

FONTE E IDADE DE EXPLANTE, RADIAÇÃO LUMINOSA E COMBINAÇÕES DE NAA E BAP NA INDUÇÃO DE CALOS EM *STYLOSANTHES SCABRA* VOG.¹

MARCELO CARNIER DORNELAS², MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA³ e CLÁUDIO LOPES DE SOUZA JUNIOR⁴

RESUMO - Estudou-se a influência de três variáveis sobre indução e cultura de calos de *Stylosanthes scabra*; diferentes combinações de NAA e BAP, fonte e idade de explante, e duas condições de luminosidade. Os resultados demonstraram que hipocótilos com 10 dias de idade, cultivados em meio MS, suplementados com 2,0 mg/l de BAP, sob 835 lux ($1,6 \times 10^2$ cal . cm⁻² . min⁻¹) de intensidade luminosa, proveniente de lâmpadas Gro-Lux, produzem calos com maior peso e níveis mais elevados de regeneração de brotos.

Termos para indexação: cultura de tecidos vegetais, condições de luminosidade.

EFFECTS OF SOURCE AND AGE OF EXPLANT, LIGHT RADIATION AND COMBINATIONS OF NAA AND BAP ON THE INDUCTION OF *STYLOSANTHES SCABRA* VOG. CALLI

ABSTRACT - The influence of several factors on the growth and morphogenesis of plant cell, tissue and organ cultures have been intensively reported. The present investigation studied the influence of three variable factors on callus culture of *Stylosanthes scabra*: different NAA and BAP combinations, source and age of explant and two light conditions. The results demonstrated that 10 day hypocotils, cultured on MS medium supplemented with 2.0 mg.l⁻¹ of BAP, under 835 lux (1.6×10^2 cal . cm⁻² . min⁻¹), of light intensity provided by Gro-Lux lamps produce a greater weight calli with higher levels of shoot regeneration.

Index terms: plant tissue culture, light conditions.

INTRODUÇÃO

O *Stylosanthes scabra* é uma leguminosa papilionoidea, nativa na América do Sul e adaptada a solos pobres e largas estações de seca. No Brasil, juntamente com outras espécies do gênero, é encontrada nos cerrados, onde mostra adaptação a solos de pH baixo e níveis de até 80% de alumínio saturado (Thomas 1984). Como planta forrageira tem sido utilizada em regiões tropicais, principalmente na Austrália, onde a potencialidade agrônômica da espécie tem sido avaliada (Burt & Miller 1962, Stace & Edye 1984).

Recentemente, metodologias de cultura de tecidos (Scowcroft & Adamson 1976, Meijer & Broughton 1981, Mroginski & Kartha 1981, Meijer 1982a, 1982b, Ferreira 1983, Meijer 1984, Rey et al. 1985, Godwin et al. 1987a), de cultura de protoplastos (Meijer & Steinbiss 1983, Szabados & Roca 1986), e de manipulação genética e transformação, utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens* (Manners 1987, 1988; Manners & Way 1989) em algumas espécies do gênero *Stylosanthes*, têm sido descritas na literatura.

Até o momento, a única referência na literatura sobre a cultura *in vitro* de calos com posterior regeneração de plantas na espécie *S. scabra*, era o trabalho de Godwin et al. (1987b), que utilizou explantes oriundos de folha, aste e pecíolo de cinco genótipos australianos, que respondiam diferentemente combinações de 2,4-D, BAP e cinetina, observando-se alta frequência de regeneração da

¹ Aceito para publicação em 23 de maio de 1991.

² Em curso de graduação em Engenh. Agrônôm. da ESALQ/USP, Caixa Postal 83, CEP 13400 Piracicaba, SP.

³ Enga.-Agra., Dra., Profa. Dep. de Genética, ESALQ/USP.

