

# Documentos

---

ISSN 1517-3135  
Novembro, 2012

99

## Anais da VIII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Occidental



**Embrapa**

*ISSN 1517-3135*

*Novembro, 2012*

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Ocidental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Documentos 99***

### **Anais da VIII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**

*Ronaldo Ribeiro Moraes  
Cheila de Lima Bojjink  
Katia Emidio da Silva  
Regina Caetano Quisen*

Embrapa Amazônia Ocidental  
Manaus, AM  
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Amazônia Ocidental**

Rodovia AM 010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *André Luiz Atroch, Edsandra Campos Chagas, José Clério Rezende Pereira, Kátia Emídio da Silva, Lucinda Carneiro Garcia, Maria Augusta Abtibol Brito, Maria Perpétua Beleza Pereira, Paulo César Teixeira, Rogério Perin, Ronaldo Ribeiro de Moraes e Sara de Almeida Rios.*

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Capa: *Lúcio Rogerio Bastos Cavalcanti*

**1ª edição**

1ª impressão (2012): 300

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.**

**Embrapa Amazônia Ocidental.**

---

Morais, Ronaldo Ribeiro et al.

Anais da VIII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / (editado por) Ronaldo Ribeiro Moraes et al.

- Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2012.

87 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 99).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Ciência. I. Título. II. Série.

CDD 501

# **Cultivo in Vitro de Espécies Florestais Tropicais – Controle de Contaminação e Estabelecimento de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*)**

---

*Marcos Cauper Duarte Veltlari  
Regina Quisen*

## **Resumo**

O sucesso da introdução de explantes in vitro depende das condições de assepsia em geral. A inobservância desse fator constitui um dos principais entraves ao avanço da micropropagação de espécies tropicais, já que pode ocorrer perda de material vegetativo e do meio de cultura. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de desinfestação de explantes de espécies florestais de interesse econômico como subsídio para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação e embriogênese somática. Para tal, foram desenvolvidos ensaios com segmentos foliares e nodais retirados de mudas de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), que foram submetidos a vários tratamentos de assepsia com diferentes agentes desinfestantes, concentrações e tempos de exposição dos tecidos. Os explantes foram inoculados em meio MS suplementado com sais, sacarose e ágar e mantidos em ambiente escuro com temperatura de  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dentre os diversos aplicados nos diferentes experimentos avaliados, observou-se tolerância dos explantes de castanheira ao tratamento com cloreto de mercúrio. Os resultados obtidos demonstraram a necessidade da ampliação de

testes com combinações de princípios ativos e tempos de exposição para o sucesso do estabelecimento de explantes assépticos de castanheira-do-brasil.

**Palavras-chave:** cultura de tecidos vegetal, espécies lenhosas.

## Introdução

O uso da técnica de cultura de tecidos vegetais em diversas espécies florestais indica a possibilidade de obtenção, num curto espaço de tempo, de grandes quantidades de novas plantas a partir de um único explante em subcultivos periódicos. No entanto, essa alternativa para a conservação e utilização do potencial econômico dessas espécies ainda necessita de pesquisas básicas e do desenvolvimento de protocolos de multiplicação *in vitro* para seu perfeito entendimento e utilização no setor de produção.

Dentre os grandes benefícios da aplicação dessa técnica no melhoramento genético florestal e na propagação de espécies está a possibilidade de identificar e fixar componentes aditivos e não aditivos da variabilidade genética por meio da propagação clonal, principalmente para aquelas espécies de grande valor econômico e ecológico cuja produção de mudas apresenta algum tipo de limitação (GUERRA e NODARI, 2006).

Na cultura de tecidos de plantas, que consiste num conjunto de técnicas nas quais um tecido (explante) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (HARTMAN et al., 2005), um dos principais entraves para seu desenvolvimento é a contaminação do meio nutritivo por fungos, bactérias, leveduras, vírus e viroides. Esse tipo de contaminação estabelece-se no meio e/ou material vegetal, que pode ser patogênico para as plantas *in vitro*, ou latente, competindo pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas e inibindo desenvolvimento do explante, ocasionando, assim, a sua perda.

