

**Efeito da cefotaxima na germinação,
crescimento e brotação de gemas
axilares, sob condições in vitro**



Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 49

Efeito da cefotaxima na germinação, crescimento e brotação de gemas axilares, sob condições in vitro

L. Pedro Barrueto Cid
Don J. Durzan

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Maria José de Oliveira Duarte

Membros: Luciano Lourenço Nass

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Maurício Machaim Franco

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Maria Alice Bianchi

Maria Fátima Batista

Supervisor editorial: Maria José de Oliveira Duarte

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de ilustrações: Giscard Matos de Queiroz

Editoração eletrônica: Giscard Matos de Queiroz

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

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

Barrueto Cid , L. Pedro

Efeito da cefotaxima na germinação, crescimento e brotação de gemas axilares , sob condições in vitro / L. Pedro Barrueto Cid , Don J. Durzan. Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia , 2003.

xx p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 49)

1. Cultura de Tecidos - Cefatoxima - In vitro. 2. Cultura de tecidos - Antibiótico. 1. Durzan, Don J. I. Título. II. Série.

571.538 CDD - Ed. 21

Efeito da cefotaxima na germinação, crescimento e brotação de gemas axilares, sob condições *in vitro*

L. Pedro Barrueto Cid¹

Don J. Durzan²

RESUMO

Sementes de aipo, beringela, cebola, e tomate, bem como, gemas axilares de mandioca foram inoculadas, *in vitro*, em meio SP, suplementado com 100 mg/l de cefotaxima sódica sob condições ambientais de temperatura de 27 ± 2 °C, irradiância de $50 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. No tocante à germinação das sementes e crescimento das plântulas, não foi observado nenhum efeito fitotóxico quando comparados os resultados dos tratamentos com os dos controles e, no caso da germinação, em geral, as percentagens dos controles foram inferiores, por causa da contaminação bacteriana. Respeito às gemas axilares de mandioca, tampouco foram observados diferenças de crescimento entre os brotos mantidos no antibiótico e controles, sendo que a indução e crescimento das raízes adventícias tampouco foram afetadas. Com base nestes resultados, espera-se usar este antibiótico, na concentração testada, como medida complementar ao procedimento de assepsia, nos casos em que se constate nos explantes, uma persistente fitobacteriose.

¹ Pesquisador Embrapa/Cenargen

² Professor Dept. of Environmental Horticulture, University of California, Davis.

Effect of cefotaxime on germination, growth and axillary buds under *in vitro* conditions.

ABSTRACT

Seeds, from cellery, eggplant, onion, and tomato, as well as cassava axillary buds were inoculated *in vitro* onto SP medium, with or without 100 mg/L sodium cefotaxime under temperature of 27 ± 2 °C, irradiance of $50 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and photoperiod of 16 h light. Compared to controls, no phytotoxic effects were detected during germination and plantlet growth. Due to bacteria contamination, the germination percentage in the control was lower than in presence of antibiotic. No significant differences were observed between cassava axillary buds kept in cefotaxime and the controls. Adventitious root growth was not affected by the treatment. Results indicate that this antibiotic at the concentration evaluated is helpful in controlling persistent bacterial contaminations without affecting the development of seeds and axillary buds.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos é uma técnica que visa propagar plantas *in vitro*, embora também possa ser usada em estudos de caráter mais básicos como por exemplo: mutagênese, apoptose, morfogênese, ação hormonal, radicais livres, variação de DNA, etc (IBRAHIM, *et al.*, 1998; PEDROSO, *et al.*, 2000; MARTINELLI, *et al.*, 2001; REDDY, *et al.*, 2002; TIAN *et al.*, 2003; ZORINIANTS, *et al.*, 2003).

No tocante à propagação de plantas *in vitro*, micropropagação, a cultura de tecidos tem contribuído eficazmente na propagação de material clonal de importância econômica ou comercial, notadamente, na área florestal e agrônômica (BONGA; DURZAN, 1987; HARTMANN *et al.*, 1990).

