

Toxicidade de antibióticos no cultivo in vitro da batata em meios semi-sólido e líquido⁽¹⁾

Jonny Everson Scherwinski Pereira⁽²⁾ e Gerson Renan de Luces Fortes⁽³⁾

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos fitotóxicos de antibióticos no crescimento e na taxa de multiplicação in vitro da batata. Brotações da cultivar Baronesa foram cultivadas em meio de multiplicação de consistência semi-sólida e líquida. O meio de multiplicação foi formado pelos sais e vitaminas de MS ao qual adicionou-se um dos seguintes antibióticos: ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina, previamente selecionados em razão da ação bactericida sobre contaminantes da cultura, nas concentrações de 0, 32, 64, 128, 256, 512 e 1.024 mg L⁻¹. Por 21 dias os materiais foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, 16 horas de luz e fluxo de radiação de 35 µmol m⁻² s⁻¹. Nos tratamentos em que se utilizou meio de cultura líquido, os frascos foram mantidos sob constante agitação em mesa agitadora do tipo orbital. A ampicilina foi o único antibiótico que não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento dos explantes de batata em meio de multiplicação, podendo ser indicada para trabalhos de descontaminação in vitro dessa espécie. O aumento das concentrações de cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina no meio de cultura apresentou efeitos fitotóxicos severos sobre o crescimento e taxa de multiplicação do material vegetal.

Termos para indexação: *Solanum tuberosum*, fitotoxicidade, micropropagação, antimicrobiano, contaminação.

Antibiotics toxicity on the in vitro potato cultivation in semi-solid and liquid media

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effects of antibiotics on the in vitro growth and multiplication rate of potato. Potato explants, cv. Baronesa, were cultivated in semi-solid and liquid multiplication culture medium. The medium was formed by MS salts, vitamins and one of the following antibiotics: ampicillin, chloramphenicol, streptomycin or tetracycline, previously selected by the bactericidal action on some culture contaminants, at 0, 32, 64, 128, 256, 512 and 1,024 mg L⁻¹. Each treatment had three replicates of ten explants. The materials were incubated for 21 days in a growth room at 25±2°C temperature, 16-hour-light and 35 µmol m⁻² s⁻¹ radiation. The flasks with liquid culture medium were kept under continuous agitation in an orbital shaker. Only ampicillin has not affected the survival and the normal development of potato explants in the culture medium, thereby being indicated for decontamination works in vitro of this specie. The increase of the concentrations of chloramphenicol, tetracycline and streptomycin presented severe phytotoxic effects on the growth and multiplication rate of potato explants.

Index terms: *Solanum tuberosum*, phytotoxicity, micropropagation, antimicrobials, contamination.

Introdução

Na micropropagação de plantas, as contaminações causadas por fungos, bactérias e leveduras cons-

tituem as principais causas de perdas de material vegetal (Long et al., 1988; Leifert & Woodward, 1998; Dantas et al., 2000; Pereira et al., 2003). Embora alguns contaminantes como o *Lactobacillus plantarum* possam agir de forma direta sobre o crescimento e desenvolvimento dos explantes, a maioria compromete o desenvolvimento normal dos cultivos de forma indireta, pois compete por nutrientes e vitaminas do meio de cultura e produz metabólitos fitotóxicos, tais como os ácidos láctico e acético, cianeto, além de certos reguladores de crescimento e

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 18 de agosto de 2003.

⁽²⁾ Embrapa-Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre, Caixa Postal 321, CEP 69908-970 Rio Branco, AC. E-mail: jonny@cpafac.embrapa.br

⁽³⁾ Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70770-900 Brasília, DF. E-mail: gerson@cenargen.embrapa.br

antibióticos, que intoxicam os tecidos vegetais podendo levá-los à morte (Bakker & Schippers, 1987; Stanier et al., 1987; Kloepper et al., 1989; Leifert et al., 1989, 1991; Yepes & Aldwinckle, 1994).