Em princípio, existem quatro fontes de contaminação: a fonte de explante, o meio nutritivo, o ambiente e o operador (habilidade). O mais importante destes é o explante que deve ser submetido à desinfestação antes de sua inoculação, a fim de eliminar microrganismos exógenos. Neste sentido, para prevenir ou eliminar a contaminação, várias pesquisas têm sido realizadas, as quais vão desde os estudos de medidas de assepsia (ERIG e SCHUCH, 2003) até o uso de meio de cultura com produtos antimicrobianos (SILVA et al., 2003; PEREIRA e FORTES, 2003; HANDA et al., 2005). Entre as substâncias com ação germicida, as mais comuns são o etanol e os compostos à base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Outros agentes incluem o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônio e o peróxido de hidrogênio. Também são citados ácidos ou bases como o isopropanol e algumas substâncias do grupo das bases quaternárias, como os triquartenários de amônio (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A maioria das pesquisas relata o uso de substâncias como hipoclorito de sódio e etanol 70% e, em alguns casos, a adição de antibióticos ao meio de cultura (GARCIA e RAFAEL, 1990; LEIFERT et al., 1991; BUCKLEY et al., 1995; TANPRASET e REED, 1998; REED et al., 1998). Entre as espécies florestais tropicais, citam-se metodologias assépticas com canjarana (ROCHA, 2005), cedro (NUNES et al., 2002) e *Miconia* sp. (CID et al., 1997). Mais recentemente novos produtos estão sendo testados como o PPM® (Plant Preservative Mixture) que apresenta restrição quanto a seu uso em associação à autoclavagem, utilizado apenas para prevenir contaminações após o processo (ERIG e SCHUCH, 2002).

Além dos produtos citados, para minimizar as contaminações é recomendável cultivar a planta matriz da qual serão coletados os explantes, em condições parcialmente controladas, como telados com cobertura plástica ou casa de vegetação. O cultivo de plantas nesses ambientes permite maior controle de irrigação, adubação e de pragas e doenças.

Portanto, esses avanços na geração de informações no que se refere às metodologias de assepsia e inoculação de tecidos *in vitro* tem contribuído de maneira significativa para as pesquisas de propagação de espécies tropicais de interesse econômico e ecológico. E assim, dentro desse cenário, este trabalho teve como objetivo testar diferentes concentrações de soluções desinfestantes, combinações de princípios ativos e tempos de exposição na desinfestação de explantes de castanha-do-brasil (*B. exce/sa*), como primeira etapa da pesquisa do desenvolvimento de protocolos de micropropagação e embriogênese somática da referida espécie.

## Material e Métodos

Os ensaios descritos abaixo foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no Km 29 da Rodovia AM-010, Manaus, Amazonas. Para os experimentos de assepsia relacionados foram utilizados explantes (segmentos de folhas e nodais) coletados de mudas de castanha-do-brasil (*B. exce/sa*), mantidos em casa de vegetação e viveiro. Após coleta, os explantes foram colocados em solução de água e sabão e levados para ambiente de laboratório. Após nova lavagem em água estéril e detergente, os tecidos foram reduzidos a segmentos menores e tratados nos diferentes ensaios estabelecidos, conforme detalhado na Tabela 1.

Todos os procedimentos foram aplicados em ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar, sendo que, após a desinfestação, os explantes foram novamente reduzidos e transferidos para tubo de ensaio contendo 10 mL meio de cultura com pH de 5,8 previamente autoclavado a 121 °C durante 15 minutos, composto pela formulação MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962) com redução à metade da concentração original de sais inorgânicos, suplementado com 3% de sacarose e 0,6% de ágar.

**Tabela 1.** Materiais e métodos utilizados na desinfestação de explantes de castanha-do-brasil (*B. excelsa*). Embrapa Amazônia Ocidental, fevereiro, 2010.