O desenvolvimento de novos protocolos de micropropagação, às vezes, enfrenta graves problemas de contaminação, os quais são difíceis de contornar, especialmente, a partir de material proveniente do campo tais como folhas, gemas, sementes, bulbilhos, etc. Assim, no campo, a batata poderá estar contaminada por *Erwinia carotovora*, mas o alho estar infestado por *Pseudomonas fluorescens* (ROMEIRO, 1995a), agentes estes que, se por ventura presentes num explante de forma endôgena, dificilmente serão removidos ou inibidos, acarretando a inviabilidade da clonagem do material.

Um material visivelmente infestado não poderá ser usado como fonte de explante, porém, muitos dos contaminantes endofíticos não apresentam necessariamente sintomas visíveis de sua presença na planta ou sementes, resultado de co-evolução entre as plantas e microorganismos (REDLIN; CARRIS, 1977).

Em cultura de tecidos, muitos dos problemas decorrentes da contaminação têm sido enfrentados por fungicidas como Benomyl, o qual, oferece a vantagem de poder ser autoclavado, junto com o meio, sem perder sua eficácia (BARRUETO CID, 1991).

No tocante a antibióticos, muitos deles têm sido usados extensivamente na cultura de tecidos para seleção de células transformadas (BRASILEIRO; ARAGÃO, 2001; SARTORETTO, *et al.*, 2002), ou então, na rotina dos trabalhos na fase de estabelecimento da cultura de tecidos, porém, existe cautela sobre sua possível fitotoxicidade por agirem, na sua grande maioria, a nível de síntese de proteína em procariontes e/ou eucariontes (STRYER, 1992).

Os beta lactâmicos, (Penicillina G & Cefalosporina) são antibióticos que oferecem certo interesse para a cultura de tecidos devido a sua solubilidade em água, baixa fitotoxicidade, e alta ação bactericida, e pelo fato de que eles interferem na formação de parede celular das bactérias e não da planta (POLLOCK *et al.*, 1983), através de um mecanismo de alteração da interligação dos D-aminoácidos pertencentes às cadeias da macro molécula de peptídeo-glicano, mureína, componente da parede celular deste tipo de microorganismos (VOET; VOET, 1995).

A cefotaxima sódica, é um beta lactâmico, do grupo das cefalosporinas com ação em bactérias Gram-positivas e negativas, além de apresentar resistência às betalactamases (POLLOCK *et al.*, 1983)

A pesar destas conhecidas vantagens clínicas de ordem geral, torna-se necessário apresentar mais evidências sobre sua baixa fitotoxicidade em cultura de tecidos de plantas, para facilitar trabalhos nesta área, especialmente, quando utilizados explantes do campo, material este, normalmente com alta contaminação bacteriana. Por isso, o presente trabalho, tem o objetivo de apresentar e discutir dados sobre o efeito da cefotaxima, 100 mg/l, na germinação, crescimento de plântulas e brotação de gemas, a fim de viabilizar a fase de estabelecimento dos explantes em laboratório, além de contribuir com informação na área de tecidos vegetais, que tem sido muito parca neste tipo de problema.

MATERIAL & MÉTODOS

Sementes

Na câmara de fluxo laminar, sementes de aipo (*Apium graveolens*: Tall Utah®), berinjela (*Solanum melongena*, L. : Black Beauty®), cebola (*Allium cepa*, L. : Spanish Utah®), tomate (*Lycopersicon Lycopersicum*: Tomato Pole Beefsteak®), foram submetidas separadamente em hipoclorito de sódio (NaClO) 5% de ingrediente ativo durante 15 minutos, a seguir, lavadas com H₂O deionizada e esterilizada e logo, tratadas com H₂O₂ 3% durante 1 minuto e depois, novamente lavadas com água deionizada e esterilizada, para depois, ser inoculadas em tubos de ensaio (25mm x 150mm) contendo 15 ml de meio SP com e sem cefotaxima

sódica, Ctx, (Claforan: Hoechst/Roussel) , totalizando 60 tubos com uma semente por tubo. Foram consideradas germinadas as sementes cuja radícula fosse igual ou maior que 5,0 mm. As avaliações de contaminação foram diárias e de germinação e crescimento das plântulas, aos 7 e 15 dias.