Na prática, a diferença básica entre contaminações bacterianas e fúngicas está no fato de que a ocorrência de fungos e leveduras pode ser mais facilmente percebida no meio de cultura após poucos dias de cultivo, o que, de certo modo, facilita a eliminação de material contaminado (Leifert & Woodward, 1998). Já no caso das bactérias, por serem, muitas vezes, de difícil visualização, nem sempre sua presença é evidenciada no início do cultivo e, desta forma, podem ser disseminadas facilmente de um material para outro durante as etapas de multiplicação. Além disso, algumas estirpes não crescem prontamente no meio de cultura até que determinadas condições (nutrição, pH) sejam favoráveis ao seu desenvolvimento, permanecendo latentes no interior dos vegetais e tornando-se uma fonte importante de contaminação nos estádios mais avançados de multiplicação do material vegetal (Leifert et al., 1991; Leifert & Woodward, 1998; Marino et al., 2003).

As contaminações bacterianas são consideradas as mais sérias e, do ponto de vista prático, a melhor medida a ser tomada é o descarte e autoclavagem do material contaminado. Contudo, a eliminação de material nem sempre é possível e, desta forma, tratamentos curativos são recomendados (Leifert et al., 1989; Dantas et al., 2000; Niede & Bausher, 2002). Para o controle das contaminações bacterianas, normalmente são utilizadas substâncias antibióticas que são incorporadas ao meio de cultura ou usadas diretamente sobre os explantes contaminados (Salehi & Khosh-Khui, 1997).

Mesmo que se utilize antibióticos de amplo espectro, o controle bacteriano na cultura de tecidos é problemático. Na maioria dos trabalhos *in vitro*, a frequência de descontaminação não é total pois, os tecidos vegetais podem interferir no controle, por meio da destoxificação destas substâncias ou servindo como habitat para os contaminantes que se translocam por seus tecidos. É comum que as concentrações de antibióticos devam ser elevadas quando estes são adicionados ao meio nutritivo juntamente com o explante, no entanto a fitotoxicidade dessas substâncias é fator limitante dessas concentrações.

Uma das alternativas para se evitar o efeito tóxico dos antibióticos sobre os explantes é reduzir ao máximo o tempo do tratamento (contato) dos explantes com o agente antimicrobiano. No entanto, esta técnica muitas vezes causa efeitos apenas bacteriostáticos, constituindo uma ação paliativa frente ao principal objetivo que é a eliminação por completo do organismo contaminante. Em virtude da fitotoxicidade e do alto custo do tratamento, os antibióticos devem ser utilizados apenas em contaminantes específicos das culturas, pois, somente as bactérias que estiverem dentro do espectro de ação de cada antibiótico serão controladas (Leifert et al., 1991; Teng & Nicholson, 1997; Pereira et al., 2003). Num estudo com bactérias endofíticas contaminantes na cultura da batata *in vitro*, Pereira et al. (2003) verificaram que entre doze antibióticos testados, seis apresentaram algum tipo de controle e, destes, os que proporcionaram os melhores resultados para a inibição do crescimento bacteriano foram a ampicilina, o cloranfenicol, a estreptomina e a tetraciclina em concentrações que variaram de 32 a 256 mg L⁻¹.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito fitotóxico de antibióticos no crescimento e na taxa de multiplicação *in vitro* da batata.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, RS, entre os meses de novembro de 2001 a janeiro de 2002. Explantes obtidos de material sob multiplicação *in vitro*, com tamanho de 0,5 a 0,8 cm e uma gema axilar, foram cultivados em meio de cultura de MS de consistência semi-sólida (6 g L⁻¹ de ágar) e líquida (sem a adição do solidificante). A este meio acrescentou-se, individualmente, quatro antibióticos, previamente selecionados em razão da maior seletividade apresentada para oito estirpes bacterianas isoladas e identificadas como endofíticas contaminantes da cultura da batata e pertencentes às famílias Acetobacteriaceae e Enterobacteriaceae e aos gêneros *Corynebacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (Pereira et al., 2003).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições; os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x4x7, com duas consistências para o meio de cultura de multiplicação (semi-sólido e líquido),

quatro tipos de antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina) e sete concentrações dos antibióticos (0, 32, 64, 128, 256, 512 e 1.024 mg L⁻¹), num total de 56 tratamentos. Cada parcela foi formada por dez explantes.

