

CONTROLE DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES EM EXPLANTES DE BANANEIRA (*Musa* AAA cv. CAIPIRA)¹

Juliana Domingues Lima² e Wilson da Silva Moraes³

ABSTRACT

BACTERIAL CONTAMINATION CONTROL IN BANANA EXPLANTS (*Musa* AAA cv. CAIPIRA)

Bacterial contamination control methods were evaluated in *in vitro* multiplication of banana plants (*Musa* AAA cv. Caipira), using NaOCl, rifampicin antibiotic and their combinations. It was not observed excessive explant oxidation after the immersion in NaOCl or rifampicin. The best treatment for recently isolated explants was the immersion in 1% (v/v) NaOCl for ten minutes, followed by immersion in 300 mg L⁻¹ rifampicin for twenty minutes. After contamination, the best treatment was the immersion in 1% NaOCl for ten minutes, followed by immersion in 300 mg L⁻¹ rifampicin for twenty four hours in the dark. The highest contamination control efficiency was obtained with prior immersion of explants in 5% (v/v) NaOCl for twenty minutes, followed by immersion in 300 mg L⁻¹ rifampicin for twenty minutes, and growing in culture medium containing 100 mg L⁻¹ rifampicin. This treatment, however, reduced significantly the explant multiplication. No abnormalities were observed in the explants or plantlets growing in rifampicin-containing culture medium.

KEY WORDS: tissue culture, banana plant, bacteria, NaOCl, rifampicin.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo testar métodos de controle de contaminação bacteriana no processo de multiplicação *in vitro* de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira), utilizando-se hipoclorito de sódio (NaOCl), antibiótico rifampicina e suas combinações. Não houve oxidação excessiva dos explantes após a imersão em NaOCl ou rifampicina. O melhor tratamento para explantes recém isolados foi imersão em NaOCl a 1% (v/v), durante dez minutos, seguido da imersão em 300 mg L⁻¹ de rifampicina, durante vinte minutos. Após a contaminação, o melhor tratamento também foi a imersão em NaOCl a 1% (v/v), durante dez minutos, seguido da imersão em 300 mg L⁻¹ de rifampicina, durante 24 horas no escuro. A maior eficiência no controle da contaminação foi obtida com a imersão prévia dos explantes em NaOCl a 5% (v/v), durante vinte minutos, e 300 mg L⁻¹ de rifampicina, durante vinte minutos, com subsequente cultivo em meio de cultura contendo 100 mg L⁻¹ de rifampicina. Este tratamento, porém, provocou uma significativa redução na multiplicação dos explantes. Não foram observadas anormalidades nos explantes ou plântulas cultivadas em meio de cultura contendo rifampicina.

PALAVRAS-CHAVE: cultura de tecidos, bananeira, bactérias, hipoclorito, rifampicina.

INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, a bananeira (*Musa* spp.) é propagada vegetativamente a partir de brotações laterais ou perfilhos, os quais são obtidos numa taxa de multiplicação muito baixa. Pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de melhorar e controlar a propagação em massa de mudas, utilizando-se de técnicas biotecnológicas modernas, especificamente,

a micropropagação ou multiplicação *in vitro* (Dhed'a *et al.* 1991). Entretanto, problemas de contaminação causada por fungos, bactérias e leveduras, constituem as principais causas de perdas de material vegetal (Leifert & Woodward 1998).

Embora alguns contaminantes possam agir de forma direta sobre o crescimento e desenvolvimento dos explantes, a maioria compromete o desenvolvimento normal dos cultivos, de forma indireta, pela

1. Trabalho recebido em nov./2005 e aceito para publicação em nov./2006 (registro nº 667).

2. Campus Experimental de Registro, Universidade Estadual Paulista (Unesp). Rua Tamekishi Takano, n.5, Centro. CEP 11900-000 Registro, SP. E-mail: judlima@registro.unesp.br

3. Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Regional Vale do Ribeira. Av. Wild José de Souza, n.454, Centro. CEP 11.900-000 Registro, SP.

competição por nutrientes e vitaminas do meio de cultura e pela produção de metabólitos fitotóxicos como os ácidos láctico e acético, e o cianeto. Além disso, certos reguladores de crescimento e antibióticos intoxicam os tecidos vegetais, podendo, inclusive, levá-los à morte (Stanier *et al.* 1987, Kloepper *et al.* 1989, Leifert *et al.* 1989).

