

Uso dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol no meio de cultura para micropropagação de banana 'Mysore'

Effects of the antibiotics ampicillin sodium and chloroamphenicol on the micropropagation of 'Mysore' banana explants

Gustavo Alves PEREIRA^{1,2}; Ednamar Gabriela PALU³; Érica Rodrigues MOREIRA³; Aparecida Conceição BOLIANI⁴; Luiz de Souza CORREA⁴; Enes FURLANI JUNIOR⁴

¹ Trabalho apresentado no VII Simpósio de Banana (SIBANANA) de Registro-SP;

² Autor para correspondência - Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Agronomia pela UNESP - Campus de Ilha Solteira, Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia, Av. Brasil 56, Ilha Solteira, SP, CEP 15385-000. E-mail: gustavo_apereira@yahoo.com.br

³ Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Agronomia pela UNESP/Ilha Solteira, Email: gapalu28@hotmail.com, erica_rmoreira@hotmail.com

⁴ Engenheiro Agrônomo, Docentes da UNESP/Ilha Solteira E-mail: boliani@agr.feis.unesp.br, lcorrea@agr.feis.unesp.br, enes@agr.feis.unesp.br

Resumo

A micropropagação vem sendo desenvolvida e aperfeiçoada para elevar a taxa de multiplicação em curto espaço de tempo e melhorar a qualidade da produção de mudas. Contudo, a contaminação microbiana é um dos maiores problemas dessa técnica. Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência da descontaminação de explantes de bananeira durante o estabelecimento *in vitro*, com o uso dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol adicionados ao meio de cultura. Os antibióticos foram separadamente adicionados ao meio de cultura em concentrações de 0; 5; 10; 15 e 20 mg L⁻¹. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os resultados permitiram concluir que os antibióticos apresentaram controle sobre contaminantes endógenos nos explantes de banana Mysore. A concentração de 15 mg L⁻¹ dos antibióticos reduziu em 20% a contaminação por bactérias e fungos, apresentando também menor taxa de oxidação aos explantes.

Palavras-chave adicionais: Cultura de tecidos de plantas; descontaminantes; *Musa sp.*

Abstract

Micropropagation is a technique being developed and improved viewing to increase the multiplication rate of the production of high quality banana seedlings. Microbial contamination, though, is the most limiting factor of this technique. The objective of this research work was to evaluate the efficiency of decontaminating banana explants during their *in vitro* establishment with the antibiotics ampicillin sodium and chloroamphenicol applied to the culture medium. The antibiotics were, at the doses of 0, 5, 10, 15, and 20 mg L⁻¹, separately added to the culture medium. The resulting data were submitted to the analysis of variance and the means compared by the Tukey test at the level of 5% of probability. These results showed that the antibiotics were capable of exerting control of the endogenous contaminants of 'Mysore' banana explants. At the dose of 15 mg L⁻¹ the antibiotics brought about a reduction of 20% in the bacterial and fungal contamination of the banana explants at which dose they also caused less oxidation to the explants.

Additional keywords: Plant cell culture; decontaminants; *Musa sp.*

Introdução

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de banana. Em 2009, o País apresentou área plantada de 483.586 hectares e área colhida de 479.614 hectares, produzindo 6.783.482 toneladas (IBGE, 2009).

O Estado de São Paulo é o segundo maior produtor de banana do País, com

1.257.539 toneladas, utilizando uma área de 53.078 hectares (IBGE, 2009).

A propagação da bananeira (*Musa sp.*) pode ser feita de várias formas: por sementes (oriundas da sua inflorescência), ou vegetativamente, por meio de mudas ou *in vitro* (PEREIRA et al., 2009). Pelo método tradicional (rizomas), mesmo o material sendo de ótima qualidade, o processo é lento e permite a disseminação de doenças e pragas (SOUZA et al., 2006).

A utilização de técnicas modernas de biotecnologia, como a cultura de tecidos, a manipulação genética e a biologia molecular estão sendo utilizadas para o melhoramento genético de plantas, permitindo assim o desenvolvimento de novas variedades. Dentre as diversas práticas de cultura de tecidos, uma das mais utilizadas é a micropropagação, que atualmente é responsável pela produção de mudas de diversas espécies com fins comerciais (PEREIRA, 2004).

Um dos princípios básicos para o sucesso da micropropagação depende, em parte, de medidas de controle e prevenção da contaminação microbiana (LEIFERT et al., 1994; SILVA et al., 2003) devido a esta técnica proporcionar um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (DANTAS et al., 2002).

Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, soltando, no meio, metabólitos tóxicos que podem ocasionar a morte da plântula (PEREIRA & FORTES, 2003).