Os antibióticos testados foram esterilizados a frio por filtração (Millipore, 0,22 µm) e adicionados ao meio de cultura quando este estava em processo de resfriamento (40 a 50°C). Utilizaram-se frascos Erlenmeyers de 250 mL com 40 mL de meio de cultura nos experimentos em que os explantes se desenvolveram em meio semi-sólido e 15 mL de meio nos explantes que se desenvolveram em meio líquido.

Os materiais foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e fluxo de radiação de 35 µmol m⁻² s⁻¹. Nos tratamentos em que se utilizou meio de cultura líquido, os frascos foram mantidos sob constante agitação em mesa agitadora do tipo orbital (80 a 90 rpm).

Após 21 dias de cultivo, avaliaram a porcentagem de sobrevivência dos explantes, a altura de brotações e a taxa de multiplicação do material vegetal. Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão, e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Variáveis expressas em porcentagem (x) foram transformadas segundo arco seno (x/100)^{0.5}. Os dados referentes à taxa de multiplicação foram transformados segundo (x + 0,5)^{0.5}.

Resultados e Discussão

A adição de ampicilina no meio de cultura não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento dos explantes de batata da cultivar Baronesa em ambas consistências (semi-sólida e líquida) do meio de multiplicação (Figura 1). Deste modo, mesmo na mais alta concentração deste antibiótico (1.024 mg L⁻¹), houve cerca de 100% de sobrevivência dos explantes, após 21 dias de cultivo, indicando não ter havido efeito fitotóxico deste antibiótico sobre as culturas.

Verificou-se um decréscimo na sobrevivência dos explantes com o aumento nas concentrações de estreptomicina no meio nutritivo, sendo a mais baixa taxa observada na concentração de 1.024 mg L⁻¹, em meio semi-sólido e líquido de 50% e 41,6%, respectivamente. Entretanto, as menores taxas de sobrevivência foram observadas na presença de cloranfenicol e tetraciclina; tanto em meio semi-sólido como em meio líquido, o cloranfenicol provocou

decréscimo na sobrevivência dos explantes, especialmente a partir da concentração de 64 mg L⁻¹; na presença de tetraciclina esse decréscimo foi ainda mais acentuado, não havendo sobrevivência a partir das concentrações de 128 mg L⁻¹ e 512 mg L⁻¹ nos meios de consistência líquida e semi-sólida, respectivamente (Figura 1).