Na multiplicação *in vitro* de bananeira comumente são observados níveis elevados de contaminação por bactérias (Oliveira *et al.* 2001, Sá & Braga 2002). Embora, níveis de contaminação abaixo de 2%, nos subcultivos, são usualmente considerados como o mínimo requerido para garantir sucesso na produção (Leifert & Woodward 1998). Na cultivar Caipira, por exemplo, Braga *et al.* (2001) quantificaram perdas de 75% dos explantes na fase de estabelecimento. Perdas essas, causadas por *Pseudomonas maltophilia*, *Bacillus* sp., *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alve*, que podem inviabilizar a multiplicação em nível comercial porque onera o processo de multiplicação *in vitro*.

Do ponto de vista prático, a melhor medida a ser tomada consiste no descarte do material contaminado. Entretanto, no caso da necessidade de manutenção do material vegetal contaminado, torna-se imprescindível efetuar o controle curativo dessas bactérias com o uso de antibióticos específicos. Isso, porém, nem sempre resulta em controle completo da contaminação. Assim, torna-se necessário testar antibióticos alternativos, isolados ou em combinação, tanto para utilização em meio de cultura ou banho dos explantes, como na forma de pulverização das plantas matrizes no campo (Pereira *et al.* 2003).

A rifampicina, um antibiótico do grupo das rifamidas, é indicada para controlar bactérias gram-positivas (Pollock *et al.* 1983) e gram-negativas (Haldeman *et al.* 1987). Assim, tem sido considerada eficiente para controlar e suprimir a contaminação endofítica (Pollock *et al.* 1983, Haldeman *et al.* 1987, Vianna *et al.* 1997), sendo pouco ou não tóxica em cultivos *in vitro* (Fisse *et al.* 1987, Pollock *et al.* 1983).

Dada a importância do genótipo Caipira, no que tange à sua excelente taxa de multiplicação *in vitro*, similaridade com a cultivar comercial Maçã, boa adaptação às condições edafoclimáticas do Estado do Amapá, resistência a mais severa doença da bananeira, a Sigatoka-negra, no ano 2000, implantou-se nesse Estado um programa para a recuperação de bananais. Isso incluiu a introdução desse genótipo, ampliando-se, assim, a demanda por mudas, tanto em quantidade como em qualidade.

O presente estudo teve por objetivo determinar estratégias de controle da contaminação bacteriana no processo de multiplicação *in vitro* de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira), utilizando-se diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl), do antibiótico rifampicina e suas combinações.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e multiplicação “in vitro”

Utilizaram-se perfilhos de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira) com menos de 30 cm de altura, provenientes de matrizes cultivadas em jardins clonais do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA) e da Embrapa Amapá.

A multiplicação *in vitro* foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos do IEPA. Após o isolamento, os ápices caulinares foram reduzidos a 5,0 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro, lavados em água corrente, seguida da imersão em álcool 70%, durante trinta segundos, e em solução com diferentes concentrações de NaOCl e Tween-20 (30 gotas L⁻¹), durante vinte minutos, sob agitação constante. Na seqüência, os ápices caulinares passaram por três lavagens consecutivas em água esterilizada.

Em câmara de fluxo laminar, os ápices caulinares foram reduzidos a 0,6 cm de altura por 0,4 cm de diâmetro e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog 1962), com metade da concentração de sais, pH 5,8 (ajustado antes da autoclavagem) e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar.