Acontaminação bacteriana é bastante nociva para os cultivos realizados *in vitro*, principalmente quando a infecção ocorre por bactérias latentes ou endógenas, introduzidas sistematicamente com os explantes (FISSE et al., 1987; CASSELLS et al., 1988). Para o controle das bactérias, diversos autores citam a inclusão de antibióticos ao meio de cultura, entre eles: WILSON & POWER (1989); GARCIA & RAFAEL (1990); BARROS & PASQUAL (1991); LEIFERT et al. (1991). Podem-se adicioná-los também ao meio de cultura por um período limitado, o necessário para a eliminação dos contaminantes (KNEIFEL & LEONHARDT, 1992; LEIFERT et al., 1992) ou utilizá-los na forma de imersão antes do isolamento (TANAKA et al., 1983; SCORTICHINI & CHIARIOTTI, 1988). Muitos antibióticos apresentam efeito fitotóxico para as plantas, alterando-lhes o crescimento *in vitro* (DODDS & ROBERTS, 1985). Entretanto, essa influência sobre a regeneração vegetal depende da concentração a que o tecido foi exposto (OKKELS & PEDERSEN, 1988).

Os antibióticos são usados para o controle de contaminações bacterianas endógenas, que representam sério problema no estabelecimento das culturas. Os explantes, depois de reduzidos os contaminantes superficiais, podem ser transferidos para meio nutritivo contendo antibiótico (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Esses autores citam que o antibiótico deve ser esterilizado a frio e adicionado ao meio antes de sua solidificação, e também apresentar um amplo espectro de ação. Os antibióticos mais usados em cultura de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática e não bactericida. Em laboratórios comerciais de micropropagação de

plantas, LEIFERT et al. (1991) identificaram 293 espécies de bactérias, das quais 13% pertenciam ao gênero *Bacillus*. As espécies deste gênero formam endósporos resistentes ao álcool e ao calor, podendo, inclusive, ser disseminadas pelo álcool utilizado na esterilização dos instrumentos e resistir à flambagem e à autoclavagem do meio de cultura, por 20 minutos, a 110 °C (BOXUS & TERZI, 1987; NANNETTI, 1994).

O sucesso da micropropagação depende da sequência de fases ou etapas, em que o êxito de cada uma é necessário para o êxito da próxima etapa e a introdução do explante no meio de cultivo (estabelecimento), cujo sucesso depende de uma eficiente assepsia dos explantes a serem estabelecidos (GEORGE, 1993).

Na fase de estabelecimento do cultivo, a contaminação pode comprometer o trabalho de micropropagação. Quando é exógena, a possibilidade de controle dos principais agentes contaminantes (fungos e bactérias) é considerável, e quando a contaminação é endógena, as consequências podem ser limitantes, podendo haver perda de tempo, de recursos financeiros e de material genético (SOUZA et al., 2006). Para minimizar a contaminação microbiana, inúmeros protocolos de esterilização são apresentados por diversos autores. Estes relatam o uso de substâncias, como hipoclorito de sódio (PEREIRA et al., 2009) e, em alguns casos, a adição de antibióticos ao meio de cultura (ERIG & SCHUCH, 2003; TANPRASERT & REED, 1998). Assim sendo, a utilização de antibióticos é uma importante ferramenta para o controle de contaminações bacterianas endógenas, que frequentemente representam sérios problemas no estabelecimento das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência da descontaminação de explantes de bananeira durante o estabelecimento *in vitro*, com o uso de diferentes concentrações dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol adicionados ao meio de cultura.

Material e métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Socioeconomia da Faculdade de Engenharia da UNESP - Câmpus de Ilha Solteira - SP, em junho de 2009. Foram utilizadas mudas de bananeira do tipo chifrinho da cultivar Mysore, procedentes da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP - Câmpus de Ilha Solteira, localizada em Selvíria - MS, distante 13 km de Ilha Solteira.

O experimento foi constituído da adição de diferentes concentrações do antibiótico ampi-

cilina sódica e cloranfenicol ao meio de cultura. Os tratamentos foram os seguintes: T1 (0 mg L⁻¹ de ampicilina sódica); T2 (5 mg L⁻¹ de ampicilina sódica); T3 (10 mg L⁻¹ de ampicilina sódica); T4 (15 mg L⁻¹ de ampicilina sódica); T5 (20 mg L⁻¹ de ampicilina sódica); T6 (0 mg L⁻¹ de cloranfenicol); T7 (5 mg L⁻¹ de cloranfenicol); T8 (10 mg L⁻¹ de cloranfenicol); T9 (15 mg L⁻¹ de cloranfenicol), e T10 (20 mg L⁻¹ de cloranfenicol).

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com sacarose a 30 g L⁻¹ e ágar a 7,0 g L⁻¹, com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (esterilização) a 120 °C com 1 kgf cm⁻², durante vinte minutos, sendo vertido em potes de vidro (tipo maionese) de 200 ml, cada recipiente contendo 20 ml de meio. As doses dos antibióticos correspondentes aos tratamentos foram adicionadas ao meio de cultura após sua esterilização, dentro da câmara de fluxo laminar, com o mesmo estando morno e em estado líquido para não prejudicar a ação dos antibióticos.