⁴ Eng.-Agr., Dr., Prof. Dep. de Genética, ESALQ/USP.

parte aérea em apenas três genótipos. O presente trabalho é, portanto, a primeira publicação de resultados obtidos com a cultura *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de um genótipo brasileiro da espécie *S. scabra* (introdução EPAMIG 1043), sendo esta a primeira reportagem de estudos sobre o efeito da radiação luminosa e idade da fonte de explantes em culturas *in vitro* de calos na espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *S. scabra* (EPAMIG 1043), obtidas junto ao Dr. Nuno Maria Souza Costa (EPAMIG), foram escarificadas por cerca de dois minutos em H_2SO_4 (98% - Symylar) e lavadas em água corrente, sendo em seguida esterilizadas em etanol 70% (v/v) por 40 segundos, em NaOCl 2% (v/v) por 15 minutos, e rinsadas quatro vezes em água estéril. A germinação se deu em frasco de 300 ml de capacidade, sendo inoculadas cinco sementes por frasco, contendo 30 ml de meio basal MS (Murashige & Skoog 1962), com metade de sua concentração original de sais e vitaminas, acrescido de 1,5% (p/v) de sacarose, livre de reguladores de crescimento, tendo seu pH acertado para 5,8, solidificado com 0,8% (p/v) de ágar (Reagex) e autoclavado a 121°C, a 1 atm, por 20 min. Os frascos foram vedados com parafilme (Rolopac) e mantidos por 16 horas de fotoperíodo sob 1.600 lux ($1,6 \times 10^2$ cal. $cm^{-2} \text{ min}^{-1}$) de intensidade luminosa, proveniente de 1 lâmpada fluorescente branca fria (GE, 85 W), à temperatura de $25 \pm 2^\circ C$.

Efeitos de fonte de explantes, reguladores de crescimento e intensidade luminosa em produção de calos

Foram utilizadas três fontes de explantes excisados das plântulas, 40 dias após a germinação: a parte central dos cotilédones, medindo 90 mm^2 e pesando 5 mg em média, e o hipocótilo, que foi dividido em duas regiões - proximal à raiz e distal à mesma -, sendo denominadas hipocótilo inferior e hipocótilo superior, respectivamente; ambas medindo 10 mm e pesando 5 mg em média. Os explantes foram inoculados em frascos de 30 ml de capacidade (sendo um explante por frasco), contendo 5 ml de meio contendo sais e vitaminas de MS, acrescido de 3,0% (p/v) de sacarose, suplementado com NAA e BAP em 16

combinações de concentrações, pH corrigido para 5,8, solidificado com 0,8% (p/v) de ágar (Reagex) e autoclavado a 121°C, a 1 atm, por 20 min. As concentrações de reguladores de crescimento utilizadas foram: 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg/l^{-1} de NAA e 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/l^{-1} de BAP (Tabela 1). Para cada um dos meios resultantes dessas combinações foram inoculados 30 frascos, sendo 10 frascos por explante, que foram submetidos a duas condições de luz, em igual número, totalizando 480 frascos. Foram usados 835 lux de intensidade luminosa, proveniente de uma lâmpada Gro-Lux (Sylvania, 20 W) que emite radiações em todas as faixas do espectro visível, e 1.600 lux provenientes de uma lâmpada fluorescente branca fria (GE, 85 W). As condições de temperatura e fotoperíodo foram idênticas àquelas utilizadas para a germinação das sementes.

Os calos foram pesados aos 28 dias de cultura, em condições assépticas, em balança analítica (A200 - Marte).

Foram atribuídas notas de 0 (calos pardacentos) a 5 (calos com coloração verde-intenso) para caracterizar a coloração dos calos provenientes dos diferentes tipos de explantes.

Efeito de idade de plântulas para explante em produção de calos

Neste experimento foram utilizados dois tipos de explantes, ou seja, a parte central dos cotilédones e dos hipocótilos, que foram retirados de plântulas com 10, 20, 30 e 40 dias de idade. Tais explantes foram inoculados em frascos de 30 ml de capacidade, contendo 10 ml de meio basal MS, suplementado com 0,5 $mg \cdot l^{-1}$ de NAA e 1,0 $mg \cdot l^{-1}$ de BAP, vedados com parafilme e submetidos a 835 lux de radiação luminosa, emitida por duas lâmpadas Gro-

TABELA 1. Denominação dos meios de cultura utilizados, de acordo com as concentrações de NAA e BAP.