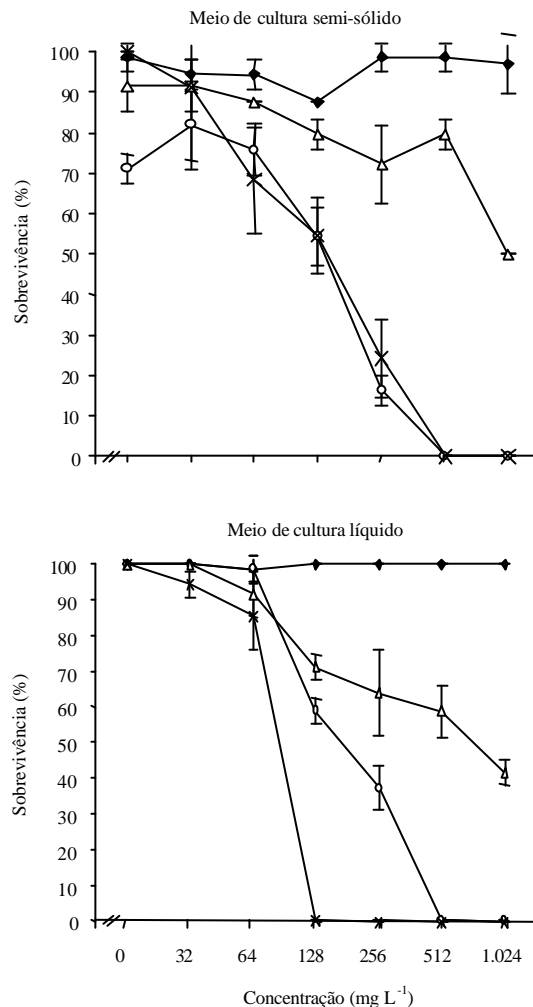


Figura 1. Sobrevivência de explantes de batata sob diferentes concentrações de ampicilina (◆), cloranfenicol (○), estreptomicina (Δ) e tetraciclina (×) nos meios de cultura semi-sólido e líquido, após 21 dias de cultivo. Barras verticais indicam o desvio-padrão da média (n=3).

Assim como observado para a variável sobrevivência, após 21 dias de cultivo, a presença de ampicilina no meio de cultura não afetou o crescimento e a taxa de multiplicação do material vegetal (Figura 2). Além de ser considerado um antibiótico de amplo espectro, ativo contra bactérias gram positivas e negativas, muitos autores citam que os antibióticos pertencentes ao grupo dos betalactanos, como a ampicilina e a carbenicilina, as cefalosporinas (cefotaxime, cefaloridina, cefalotina) e a rifampicina são pouco ou não tóxicos aos cultivos *in vitro* (Fisse et al., 1987; Santos & Salema, 1989). Tal fato deve-se, provavelmente, a sua ação sobre sítios específicos da parede celular bacteriana, os quais não ocorrem em células de plantas (Pollock et al., 1983; Teng & Nicholson, 1997; Koneman et al., 2001).

Além da ausência de fitotoxicidade, alguns antibióticos pertencentes a estes grupos também podem potencializar o crescimento *in vitro* (Pollock et al., 1983; Leifert et al., 1992). Em *Eleusine coracana* observou-se que a adição de até 1.000 mg L⁻¹ de carbenicilina e de cefotaxime ao meio de cultura promoveu a diferenciação de embriões somáticos dessa espécie (Fiola et al., 1990). O acréscimo de ampicilina ao meio não causou nenhum sintoma de fitotoxicidade sobre o cultivo da batata em meio semi-sólido ou líquido até a concentração 1.024 mg L⁻¹ e não foram verificados efeitos estimuladores significativos sobre o crescimento ou taxa de multiplicação da cultivar Baronesa, embora tenha sido observado que, em concentrações mais elevadas, as plântulas apresentaram um aspecto mais vigoroso em relação às que se desenvolveram na ausência do antibiótico.

Com exceção de ampicilina, todos os demais antibióticos testados proporcionaram decréscimo significativo na altura de brotação e na taxa de multiplicação com o aumento das concentrações no meio de cultura (Figura 2). Os valores dessas variáveis foram mais severamente afetados nos meios de cultura acrescidos de tetraciclina e cloranfenicol. Explantes na presença de 32 mg L⁻¹ de tetraciclina apresentaram 4,9 cm de redução na altura média. A taxa de multiplicação, que no tratamento testemunha foi de 8:1 em meio líquido e 6,7:1 em meio semi-sólido, foi reduzida para 3,4:1 e 4,5:1, respectivamente, na concentração de 32 mg L⁻¹ de tetraciclina, proporcionando os maiores efeitos fitotóxicos ao cultivo em ambas consis-

tências, semi-sólida e líquida, do meio de multiplicação.