Após a obtenção dos rizomas, eles foram lavados em água corrente (torneira) para retirar o excesso de solo e raiz. Em seguida, as bainhas foram seccionadas com uma faca estéril, permitindo assim a redução de seu tamanho para

5 mm. Para a desinfestação superficial dos explantes, fora da câmara de fluxo laminar, eles foram imersos em 750 ml de água destilada e 250 ml de hipoclorito de sódio (0,5% de cloro ativo) durante vinte minutos, e sua lavagem foi realizada dentro da câmara de fluxo laminar, sendo que a extração dos meristemas foi realizada em condições assépticas, sendo incubados ao meio de cultura com os respectivos tratamentos. A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz, a uma intensidade luminosa de 30 µmol m⁻² s⁻¹. Os explantes foram avaliados após trinta dias, contados da data de inoculação, período que compreende a fase de estabelecimento da cultura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição representada por um explante. O delineamento utilizado está de acordo com CARNEIRO et al. (2000) ; LIMA & MORAES (2006), que utilizaram um explante por repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância; e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 1 - Contaminação de explantes de bananeira da variedade Mysore submetidos a diferentes concentrações de ampicilina sódica no meio de cultura. *Contamination of banana explants of the 'Mysore' cultivar growing in a medium culture treated with different doses of ampicillin sodium.*

Antibiótico ampicilina sódica no meio de cultura			
Tratamentos	Contaminação com bactéria (%)	Contaminação com fungo (%)	Oxidação (%)
0 mg L ⁻¹	100 A	60 A	100 A
5 mg L ⁻¹	100 A	20 AB	100 A
10 mg L ⁻¹	20 B	00 B	40 B
15 mg L ⁻¹	20 B	00 B	00 B
20 mg L ⁻¹	20 B	00 B	100 A
CV (%)	66,62	204,12	101,02

*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Contaminação de explantes de bananeira da variedade Mysore submetidos a diferentes concentrações de cloranfenicol. *Contamination of banana explants of the 'Mysore' cultivar growing in a medium culture treated with different doses of chloramphenicol.*

Antibiótico ampicilina sódica no meio de cultura			
Tratamentos	Contaminação com bactéria (%)	Contaminação com fungo (%)	Oxidação (%)
0 mg L ⁻¹	100 A	60 A	20 A
5 mg L ⁻¹	80 AB	00 B	00 A
10 mg L ⁻¹	20 B	00 B	20 A
15 mg L ⁻¹	20 B	00 B	00 A
20 mg L ⁻¹	20 B	00 B	100 B
CV%	83,33	197,64	101,50

*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

As frequências de descontaminações durante a fase de estabelecimento, com a adição dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol ao meio de cultura, são apresentadas nas Tabelas 1 e 2. Os resultados indicam que, no experimento com ampicilina sódica, houve redução significativa de contaminação por bactéria nos tratamentos com 10; 15 e 20 mg L⁻¹

Para o controle de fungo, a redução significativa de contaminações pode ser observada nos tratamentos com 5; 10; 15 e 20 mg L⁻¹. Com relação à oxidação, verificou-se que o tratamento com 20 mg L⁻¹ apresentou a maior frequência, com 100%, verificando assim que esta dosagem permitiu acelerar o processo de oxidação, podendo provocar a perda dos explantes.

Para o experimento com o antibiótico cloranfenicol, os resultados indicam que houve redução significativa de contaminação por bactéria e fungos nos tratamentos com 10; 15 e 20 mg L⁻¹, concordando com BIASI (1995) que, no cultivo *in vitro* de gemas de abacateiro usando o antibiótico cloranfenicol, na concentração de 50 mg L⁻¹, obtendo redução de contaminação, não verificou diferença significativa e obteve 77,4% de gemas brotadas.

As concentrações de 5; 10; 15 e 20 mg L⁻¹ de cloranfenicol apresentaram porcentagens respectivas de 80; 20; 20 e 20% dos explantes por bactéria, sem diferença estatística significativa, concordando com de HÉCTOR et al. (2005), que observaram que o uso de cloranfenicol no meio de cultura foi necessário para o controle de bactérias e fungos em menta-japonesa, obtendo 60% de explantes sadios e com baixa fitotoxicidade (15,4%), utilizando 2,5 mg L⁻¹ de cloranfenicol.

CARNEIRO et al. (2000), utilizando os produtos hipoclorito de sódio, benomyl, rifampicina e cefotaxima, para a descontaminação de explantes da bananeira-Maçã, obtiveram êxito adicionando 300 mg L⁻¹ de cefotaxima ao meio de cultura, verificando controle de 73,33% para bactérias.

