cereja-do-rio-grande, jabuticaba**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000. 327p.

MEDEIROS, C. P. C. **Indução *in vitro* de respostas morfogenéticas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. 1999. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

MOURÃO, K. S. M.; BELTRATI, C. M. Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). I. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 25, n. 1/2, p. 11-31, 1995.

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

PAULA, J. E.; ALVES, J. L. H. **Madeiras nativas - anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso**. Brasília: Empresa Gráfica Gutenberg Ltda., 1997. 541p.

PESCE, C. Oleaginosas da Amazônia. **Revista da Veterinária**, 1941. 130p.

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

REZENDE, J. C. **Desenvolvimento de embriões e plântulas de *Coffea arabica* L. oriunda de embriogênese somática direta**. 2005. 58p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

RIZZINI, C. T.; RIZZINI, C. M. **Dicionário botânico clássico latino-português abonado**. Rio de Janeiro: IBDF/Jardim Botânico, 1983. 283p.

ROCHA, H. S.; SILVA, C. R. R.; ARAUJO, A. G.; SILVA, A. B. Propagação *in vitro* de bananeira 'prata anã (aab)': Intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 3, n. 1, p. 10-16, 2007.

RODRIGUES, E. F. **Desenvolvimento do eixo embrionário *in vitro* e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willdenow ex Sprengel) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Martius)**. 2000. 60p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)- FCAV, UNESP, Jaboticabal, 2000.

SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; ROCHA, J. F.; CARVALHO, S. M. S. Pré-tratamento para estabelecimento *in vitro* de fragmentos foliares de *Cissus verticillata* (L) Nicolson & C.E. Jarvis. **Saber Científico**, v. 3, n. 1, p. 91-98, 2011.

SILVA, V. K. L.; FIGUEIREDO, R. W.; BRITO, E. S.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, E. A. T. Estabilidade da polpa do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) congelada por 12 meses. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1293-1300, 2010.

SOUZA, V. A. B.; VASCONCELOS, L. F. L.; ARAÚJO, E. C. E.; ALVES, R. E. **Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 72p. (série frutas nativas, 11)

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. v. 2. 298p.