Quatro semanas após a inoculação (fase de estabelecimento ou subcultivo zero), os ápices caulinares foram divididos longitudinalmente em quatro partes e distribuídos em frascos contendo meio de multiplicação MS, pH 5,8 (ajustado antes da autoclavagem) e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7,0 g L⁻¹ de ágar e 5,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP). A multiplicação ocorreu em cinco subcultivos de trinta dias, sendo que ao final de cada um, os brotos foram separados e submetidos aos cortes das folhas, sempre que possível, e inoculado um broto por frasco contendo 20 mL de meio de cultura.

A fase de enraizamento também foi realizada em meio MS, contendo metade da concentração de sais, pH 5,8 (ajustado antes da autoclavagem), sendo suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. A duração dessa fase foi de vinte e um dias.

Durante as fases de estabelecimento, multiplicação e enraizamento, os explantes foram mantidos

em câmara de crescimento à temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sob iluminação artificial de $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz, com exceção dos três primeiros dias a partir da inoculação e da repicagem, quando os ápices caulinares foram mantidos no escuro para evitar a oxidação.

Após o enraizamento, efetuou-se a aclimação das plântulas por meio de sua individualização e limpeza em água corrente e posterior plantio em bandejas de plástico contendo substrato Plantmax®. Em seguida, as plântulas foram mantidas em casa-de-vegetação coberta com sombrite, reduzindo-se a radiação plena em 70% e 50%, por um período de duas semanas em cada condição de luminosidade. O controle da ocorrência de variação somaclonal e da oxidação dos explantes durante os subcultivos foi realizado pela eliminação dos tecidos contendo calo e necroses. Na fase de enraizamento foram realizados exames visuais para detecção de plantas fora do padrão e quantificação de perdas.

Experimentos de controle da contaminação bacteriana

Experimento 1: imersão de ápices caulinares em solução de NaOCl, nas concentrações de 1%, 3% e 5% (v/v), durante vinte minutos; ou em 1% (v/v) durante dez minutos, seguida da imersão em solução de rifampicina nas concentrações de 100 mg L^{-1} , 200 mg L^{-1} e 300 mg L^{-1} , durante vinte minutos, antes do estabelecimento. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos (três concentrações de NaOCl e três concentrações de rifampicina, combinadas à menor concentração de NaOCl) e três repetições de sete explantes. As médias do número de explantes contaminados por tratamento foram comparadas pelo teste Tukey, em nível de 5% de significância.

Experimento 2: imersão de ápices caulinares já estabelecidos e naturalmente contaminados, em solução de NaOCl a 1% durante 24 horas; ou em NaOCl a 1% durante dez minutos, seguida da imersão em solução de rifampicina na concentração de 300 mg L^{-1} , durante 24 horas no escuro. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos e vinte repetições, cada uma representada por um explante. Foram calculadas as médias de porcentagens de explantes contaminados em função dos tratamentos.

Experimento 3: imersão de ápices caulinares recém isolados em solução de NaOCl a 5% (v/v), durante dez minutos; seguida da imersão em solução de rifampicina na concentração de 300 mg L^{-1} , durante vinte minutos; e inoculação em meio nutritivo MS ou meio MS contendo 100 mg L^{-1} de rifampicina. O delineamento foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos. No subcultivo zero foram utilizadas 25 explantes por tratamento (genótipo); nos subcultivos 1 a 3, todas as plântulas obtidas durante a multiplicação; e nos subcultivos 4 e 5 e no enraizamento, com plântulas escolhidas ao acaso. A avaliação baseou-se no número de brotações produzidas por explante e no número de explantes contaminados. As médias do número de brotações por tratamento foram comparadas pelo teste Tukey, em nível de 5% de significância.

O antibiótico rifampicina passou por esterilização a frio por meio da filtração em Millipore® ($0,2 \mu\text{m}$) e foi adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem, antes de sua solidificação, conforme recomendado por Grattapaglia & Machado (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando no meio de cultura as condições se tornam favoráveis ao desenvolvimento das bactérias, estas passam a competir com os explantes por nutrientes, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos explantes, podendo, inclusive, levá-los à morte (Pereira *et al.* 2003). Neste estudo, não se verificou morte de explantes com sinais de crescimento bacteriano, sugerindo que os contaminantes são endógenos e não fitopatogênicos. Stead *et al.* (1998) relataram uma ampla faixa de grupos ecológicos como bactérias contaminantes em cultura de tecidos, incluindo os patógenos de plantas e contaminantes acidentais.