Mesmo sendo considerado um antibiótico de amplo espectro de ação, a tetraciclina tem uso restrito na cultura de tecidos, justamente pelo alto grau de fitotoxicidade (Pollock et al., 1983); o sintoma mais característico é a clorose das folhas, em razão da destruição dos cloroplastos. A ação fitotóxica ocorre, principalmente, em virtude de distúrbios da síntese protéica e ação inibitória na síntese de ARNs e ATPs, interferindo, desta forma, nos sistemas energéticos da planta (Prado Filho, 1975; Falkner, 1990). Alguns autores relatam eficiência no controle de contaminações quando os tratamentos com este antibiótico são feitos durante curtos períodos (Pollock et al., 1983; Leifert et al., 1991). No entanto, essa alternativa pode levar a um efeito apenas bacteriostático. Portanto, conforme resultados de Pollock et al. (1983) e Leifert et al. (1991) sobre a elevada fitotoxicidade associada ao efeito bacteriostático, não se recomenda o uso da tetraciclina isoladamente para controle de contaminações bacterianas *in vitro*.

Inibidor da síntese protéica em plantas podendo, em alguns casos, interferir no desenvolvimento de cloroplastos e mitocôndrias (Prado Filho, 1975; Falkner, 1990; Leifert et al., 1991), o cloranfenicol também apresentou efeitos fitotóxicos bastante pronunciados sobre os cultivos. O tratamento testemunha em meio líquido resultou em brotações com altura média de 8,1 cm, valores estes significativamente superiores aos obtidos na presença de 32 mg L⁻¹, cujo valor médio alcançou 1,1 cm. Em meio semi-sólido a testemunha apresentou brotações com altura média de 5,2 cm, enquanto na concentração de 32 mg L⁻¹, o valor observado foi de 2,0 cm. As diferenças observadas nas variáveis relativas aos tratamentos testemunhas ocorrem em virtude da consistência do meio de cultura de multiplicação.

A taxa de multiplicação também foi afetada quando houve acréscimo de cloranfenicol ao meio, sendo mais acentuada quando em meio líquido, provavelmente pelo maior contato dos explantes com o meio de cultura. Assim, a taxa de multiplicação que foi em média de 7,9:1 na testemunha, independentemente da consistência, na concentração de 32 mg L⁻¹ foi de

6,7:1 e 3,4:1 no meio semi-sólido e líquido, respectivamente. Pollock et al. (1983) verificaram efeitos fitotóxicos deste antibiótico a partir da concentração de 1,0 µg mL⁻¹ em cultivo de células de *Nicotiana plumbaginifolia*. Este fato fez com que os autores refutassem o seu uso, não só pela elevada fitotoxicidade, mas também por sua ação apenas bacteriostática. Em relação a *Agrobacterium*

tumefaciens, a utilização do cloranfenicol na concentração de 128 mg L⁻¹ provocou ação bacteriostática, no entanto, os efeitos fitotóxicos foram observados nas concentrações de 8 a 25 mg L⁻¹ (Okkels & Pedersen, 1988).

Embora um dos sintomas mais característicos causados pela estreptomicina seja a clorose, especialmente em folhas mais jovens, sua ação fitotóxica pode