O meio SP é uma modificação de meio Murashige e Skoog (1962), (MS), e sua composição foi a seguinte:

Macronutrientes (mg/l) : NH_4NO_3 , 825,0; KNO_3 , 950,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 220,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 185,0; KH_2PO_4 , 85,0.

Micronutrientes (mg/l): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,9; Na EDTA, 18,65,0; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 22,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8,0; H_3BO_3 , 6,0; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,25; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25.

Substâncias orgânicas (mg/l): inositol, 50; ac. nicotínico, 1,0; piridoxina .HCl 1,0; tiamina. HCl 1,0; pantotenato Ca 1,0; sacarose, 20.000,0.

pH: 5,8 ajustado com 0,1 N KOH antes de autoclavar a 120 °C e 1,0 atmosfera.

Gemas

Na câmara de fluxo laminar, gemas axilares de mandioca (*Manihot esculenta* C., cv IAC) foram retiradas de plântulas (aproximadamente 100 mm de altura) mantidas em tubos de ensaio sob condições *in vitro* em meio SP. As gemas foram colocadas em placas de Petri, 20 x100 mm, com 25 ml de meio SP, sendo que, em cada placa foram inoculadas 10 gemas num total de 3 repetições, tanto para placas com Ctx e sem Ctx (controle). Depois de brotadas, aproximadamente 20 dias após, foram isoladas e transferidas para tubos de ensaio contendo apenas meio SP.

Adição da Ctx

Os meios foram autoclavados em erlenmeyers de 500 ml e, na câmara de fluxo laminar, esperou-se resfriar, porém, antes de atingir a solidificação na metade deles, foi adicionada a Ctx numa concentração de 100 mg/l, a qual, tinha sido

previamente esterilizado através de membrana Millipore 0,2 μm de diâmetro de poro. Uma vez despejado o meio SP, com ou sem Ctx, nos tubos ou nas placas, estes ficaram abertos até solidificar, logo, selados e 48 h depois, inoculados como previamente mencionado.

As condições de temperatura e luz foram 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h (luz fluorescente) com aproximadamente $50 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1, observa-se a germinação de uma semente de beringela com 5 dias de idade, mostrando o desenvolvimento da raiz primária com um poderoso geotropismo positivo, crescendo em meio SP + Ctx. Os controles apresentaram também uma performance similar. O fato de considerar apenas germinadas as sementes com 5,0 mm ou mais, foi justamente, para eliminar a hipótese de que a protrusão fosse devido unicamente ao fenômeno de alongamento celular por entrada de água (BARRUETO CID *et al.*, 1981).

Conforme Tabela 1, as porcentagens de germinação sempre foram superior nos casos em que a Ctx esteve presente e esta diferença com os controles, aos 15 dias, pode variar entre 20 a 30 por cento. Esta diferença pode ser explicada pela maior quantidade de perda de sementes como consequência da contaminação bacteriana, sendo que a contaminação fúngica foi sempre inferior não ultrapassando a casa dos 10 % e sempre, ambos os tipos de contaminação foram observados apenas nos primeiros 7 dias. Contudo, convém ressaltar que, pelo fato de serem sementes certificadas, não foram encontrados altos níveis de contaminação. O caso das sementes de tomate ilustrou bem esta situação, onde apenas foi observado 10 % de contaminação bacteriana, mas, em matéria de contaminação, na cultura de tecido sempre existem riscos. Assim, a contaminação bacteriana, via semente, já tem sido relatada (HUMAYDAN *et al.*, 1980; NETO; MALAVOLTA, 1995) mas, no presente caso, por não ter sido feita a identificação, não foi possível saber se as bactérias eram fitopatogênicas ou meros contaminantes do solo, contudo, ambos os casos são fatais para a cultura de tecidos.

Tabela 1. Efeito da cefotaxima sódica na germinação *in vitro* de diferentes hortaliças aos 7 e 15 dias.