A frequência de explantes contaminados na fase de estabelecimento, após a imersão nos diferentes tratamentos é apresentada na Tabela 1. Os resultados indicam que a imersão apenas em solução de NaOCl não mostrou diferenças significativas sobre a contaminação bacteriana, em quaisquer das concentrações utilizadas. Contudo, Carneiro *et al.* (2000), trabalhando com a cultivar Maçã, obtiveram 40% de descontaminação, usando somente NaOCl a 0,5% (v/v).

A imersão dos explantes em solução de NaOCl a 1% e em rifampicina a 100 mg L^{-1} apresentou efeito

Tabela 1. Efeito da imersão de explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira) em solução de NaOCl ou de NaOCl + rifampicina em diferentes concentrações sobre a contaminação dos explantes, na fase de estabelecimento.

Tratamentos ¹	Número médio de explantes contaminados ²
NaOCl 1% (v/v) /20 min.	5,67 a
NaOCl 3% (v/v) /20 min.	5,67 a
NaOCl 5% (v/v) /20 min.	5,33 a
NaOCl 1% (v/v) /10 min. + rifampicina 100 mg L ⁻¹	5,00 a
NaOCl 1% (v/v) /10 min. + rifampicina 200 mg L ⁻¹	3,67 ab
NaOCl 1% (v/v) /10 min. + rifampicina 300 mg L ⁻¹	2,67 b

¹ Cada tratamento foi representado por três repetições e sete explantes.

² Médias (explantes contaminados por tratamento) seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

similar à imersão em NaOCl a 1%. A menor contaminação foi obtida em explantes imersos em NaOCl a 1% e 300 mg L⁻¹ de rifampicina, embora não ocorrendo controle total da contaminação dos explantes (Tabela 1).

O tratamento de explantes em NaOCl a 1%, seguida da imersão em rifampicina a 300 mg L⁻¹, promoveu redução significativa ($p < 0,05$) da contaminação bacteriana quando comparada à imersão apenas em NaOCl a 1%, o método de rotina (Tabela 1). A utilização de NaOCl em concentrações maiores que as usuais não causou oxidação excessiva que impedisse o estabelecimento dos ápices caulinares. A baixa eficiência da descontaminação somente com NaOCl pode ser atribuída à sua ação superficial no tecido vegetal. A rifampicina, por sua vez, foi utilizada como alternativa ao NaOCl porque esta é um antibiótico com capacidade de controlar bactérias endógenas (Torres *et al.* 1998). Enfim, a incidência de contaminação bacteriana nos explantes foi menor, ao final de doze dias, nos tratamentos com imersão em NaOCl a 1%, seguida da imersão em 200 mg L⁻¹ ou 300 mg L⁻¹ de rifampicina (Figura 1).

A imersão dos explantes contaminados em solução de NaOCl a 1% e em rifampicina a 300 mg L⁻¹ foi uma estratégia utilizada na tentativa de recuperar os explantes contaminados (Figura 2). Contudo, este tratamento mostrou-se pouco eficaz, em razão do elevado nível de recontaminação atingido, em torno de 60%, tendo a contaminação se manifestado logo no segundo dia após o tratamento. Isso indica que o antibiótico, provavelmente, apresentou ação bacteriostática e não bactericida.