Ensaio Assepsia e Meio de cultura	
A	Imersão de 30 explantes/tratamento em PPM <sup>®</sup> a 1% para folha e a 3% para segmento nodal por 16 h seguido de HgCl <sub>2</sub> 0,5% por 1 min + assepsia padrão* (*álcool 70% por 1 minuto; hipoclorito 50% por 15 minutos; 3 lavagens com água estéril). Inoculação em meio MS/2 + carvão ativado a 0,2% + agrimicina <sup>®</sup> e cercobin <sup>®</sup> (250 mg L <sup>-1</sup> cada).
B	Imersão de 50 segmentos foliares / tratamento em PPM <sup>®</sup> 3% por 16 h seguido dos tratamentos: T1 - HgCl <sub>2</sub> a 0,5% por 1min + assepsia padrão; T2- Biocida completo** a 5% por 10 minutos + assepsia padrão. Inoculação em meio MS/2 + carvão ativado a 0,2% + Agrimicina <sup>®</sup> e Cercobin <sup>®</sup> (0,5% cada). **Biocida completo: PPM <sup>®</sup> + MgCl <sub>2</sub> e Mg(NO <sub>3</sub> ) 2% a 2,3% cada, C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> KO <sub>2</sub> e NaC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> a 2%.
C	Segmentos foliares retirados de mudas estabelecidas em viveiro telado tratadas por cinco dias consecutivos de agrimicina <sup>®</sup> e cercobin <sup>®</sup> (0,2% cada) (G1). Tratamento controle (sem aplicação) (G2). Vinte explantes/tratamento submetidos a imersão em PPM <sup>®</sup> 3%/16 h seguido dos tratamentos com HgCl <sub>2</sub> 0,5% por 1 minuto (T1), 3 minutos (T2) e 5 minutos (T3) + assepsia padrão. Inoculação em meio MS/2 + carvão ativado a 0,2% + agrimicina <sup>®</sup> e cercobin <sup>®</sup> (0,5% cada).
D	20 segmentos foliares / tratamento submetidos a agitação por 4 horas em meio MS líquido com 5% de PPM <sup>®</sup> (T1); solução antioxidante por 2 horas + meio MS líquido com 50% de PPM <sup>®</sup> por 10 minutos (T2); PPM <sup>®</sup> a 1% por 16 h + HgCl <sub>2</sub> a 0,5% por 2 minutos + assepsia padrão (T3); solução antioxidante por 3 horas + HgCl <sub>2</sub> a 0,5% por 2 minutos + assepsia padrão (T4); PPM <sup>®</sup> a 1% por 16 h + HgCl <sub>2</sub> a 0,5% por 2 minutos + assepsia padrão (T5). Explantes da assepsia T1 e T2 inoculados em meio MS/ 2 + carvão ativado 0,2% e, explantes da assepsia T3, T4 e T5 inoculados em meio MS/ 2 + carvão ativado 0,2% sem (T5) e com (T3 e T4) agrimicina <sup>®</sup> e cercobin <sup>®</sup> (0,5% cada).
E	Imersão de 10 segmentos foliares / tratamento em PPM <sup>®</sup> a 1% por 16 h seguido de: assepsia padrão (T1 e T6); HgCl <sub>2</sub> a 0,5% por 1 min (T2 e T7) ou 2 min (T3 e T8) + assepsia padrão; HgCl <sub>2</sub> a 0,5% por 1 minuto (T4 e T9) ou 2 min (T5 e T10) + assepsia padrão + antioxidante por 15 min. Explantes da assepsia T1, T2, T3, T4, T5 foram inoculados em meio MS/2 + carvão ativado a 0,2%. Explantes da assepsia T6, T7, T8, T9, T10 foram inoculados em meio MS/2 + carvão ativado a 2% + agrimicina <sup>®</sup> e cercobin <sup>®</sup> (0,5% cada).
F	Imersão de 75 segmentos foliares / tratamento imersos em PPM <sup>®</sup> 1% por 16 h seguido de: HgCl <sub>2</sub> a 0,5% por 2 min (T1) ou 4 min (T2) + assepsia padrão. Inoculação em meio MS/2 + carvão ativado a 0,2% + agrimicina <sup>®</sup> e cercobin <sup>®</sup> (0,5% cada).

Após inoculação, as culturas foram mantidas em ambiente escuro em sala de crescimento com temperatura de  $26\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com número diferenciado de repetições por tratamento para cada experimento. Ao final de 15-20 dias, as culturas foram avaliadas quanto à sobrevivência de explantes e a ocorrência de contaminação e de oxidação.