Espécie	Germinação (%)			
	7 dias		15 dias	
	Controle	Cbx	Controle	Cbx
Aipo	0	0	57	87
Beringela	33	43	50	80
Cebola	20	35	46	62
Tomate	66	77	-	-

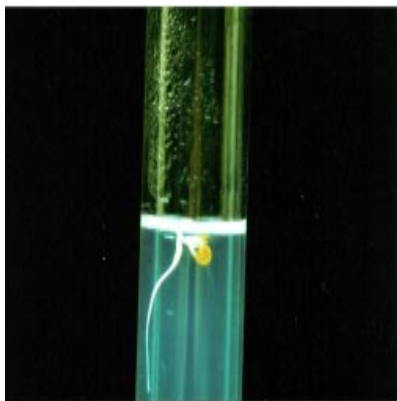


Fig. 1. Germinação de sementes de beringela em meio SP + Ctx, com 5 dias de idade.

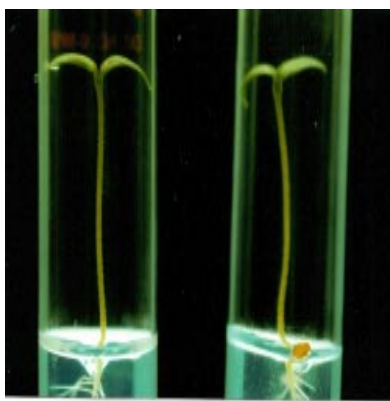


Fig. 2. Comparação de crescimento de 2 plântulas de beringela. Esquerda, em presença de Ctx. Direita, controle, ambas, com 10 dias de idade.

É bom lembrar que cebola e tomate, apenas para dar um exemplo, podem apresentar, entre 6 e 8 tipos de fitobacterioses respectivamente, sendo que, *Erwinia carotovora* e *Xantomonas campestris* são comuns em ambas espécies (ROMEIRO, 1995b).

Por outro lado, os resultados da Tabela 1 sugerem que, indiretamente, não houve fitotoxicidade ou ação inibitória do antibiótico sobre a divisão celular e alongamento, fenômenos estes, ligados à protrusão radicular, já que, do ponto de vista fisiológico (TAIZ; ZEIGER, 2002), a germinação ativa estes dois mecanismos na raiz, quando esta começa a romper o tegumento, como consequência da embebição e ativação metabólica da semente.

Tabela 2. Efeito da cefotaxima sódica na altura das plântulas (mm), número de raízes primárias (**N**) e comprimento (mm) das mesmas (**C**).

Espécies	Altura				Raízes (N/C)			
	7 dias		15 dias		7 dias		15 dias	
	Cont.	Ctx	Cont.	Ctx	Cont.	Ctx	Cont.	Ct
Aipo	-	-	22 ± 6	23 ± 6	-	-	1/22 ± 8	1/24 ± 11
Beringela	20 ± 6	28 ± 8	57 ± 13	66 ± 15	1/18 ± 6	1/23 ± 7	1/54 ± 8	1/64 ± 9
Cebola	24 ± 18	24 ± 17	49 ± 25	46 ± 22	1/10 ± 5	1/12 ± 10	1/14 ± 9	1/19 ± 6
Tomate	62 ± 13	67 ± 10	-	-	1/56 ± 7	1/49 ± 9	-	-

± = desvio padrão; Cont. = controle; N/C = número/comprimento.

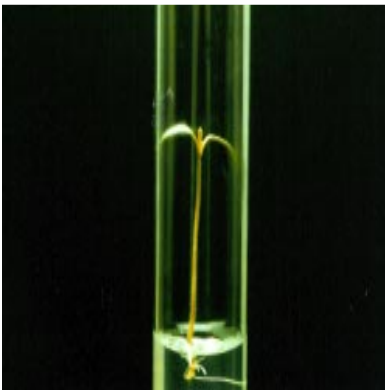


Fig. 3. Crescimento de plântulas de tomateiro em meio SP + Ctx com 8 dias de idade.

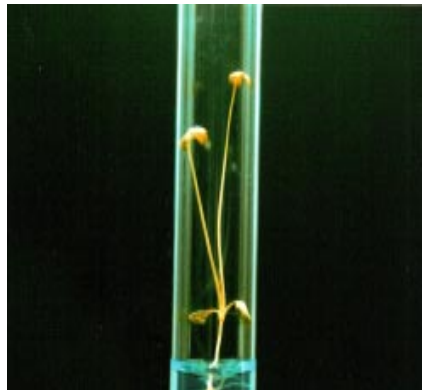


Fig 4. Crescimento de plântulas de aipo em meio SP + Ctx, com 15 dias.