		BAP (mg/l)			
		0,1	0,5	1,0	2,0
NAA (mg/l)	0,5	M1	M2	M3	M4
	1,0	M5	M6	M7	M8
	2,0	M9	M10	M11	M12
	3,0	M13	M14	M15	M16

Lux (Sylvania, 20 W). As condições de temperatura e fotoperíodo foram idênticas às do experimento 1. Foram feitas 20 repetições de cada tratamento, perfazendo um total de 160 frascos. Aos 28 dias de cultura, procedeu-se à pesagem dos calos obtidos e à contagem do número de calos que mostravam diferenciação de parte aérea.

Efeito de BAP em produção de calos

As fontes de explantes utilizadas foram idênticas às do experimento 1; os explantes foram inoculados em frascos com 30 ml de capacidade, contendo 10 ml de meio MS suplementado com 0,0; 0,5; 1,0 ou 2 mg . l⁻¹ de BAP. As culturas desenvolveram-se sob as mesmas condições de luz, temperatura e fotoperíodo descritas para o experimento 2, e, aos 28 dias de cultura, procedeu-se à pesagem dos calos obtidos, utilizando-se 32 repetições de cada tratamento.

Nos três experimentos, os dados referentes ao peso de matéria fresca dos calos foram submetidos a análise de variância, segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância mostraram que existe diferença significativa entre os pesos de calos provenientes das diferentes fontes de explante (Tabela 2), concordando com o que já havia observado Ferreira (1983), trabalhando com explantes de hipocótilo, raiz e folíolos maduros de *S. bracteata*.

Os cotilédones produziram, em média, calos com maior peso, seguindo-se os hipocótilos inferiores (Fig. 1). As maiores médias de peso de calos, provenientes de cotilédones, ocorreram em meios com menor quantidade de auxina (0,5 mg . l⁻¹) e concentrações correspondentes de 0,5 e 1,0 mg . l⁻¹ de citocinina. As demais combinações de fitoreguladores, produziram calos com pesos entre 50 e 150 mg (Fig. 2).

Os calos regenerados a partir dos hipocótilos mostraram tendência a diminuir o peso de matéria fresca à medida em que se elevou a concentração de NAA, para uma determinada concentração de BAP (Fig. 3 e 4). Esta observação é contrária àquela feita por Ferreira

TABELA 2. Análise da variância do peso de matéria fresca de calos provenientes de três fontes de explante, submetidos a duas condições luminosas e 16 meios de cultura.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Prob > F
Meio	15	305848.7500	20389.9167	0.00001
Explante	2	568305.9786	284152.9893	0.00001
Luz	1	34582.3269	34582.3269	0.00014
Expl. (meio)	32	798056.2735	24939.2585	0.00004
Luz (meio)	16	212540.6154	13283.7885	0.00939
Luz (expl.)	3	71633.9808	71633.9808	0.00088
Luz (expl. x meio)	48	501628.8205	10450.6004	0.02020
Resíduo	350	685184.3034		
Total	467	3177781.0491		

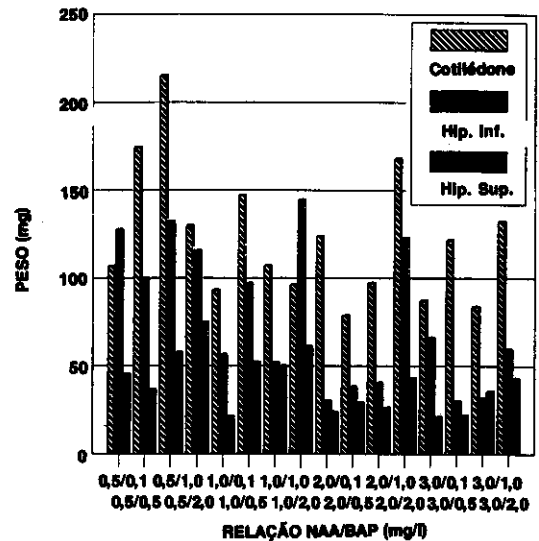


FIG. 1. Peso de matéria fresca de calos diferenciados a partir de 30 tipos de explante, submetidos a 16 condições de meio de cultura, aos 28 dias após a inoculação.