LIMA & MORAES (2006) utilizaram explantes em meio nutritivo contendo 100 mg L⁻¹ de rifampicina e constataram sensível redução na multiplicação de bananeira Caipira, não sendo observadas anormalidades nos explantes ou nas plântulas.

Conclusão

Os antibióticos apresentaram controle sobre contaminantes endógenos nos explantes de banana Mysore.

A dosagem de 15 mg L⁻¹ dos antibióticos reduziu a contaminação por bactérias e fungos, e apresentou também menor taxa de oxidação aos explantes.

Agradecimentos

Universidade Estadual Paulista 'Julio de Mesquita Filho' (UNESP/ Ilha Solteira-SP).

Referências

BARROS, I.; PASQUAL, M. Contaminação fúngica, bacteriana e oxidação "in vitro" de explantes de *Coffea arábica* L. cv. Catuaí LCH-2077-2-5-44. **Ciência e Prática**, Lavras, v.15, n.2, p.145-153, 1991.

BIASI, L. A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura *in vitro* de abacateiro. **Bragantia**, Campinas, v.54, n.2, p.251-256, 1995.

BOXUS, P. H.; J. M. TERZI. Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.212, p.91-103, 1987.

CARNEIRO, M. F.; DA SILVA G. D.; XIMENES, P. A.; CARNEIRO, I. F.; BORGES, J. D.. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa AAB* cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v.30, n.1, p.29-35, 2000.

CASSELLS, A. C.; CARNEY, B. F.; MCCARTHY, E.; McHUGH, A.; HARMEY, M. A. Problems posed by cultivable bacterial endophytes in the establishment of axenic cultures of *Pelargonium x domesticum*: the use of *Xanthomonas pelargonii* – specific ELISA, DNA probes and culture indexing in the screening of antibiotic treated and untreated donor plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.225 p. 153-161, 1988.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. In: LUZ, W. C. da (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 10.ed. Passo Fundo: Passo Fundo: RAPP, 2002. v.10, p.391-407.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2nd.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. 232p.

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 Agrociência**, Pelotas, v.9, n.3, p.221-227, 2003.

- FISSE, J.; BATALLE, A.; PERA, J. Endogenous bacteria elimination in ornamental plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.212, p.87-90, 1987.
- GARCIA, E. G.; RAFAEL, M. Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* 'Catimor') cultivados "in vitro". **Agronomia Tropical**, Maracay, v.40, n.4-6, p.281-290, 1990.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2nded. London: Exegetics. Inglaterra, 1993. p.98-165
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI, 1998. v.1, p.183-260.
- HÉCTOR E., BARRÓN, M. L.; GODOY, L.; DÍAZ, B.; TORRES, M. M. H. A. Un método para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.). **Cultivos Tropicales**, La Habana, v.26, n.1, p.69-71, 2005.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Cultura Temporárias e Permanentes. Rio de Janeiro. v.36, p.1-93, 2009.
- KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against gram positive and gram negative. bacteria isolated from plant tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.29, p.139-144, 1992.
- LEIFERT, C.; MORRIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Netherlands, v.13, n.2, p.139-183, 1994.
- LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WAITES, W. M. Effect of combinations 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*, *Chisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.71, n.4, p.307-330, 1991.
- LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.36, n.3, p.181-186, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3 p.473-497, 1962.
- NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp.** 1996. 106f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.
- OKKELS, F. T.; PEDERSEN, M. G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.225, p.199-207, 1988.
- PEREIRA, J.; FORTES, G. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.11, p.1273-1279, 2003.
- PEREIRA, G. A. **Uso do gene *xyIA* – xilose isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros**. 2004. 38f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- PEREIRA, G. A.; RIBEIRO, B. V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M. B. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.2, p.43-46, 2009.
- SCORTICHINI, M.; CHIARIOTTI, A. *In vitro* culture of *Prunus persica* var. Laevis Gray (nectarine): detection of bacterial contaminants and possibility of decontamination by means of antibiotics. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.225 p.109-118, 1988.
- SILVA, J. T. S.; NHUT, D. T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v.97, p.397-410, 2003.
- SOUZA, S. A.; LEDO, C. A. S.; SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; FARIA, G. A.; NETO, H. P. S.; SANTOS SEREJO, J. S.; SILVA, K. M.; COSTA, M. A. P. C.; SOARES, T. L.; JUNGHANS, T. G.; ALMEIDA, W. B. **Introdução à micropropaga-**

ção de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. p.11-151.

TANAKA, M.; KUMURA, M.; GOI, M. Surface-sterilization for in vitro culture of phalaenopsis flowerstalk cutting using antimicrobials. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.131, p.321-328, 1983.

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

WILSON, Z. A.; POWER, J. B. Elimination of systemic contamination in explant and protoplast cultures of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.7, p.622-625, 1989.