A respeito da altura das plântulas na presença de Ctx foi verificado, que não houve inibição do crescimento em relação aos controles aos 7 e 15 dias, portanto, não foi registrado efeito fitotóxico do antibiótico em relação a este aspecto, (Tab. 2, Fig. 2). Inclusive, em alguns casos, foi observado, em termos absolutos, um maior crescimento nas plântulas em presença de Ctx. Em trigo,

também foi observado um efeito estimulante da Ctx à mesma concentração, porém, na regeneração de calos. A falta de toxicidade foi também observada a nível de síntese de clorofila, já que não houve diferenças visuais palpáveis sobre este aspecto, nas diferentes plantas sob tratamento (Fig. 2, 3, 4), semelhante ao visto por outros autores (KNEIFEL; LEONHARDT, 1992).

O elevado desvio padrão observado em ambos os grupos de plantas, talvez foi associado ao fato de que o material foi advindo de sementes, portanto, com uma carga de variabilidade. Uma outra explicação seria a distribuição desuniforme da luz em toda a grade, sendo assim, os tubos mais centrais na grade receberam menos luz, que os colocados na periferia da mesma, portanto, ficaram mais alongadas em diferentes graus. Não se descarta a possibilidade de que ambos os fatores houvessem tido também um efeito aditivo sobre o tamanho do desvio padrão.



Fig. 5. Raiz primária de beringela mostrando raízes secundárias, com 20 dias em meio SP + Ctx.

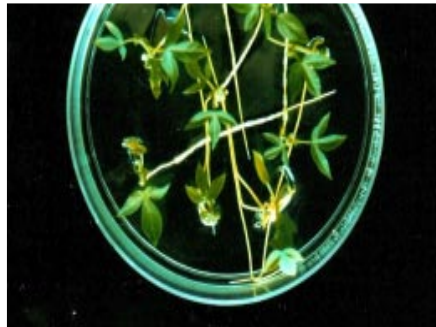


Fig. 6. Brotação e crescimento de gemas axilares de mandioca, após 20 dias em meio SP suplementado com Ctx. Nota-se o vigoroso crescimento das raízes. O controle apresentou um aspecto similar.

Com respeito às raízes, aos 7 e 15 dias, foi observado que as plantas tinham apenas uma raiz principal com muitas raízes secundárias e que, no caso da beringela aos 20 dias, Fig. 5, observou-se um poderoso crescimento radicular em meio SP + Ctx. Chamou a atenção que o desvio padrão das raízes independente se dos controles ou da Ctx, foi muito inferior aos de altura das plântulas.

Tampouco foi observado, Fig. 6, inibição ou fitotoxicidade da Ctx na indução de gemas axilares e de raízes adventícias de mandioca, quando comparadas com o controle. Inclusive, após 30 dias de transferidas para tubos de ensaios, foram observadas plântulas de 20 a 30 mm de altura, tanto no controle como no tratamento, o qual, sugere também que o meio SP foi um meio, não apenas, adequado para brotação e crescimento de plântulas, senão que também, para a germinação de sementes, isto não deixa de ser importante considerando que este meio não tinha sido descrito ainda, no uso *in vitro* destas espécies.

A constatação de ausência de fitotoxicidade será de real importância no tocante à assepsia de gemas oriundas do campo, pois as mesmas, após a assepsia normal, poderão ser inoculadas, preliminarmente, num meio SP contendo Ctx e, se necessário algum fungicida, por alguns dias, sendo que depois deste pré-cultivo, o material poderá ser transferido para o mesmo meio, porém, desprovido de ambas substâncias.

O fato de não ter sido observado nenhum efeito inibitório da Ctx, bem como, ter mostrado um bom controle antibacteriano na concentração usada, é consistente com o observado em outros trabalhos (POLLOCK *et al.*, 1983; BARRETT; CASSELLS, 1994, BARRUETO CID *et al.*, 1997), pelo que, a decisão de ter usado apenas uma concentração da Ctx foi adequada. É claro que, mesmo assim, cautela deverá existir e apenas ser usada quando necessário, já que, a resistência a antibiótico pelas diferentes espécies de bactérias ou raças fisiológicas é um risco (AMÁBILE, 2003).