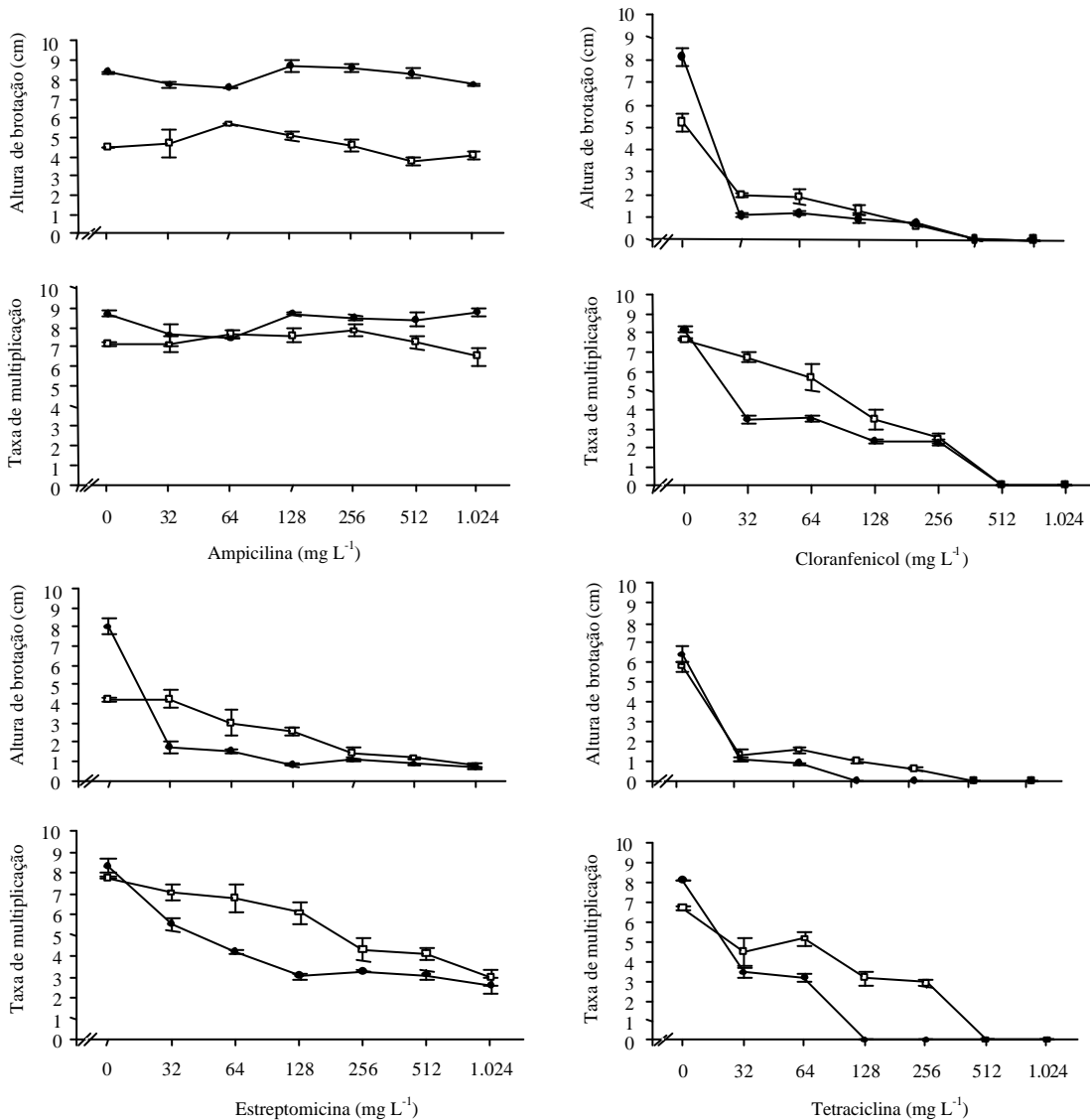


Figura 2. Altura de brotações e taxa de multiplicação de batata em razão de diferentes concentrações de antibióticos nos meios de cultura de consistência semi-sólida (●) e líquida (○), após 21 dias de cultivo. Barras verticais indicam o desvio-padrão da média (n=3).

ser originária de mais de um mecanismo de ação sobre a planta. Entre eles destaca-se o bloqueio da síntese clorofiliana, inibição da absorção de metionina e fosfatos, distúrbios no processo fotossintético, além da inibição de certas enzimas como a polimerase (Prado Filho, 1975; Falkiner, 1990; Reed et al., 1998). Mesmo assim, a estreptomicina é considerada um dos antibióticos menos tóxicos do grupo dos aminoglicosídeos e seu efeito decorre da concentração no meio de cultura (Pollock et al., 1983; Teng & Nicholson, 1997).