A definição desses ensaios tomou como base os resultados obtidos em dois testes preliminares com segmentos nodais tratados com PPM® (3%) por 16 horas, seguidos de imersão em cloreto de mercúrio (0,5%) por 1 minuto, álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio comercial a 50% por 15 minutos e lavagem tríplice em água estéril. Esses tratamentos resultaram em 52% e 48% de explantes livres de contaminantes quando inoculados em meio meio MS/2 suplementado com carvão ativado  $2\text{ g.L}^{-1}$ , PPM® 0,5% ou agrimicina® e cercobin®  $250\text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

Os valores encontrados foram submetidos à análise estatística descritiva e à análise de variância utilizando como nível de significância a margem de erro de 5% e, quando encontrada diferença estatisticamente significativa, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey (5%).

## Resultados e Discussão

A associação do PPM®, cloreto de mercúrio, agrimicina® e cercobin®, utilizada no ensaio A, resultou em 87% e 90% de explantes livres de contaminantes para segmentos nodais e foliares, respectivamente. Na eficiência dessa associação ressalta-se a tolerância dos tecidos de *B. excelsa* ao contato com o metal pesado, cloreto de mercúrio, considerado altamente tóxico tanto às plantas como aos animais podendo ser encontrado no solo, água e atmosfera (CATHUM et al., 2005). Também a imersão em biocida e a adição de fungicida/bactericida ao meio de cultura contribuíram para a porcentagem de explantes assépticos obtidos.

No ensaio B, por sua vez, essa associação não repetiu a mesma eficiência, visto que no tratamento 1 de mesma composição do ensaio anterior o controle da contaminação foi de somente 18%. O tratamento 2, que utilizou um biocida sem a presença de metal pesado como alternativa menos poluente e tóxica, não apresentou efeito algum sobre os fungos contaminantes, com perda total dos explantes. Atribui-se esse resultado ao fato de a coleta de explantes ter sido realizada em período de elevada precipitação pluviométrica na região, e a exposição das plantas matrizes ao excesso de umidade.

A descontaminação de explantes coletados de plantas matrizes pulverizadas com agrimicina® e cercobin® (Ensaio C) resultou em altos índices de contaminação, com 90% em G1T1, 95% em G1T2, 85% em G1T3, 100% em G2T1, 90% em G2T2 e 95% em G2T3. Esses resultados demonstraram a dificuldade da descontaminação de plantas doadoras que não estejam protegidas de precipitação direta, como no caso de plantas de população nativa, e reforçando a necessidade de estabelecimento de matrizes em casa de vegetação associado a pré-tratamentos destas, visto que a forma de manejo e a origem das plantas matrizes são determinantes para o controle da contaminação por microorganismos, principalmente quando relacionada aos microorganismos endofíticos.

Os resultados obtidos no ensaio D (Tabela 2), também implementado durante o período chuvoso, não resultaram em valores considerados eficientes, apesar da diferença significativa entre os tratamentos. A suplementação do meio de cultura com agrimicina® e cercobin® reduziu a contaminação nos tratamentos 3 e 4, apesar da perda devido à oxidação (40%). Comportamento similar a este foi observado por Cordeiro et al. (2009) com erva-mate (*Ilex paraguariensis*), que afirmam que a maior dificuldade em estabelecer essa espécie in vitro seja a existência de microorganismos endofíticos associados, além da oxidação dos explantes. Em razão do observado no presente trabalho, sugere-se a realização de novos testes com outros agentes antioxidantes e em menores concentrações, evitando a fitotoxicidade dos agentes descontaminantes.

**Tabela 2.** Perda de explantes foliares de castanha-do-brasil (*B. excelsa*) após inoculação in vitro, submetidos a diferentes condições de assepsia. Embrapa Amazônia Ocidental, fevereiro, 2010.