Quando o antibiótico é fitotóxico, uma estratégia de controle interessante é a imersão dos explantes por um curto período de tempo. Porém, neste caso, a sua eficiência no controle de conta-

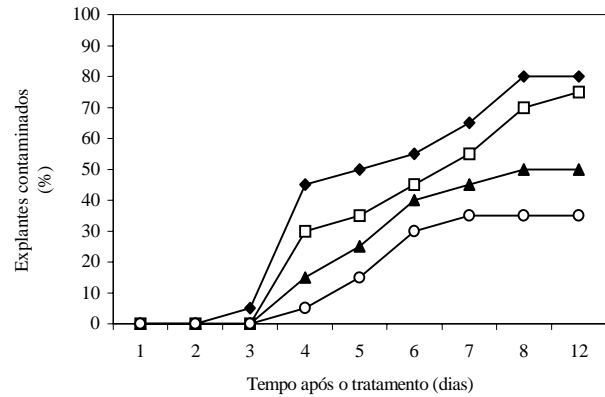


Figura 1. Evolução da contaminação bacteriana em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira) submetidos à imersão em solução de NaOCl a 1% (v/v)/20 min. (◆) e de NaOCl a 1% (v/v)/10 min., seguida da imersão em rifampicina nas concentrações de 100 mg L⁻¹ (□), 200 mg L⁻¹ (▲) e 300 mg L⁻¹ (○) por 20 min.

minações pode ser comprometida. Os resultados obtidos justificam a exposição dos explantes à rifampicina, desde o início do cultivo, para propiciar um controle mais eficiente da contaminação.

Com a adição do antibiótico ao meio de cultura obteve-se redução de 66,6% na contaminação bacteriana (Figura 3a). Para Pereira & Fortes (2003), na maioria dos trabalhos *in vitro*, a frequência de descontaminação não é total, pois o tecido vegetal pode interferir no controle pela destoxificação destas substâncias ou servir de habitat para contaminantes que se translocam para o interior de seus tecidos.

A partir do primeiro subcultivo, a contaminação bacteriana não excedeu 5% nos explantes cultivados em meio MS contendo rifampicina. Mesmo no cultivo em meio MS sem o antibiótico, a contaminação foi maior na fase de estabelecimento, tendendo a

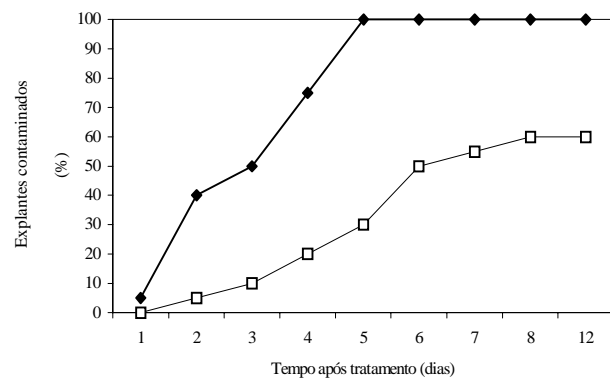


Figura 2. Evolução da contaminação bacteriana em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira) contaminados, submetidos à imersão em solução de NaOCl a 1% (v/v)/24 h (◆) e de NaOCl a 1% (v/v)/10 min., seguida da imersão em rifampicina na concentração de 300 mg L⁻¹/24 h (□).