Na batata, a presença de estreptomicina no meio levou a um decréscimo nos valores das variáveis estudadas e, a exemplo dos experimentos com cloranfenicol, este decréscimo foi mais acentuado quando os explantes se desenvolveram em meio líquido. Nessa consistência, a altura média das brotações no tratamento testemunha foi de 8 cm, apresentando redução para 1,8 cm já na primeira concentração de estreptomicina testada. Em meio semi-sólido, a redução iniciou-se a partir de 32 mg L⁻¹, sendo que a 128 mg L⁻¹, a altura das brotações foi de 2,6 cm com uma taxa de multiplicação de 6:1, após 21 dias de cultivo. Resultados semelhantes também foram observados por Phillips et al. (1981), que, num estudo com *Helianthus tuberosum*, verificaram que a concentração de 50 mg L⁻¹ de estreptomicina inibiu o crescimento dessa espécie.

Conclusões

1. A adição de ampicilina no meio de cultura semi-sólido ou líquido até a concentração de 1.024 mg L⁻¹ não interfere no crescimento e desenvolvimento in vitro da batata.

2. A estreptomicina apresenta efeito fitotóxico mais pronunciado sobre a cultura da batata quando presente em meio de cultura de consistência líquida.

3. Os antibióticos tetraciclina e cloranfenicol independentemente da consistência, não devem ser adicionados ao meio de cultura, pois afetam severamente o desenvolvimento in vitro da batata.

Referências

BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-

stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 451-457, 1987.

DANTAS, A. C. M.; PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Descontaminação e efeito do fungicida benomil sobre a multiplicação do porta-enxerto de macieira M. 9. **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v. 3, n. 2, p. 245-252, 2000.

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

FIOLA, J. A.; HASSAN, M. A.; SWARTZ, H. J.; BORS, R. H.; McNICOLS, R. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 20, p. 223-228, 1990.

FISSE, J.; BATALLE, A.; PERA, J. Endogenous bacteria elimination in ornamental plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 212, p. 87-90, 1987.

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

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. Provas de sensibilidade a agentes antimicrobianos. In: **DIAGNÓSTICO microbiológico**. São Paulo: Medsi, 2001. p. 795-865.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WAITES, W. M. Effect of combination of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 153-160, 1992.

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

LEIFERT, C.; WAITES, W. M.; NICHOLAST, J. R. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 67, p. 353-361, 1989.

- LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 83-88, 1998.
- LONG, R. D.; CURTIN, T. F.; CASSELLS, A. C. An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal cultures. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 83-91, 1988.
- MARINO, G.; FERRARINI, V.; GIARDINI, S.; BIAVATI, B. Use of lysozyme for treatment of bacterial contamination in *in vitro* shoot cultures of fruit plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, New York, v. 39, n. 3, p. 327-331, 2003.
- NIEDS, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and field grown trees. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, New York, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002.
- OKKELS, F. T.; PEDERSEN, M. G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 199-207, 1988.
- PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, jul. 2003.
- PHILLIPS, R.; ARNOTT, S. M.; KAPLAN, S. E. Antibiotics in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contamination without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 21, p. 235-240, 1981.
- POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELD, R. The toxicity of antibiotics to plant cell culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 2, p. 36-39, 1983.
- PRADO FILHO, L. G. Emprego de antibióticos em agricultura. In: LACAZ, C. S. (Coord.). **Antibióticos**. São Paulo: E. Blucher, 1975. p. 472-509.
- 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**, Dordrecht, v. 52, p. 67-70, 1998.
- SALEHI, H.; KHOSH-KHUI, M. A simple procedure for disinfection of "baby masquerade" miniature rose explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, p. 145-148, 1997.
- SANTOS, I.; SALEMA, R. Penicillins and activity of nitrogen metabolism enzymes in plant tissue culture. **Plant Science**, Calcutta, v. 59, p. 119-125, 1989.
- STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. **General microbiology**. London: MacMillan, 1987. 689 p.
- TENG, W. L.; NICHOLSON, L. Pulse treatments of penicillin-G and streptomycin minimize internal infections and have post-treatment effects on the morphogenesis of ginseng root culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 531-535, 1997.
- YEPES, M. L.; ALDWINCKLE, H. S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotic on proliferation. **Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 15, p. 55-67, 1994.