Conclusões

No material biológico testado,

- 1.A Ctx controlou a contaminação bacteriana .
- 2.A Ctx não mostrou efeitos inibitorios ou fitotóxicos sobre a germinação, crescimento radicular, caulinar ou brotação de gemas.
- 3.A Ctx na concentração usada, poderá ser usada para controlar contaminação bacteriana sem riscos para o explante.
- 4.O meio SP foi considerado adequado para a germinação, crescimento radicular, de plântulas e brotação de gemas.

Referências

AMÁBILE, C. F. C. New antibiotic and new resistance. **American Scientist**, New Haven, CT, v. 91, p. 138-149, 2003.

BARRETT, C.; CASSELLS, A. C. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. 'Grand Slam' explants in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 36, p. 169-175, 1994.

BARRUETO CID, L. P.; OLIVA, M. A.; CARDOSO, A. A. Efeito do potencial hídrico sobre a embebição, a respiração e a germinação da leguminosa *Cratylia floribunda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 883-890, 1981.

BARRUETO CID, L. P. **Regeneração de plantas de alho (cv. Chonan), via suspensão celular**. 1991. 175 p. Tese (Doutorado) - UNICAMP, Campinas.

BARRUETO CID, L.P., GOMES, A. C. M.; COSTA, S. B. R. DA; TEIXEIRA, J.B. Micropropagação of *Miconia* sp, a woody Melastomaceae from Brasil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Piracicaba, v. 9, p. 21-25, 1997.

BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. v. 3. 416 p.

BRASILEIRO, A. C. M.; ARAGÃO, F. L. Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 3, p. 113-121, 2001.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. 5. ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1990. 647 p.

HUMAYDAN, H.S.; HARMAN, G.E.; NEDROW, B.L.; DINITTO, L.V. Eradication, of *Xanthomonas campestris*, the causal agent of black rot, from Brassica seeds with antibiotics and sodium hypochlorite. **Phytopathology**, St. Paul, MN, v. 70, p.127-131, 1980.

IBRAHIM, R.; MONDELAERS, W; DEBERGH, P.C. Effects of X-irradiation on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaf explants of *Rosa hybrida*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, p. 37- 44, 1998.

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.

MARTINELLI, L.;CANDIOLI, E.; COSTA, D.; POLETTI, V. Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 279-284, 2001.

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

PEDROSO, M. C.; MAGALHÃES, J. R.; DURZAN, D. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, UK, v. 51, p. 1027-1036, 2000.

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

REDDY, B.O.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. The effect of triacontanol on micropropagation of *Capsicum frutescens* and *Decalepsis hamiltonii* W & A. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, p. 253-258, 2002.

REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. Latent infections vs. endophytic colonization by fungi. In: REDLIN, S. C. ; CARRIS, L. M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul, MN: APS PRESS, 1997. p. 3-29.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, p. 56-59, 1995.

ROMEIRO, R. da S. Posicionamento sistemático. In: ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 1995a. p. 59-92.

ROMEIRO, R. da S. Bactérias fitopatogênicas relatadas no Brasil. In: ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 1995b. p. 231-244.

SARTORETTO, L. M.; BARRUETO CID, L. P.; BRASILEIRO, A. C. M. Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* callus. **Functional Plant Biology**, Australia, v. 29, p. 917- 924, 2002.

STRYER, L. Síntese de proteínas. In: STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 603-630.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Mineral nutrition. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p. 80-81.

TIAN, M; GU,Q.; ZHU,M. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. **Plant Science**, Amsterdam, v.165, p. 701-707, 2003.

VOET, D.; VOET, J. G. Sugars and polisaccharides. In: VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: J. Wiley, 1995. p. 268-269.

ZORINIANTS, S.E.; NOSOV, A V.; MONFORTE-GONZALEZ, M.; MENDES-ZEEL, M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. 141-146, 2003.