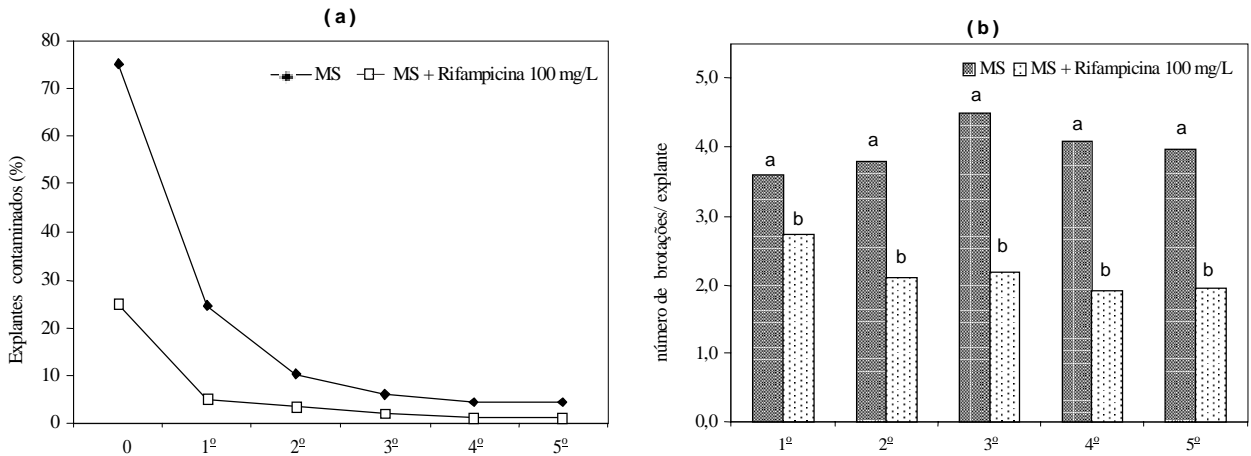


Figura 3. Efeito da imersão de explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira) em solução de NaOCl a 5% (v/v)/10 min, seguida da imersão em solução de rifampicina (300 mg L⁻¹/20 min.) e cultivo em meio nutritivo MS, e em meio MS + 100 mg L⁻¹ de rifampicina, sobre a contaminação bacteriana dos explantes (a) e sobre o número médio de brotações produzidas por explante, da fase de estabelecimento ao quinto subcultivo (b), ao longo de cinco subcultivos. Para o mesmo subcultivo, médias seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

decrecer com o avanço dos cultivos (Figura 3a). Isso facilita o processo de multiplicação, pois a contaminação torna-se evidente logo na primeira fase. No trabalho de Carneiro *et al.* (2000), a rifampicina não apresentou eficiência para o controle de bactérias no cultivo *in vitro* de bananeira 'Maçã', com perdas significativas de explantes. Essa divergência pode ser devido à predominância de certas espécies de bactéria no genótipo sob multiplicação.

O antibiótico adicionado ao meio de cultura apresentou interferência negativa na multiplicação dos explantes, em todos os subcultivos (Figura 3b). Visualmente, não se observaram sintomas de fitotoxidez em explantes ou plântulas enraizadas e cultivadas em meio MS com o antibiótico, nem mesmo diferenças no tamanho ou na morfologia dos explantes (dados não apresentados). Esse efeito, contudo, foi percebido de modo claro, sobre o número de brotos por explante.

Carneiro *et al.* (2000) também observaram que o uso de rifampicina no meio de cultura, além de prejudicar o desenvolvimento dos explantes de bananeira 'Maçã', após o estabelecimento, provoca deformações na parte aérea e redução no tamanho final dos explantes. No presente estudo, na fase de aclimação, também não foram observadas anormalidades em plântulas cultivadas na presença de antibiótico e nem a ocorrência significativa de variantes somaclonais.

Na prática, o uso da rifampicina no meio de cultura gerou três grandes inconvenientes no processo de multiplicação *in vitro*. Primeiro, a necessidade de esterilização a frio do antibiótico e sua adição ao meio de cultura autoclavado, após o resfriamento e pouco

antes da solidificação. Esta operação é trabalhosa, devendo ser feita em câmara de fluxo laminar, onde o meio é depositado em frascos autoclavados. Segundo, o antibiótico produzido comercialmente apresenta-se na cor alaranjada, o que dificulta a detecção de contaminação bacteriana nos frascos. Terceiro, aumento do custo de produção.

Apesar das dificuldades encontradas durante a multiplicação *in vitro* e da redução do número de brotações apresentadas sob adição do antibiótico ao meio de cultura, no conjunto, os tratamentos superiores constituíram-se numa alternativa viável para a micropropagação. Isso, principalmente diante da escassez de plantas matrizes e da necessidade de produção em escala comercial de mudas da cultivar Caipira. Adicionalmente, outra alternativa que precisa ser avaliada é a pulverização das matrizes no campo, com antibiótico, antes da coleta dos ápices caulinares.