Ensaio	Contaminação (%)	
D	T1- 100 a	
	T2- 100 a	
	T3- 85 b	
	T4- 60 c	(40% oxidação)
	T5- 100 a	
E	T1- 100 a	
	T2- 100 a	
	T3- 100 a	
	T4- 100 a	
	T5- 100 a	
	T6- 60 b	
	T7- 40 c	
	T8- 40 c	
	T9- 10 e0	(90% oxidação)
	T10- 20 d	
F	T1 – 41a	(2% oxidação)
	T2 – 67a	

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

Para o ensaio E, alguns tratamentos surtiram maior efeito no controle da contaminação, como no tratamento 10 (imersão em PPM® a 1% por 16 h seguido de assepsia padrão e HgCl<sub>2</sub> a 0,5% por 2 minutos) com apenas 20% de perdas de explantes. O tratamento 9, por sua vez, apesar de baixa porcentagem de contaminantes, apresentou elevada oxidação (90%). A elevação do período em contato com o cloreto de mercúrio no ensaio F apresentou maior perda por contaminantes.

Problemas semelhantes foram observados por Philip et al. (1992) na assepsia de pimenta-do-reino, em que a eficiência do melhor tratamento com cloreto de mercúrio foi de 20%, em razão de toxidez deste aos explantes. Assim, recomenda-se a ampliação de ensaios visando ao equilíbrio entre a eficiência da assepsia e à viabilidade dos explantes.

## Conclusões

Nas condições testadas no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os resultados obtidos confirmam a grande dificuldade de limpeza de tecidos de espécies arbóreas tropicais para o cultivo in vitro devido à elevada presença endógena e exógena de microrganismos.
- Nenhum dos tratamentos testados nos diferentes ensaios controlou completamente o crescimento de microrganismos no estabelecimento in vitro de explantes de *B. excelsa*.
- Apesar da taxa de contaminação observada, a utilização de fungicidas/bactericidas (agrimicina<sup>®</sup>, cercobin<sup>®</sup> e PPM<sup>®</sup>) foi essencial tanto nos pré-tratamentos laboratoriais como na assepsia dos explantes foliares de castanheira.

Adicionalmente, são pontos de relevância a serem considerados para o sucesso de trabalhos futuros de estabelecimento de explantes assépticos de castanha-do-brasil; as condições de manutenção da planta-matriz e a ampliação nas combinações de princípios ativos e tempos de exposição dos tecidos vegetais.

## Agradecimentos

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de pesquisa.

À Embrapa Amazônia Ocidental, pelo apoio financeiro, infraestrutura e oportunidade desta aprendizagem.

## Referências

BUCKLEY, P.; DE WILDE, T.; REED, B. Characterization and identification of bacteria isolated from micro propagated mint plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 31, p. 58-64, 1995.

CATHUM, S.; VELICOGNA, D.; OBENAUF, A.; DUMOUCHEL, A.; PUNT, M.; BROWN, C. E.; RIDAL, J. Detoxification of mercury in the environment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1491-1498, 2005.

CID, L. P. B.; GOMES, A. C. M.; COSTA, S. B. R.; TEIXEIRA, J. B. Micropropagation of *Miconia sp.* a woody melastomataceae from Brazil, using Thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia**, v. 9, n. 1, p. 21-25, 1997.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrocência**, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

ERIG, A. C., SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 293-295, 2002.

GARCIA, E. V.; RAFAEL, M. Control de la oxidación y contaminación em microesquejes de café (*Coffea arabica* "Catimor") cultivados *in vitro*. **Agronomia Tropical**, v. 40, p. 281-290, 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1998. v. 1. p. 99-169.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Material didático de apoio à disciplina de Biotecnologia**, Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. Disponível em:  
<<http://www.cca.ufsc.br/lfldgv/Apostila.htm>> . Acesso em: 27 jun. 2011.

HANDA, L.; SAMPAIO, P.; QUISEN, R. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaodora* Ducke). **Acta Amazônica**, v. 35, p. 29-33, 2005.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 2005. 647 p.

LEIFERT, C.; RITCHIE, J. Y.; WAITES, W. M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 452-469, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 156-163, 1962.

NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 259-268, 2002.

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

PHILIP, V. J.; JOSEPH, D.; TRIGGS, G. S.; DICKINSON, N. M. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 42-44, 1992.

REED, B. M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 67-70, 1998.

ROCHA, S. C. Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*). 2005. 85 p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SILVA, R. M. dos S.; BLANK, M. de F. A.; ANGELO, P. C. da S. Desinfestação de explantes de inhame roxo (*Dioscorea rotundata*, Poir) coletados no campo para micropropagação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1., 2003, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 329.

TANPRASERT, P.; REED, B. Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 53-55, 1998.