CONCLUSÕES

1. A imersão dos explantes recém-isolados em solução de hipoclorito (NaOCl) a 1%, por dez minutos, seguida da imersão em solução de rifampicina a 300 mg L⁻¹ por vinte minutos, constitui-se no tratamento superior entre os avaliados.
2. O melhor tratamento para explantes contaminados é a imersão em solução de hipoclorito a 1% por dez minutos, seguida da imersão em solução de rifampicina a 300 mg L⁻¹, durante 24 horas no escuro.

3. Maior eficiência no controle das contaminações é obtida com a imersão prévia dos ápices caulinares em hipoclorito a 5%, por vinte minutos, seguida da imersão em 300 mg L⁻¹ rifampicina por vinte minutos, e posterior cultivo em meio nutritivo contendo 100 mg L⁻¹ de rifampicina.
4. O cultivo dos explantes em meio nutritivo contendo rifampicina causa sensível redução na multiplicação, porém, não se observou anormalidades nos explantes ou nas plântulas.

REFERÊNCIAS

- Braga, M.F., M. E. L. de Sá & P. C. Mustafá. 2001. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). Rev. Bras. Frutic., 23 (2): 25-219.
- Carneiro, M. de F., G. D. Da Silva, P. A. Ximenes, I. F. Carneiro, J. D. Borges. 2000. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maçã). Pesq. Agropec. Trop., 30 (1): 29-35.
- Dhed'a D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke & E. Langhe. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). Fruits, 46 (2): 125-135.
- Fisse, J., A. Batlle & J. Pera. 1987. Endogenous bacteria elimination in ornamental explants. Acta Hort., 212 (1): 87-90.
- Grattapaglia, D. & M. A. Machado. 1998. Micropropagação. p.183-260. In Torres, A. C., L.S. Caldas, & Buso, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação de plantas. Vol I. CNPH-Embrapa, Brasília. 509 p.
- Haldeman, J. H., R. L. Thomas & D. L. Mckamy. 1987. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. HortScience, 22 (2): 306-307.
- Kloepper, J. W., R. Lifshitz & R. M. Zablutowicz. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol., 7 (1): 39-44.
- Leifert, C., W. M. Waites & J. R. Nicholas. 1989. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. J. Appl. Microbiol., 67 (4): 353-361.
- Leifert, C. & S. Woodward. 1998. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. Plant Cell Tissue and Organ Cult., 52 (1-2): 83-88.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15 (3): 473-497.
- Oliveira, R. P. de, D. G. Silveira & S. de O. Silva. 2001. Bap concentration and tetraploid banana micropropagation efficiency (AAAB group). Sci. Agric., 58 (1): 73-78.
- Pereira, J. E. S., M. L. T. Mattos, G. R. Fortes & G. R. de L. Fortes. 2003. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. Pesq. Agrop. Bras., 38 (7): 827-834.
- Pereira, J. E. S. & G. R. de L. Fortes. 2003. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* de batata em meios semi-sólido e líquido. Pesq. Agrop. Bras., 38 (11): 1273-1279.
- Pollock, K., D. Barfield, G. & R. Shield. 1983. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. Plant Cell Rep., 2 (1): 36-39.
- Sá, M. E. L. de & Braga, M. F. 2002. Avaliação de um protocolo para obtenção de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* sp.) cv. Prata-Anã (Subgrupo AAB). Rev. Bras. de Frutic., 24 (1): 236-239.
- Stanier, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis, P. R. Painter, 1987. General microbiology. MacMillan, London. 689 p.
- Stead, D. E., J. Hennessy & J. Wilson. 1998. Modern methods for identifying bacteria. Plant Cell Tissue and Organ Cult., 52 (1-2): 17-25.
- Torres, A. C., L. S. Caldas & A. T. Ferreira. 1998. Retrospectiva da cultura de tecidos em plantas. p. 11-20. In Torres, A. C., Caldas, L.S. & J. A. Buso (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Vol. I. CNPH-Embrapa, Brasília. 509 p.
- Vianna, G. R., F. A. A Couto, A. B. de Oliveira, L. Zambolim & J. Maria. 1997. A rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. Bragantia, 56 (2): 249-254.