(1983), que reportou um aumento no peso de calos derivados de explantes hipocotiledonares de *S. bracteata*, à medida que a concentração de NAA no meio de cultura foi elevada de 0,1 a 3,2 mg . l⁻¹. Houve uma tendência de aumento no peso dos calos, com a elevação dos

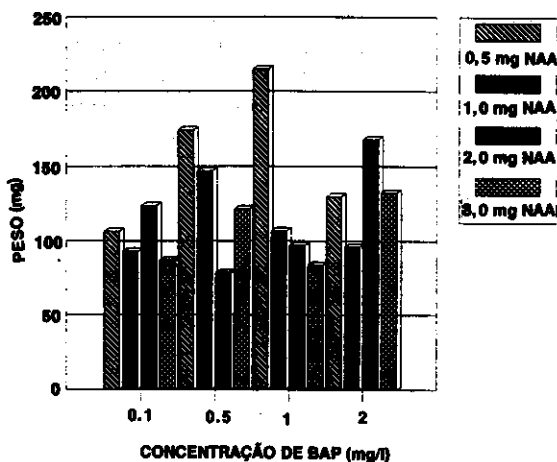


FIG. 2. Peso de matéria fresca de calos obtidos de explantes cotiledonares, submetidos a 16 combinações hormonais, após 28 dias de cultivo.

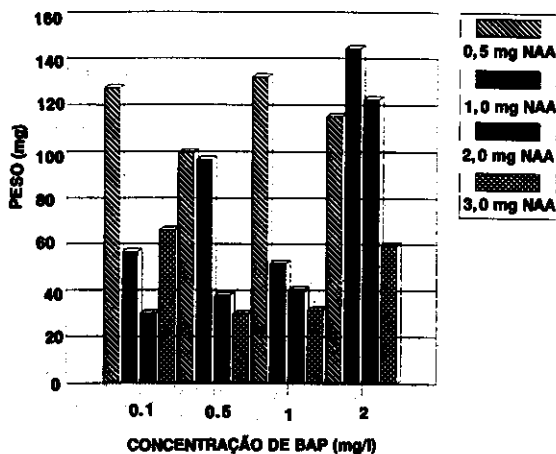


FIG. 3. Peso de matéria fresca de calos obtidos dos hipocótilos inferiores e submetidos a 16 combinações hormonais.

níveis de BAP para uma determinada concentração de NAA (Fig. 4), o que nos leva a especular que há uma alta concentração de auxina endógena nos explantes utilizados.

No presente trabalho observou-se que os meios com a relação NAA/BAP sendo maior que 10, ou seja, 1,0 mg . l⁻¹ de NAA + 0,1 mg . l⁻¹ de BAP (M5); 2,0 mg . l⁻¹ de NAA + 0,1 mg . l⁻¹ de BAP (M9); 3,0 mg . l⁻¹

de NAA + 0,1 mg . l⁻¹ de BAP (M13) e 3,0 mg . l⁻¹ de NAA + 0,5 mg . l⁻¹ de BAP (M14); produziram 31%, 12%, 44% e 12%, respectivamente, de calos com rizogênese; observou-se ainda que a rizogênese diminuía com o aumento da concentração de BAP no meio. Outros autores (Scowcroft & Adamson 1976, Meijer & Broughton 1981, Mroginski & Kartha 1981, Ferreira 1983, Meijer 1984, Godwin et al. 1987b) reportaram a presença de raízes em calos desenvolvidos em meios onde a relação auxina/citocinina era superior a 1,5, sugerindo que a rizogênese prematura dificulta a regeneração de brotos.

A percentagem de explantes que formaram calos foi praticamente constante para todos os níveis de fitorreguladores utilizados (Fig. 5).

As radiações emitidas pelas lâmpadas utilizadas influenciaram o desenvolvimento dos calos (Tabela 2), sendo que o tratamento Gro-lux favoreceu o seu desenvolvimento (Fig. 6). Os dados da Tabela 2 mostram ainda haver um efeito decorrente das interações entre tipo de explante x meio, lux x tipo de explante e entre luz x meio.

Observou-se que os calos formados a partir de explantes de cotilédone, diferiam em coloração dos calos provenientes de explantes de hipocótilo. Utilizando-se a média das notas

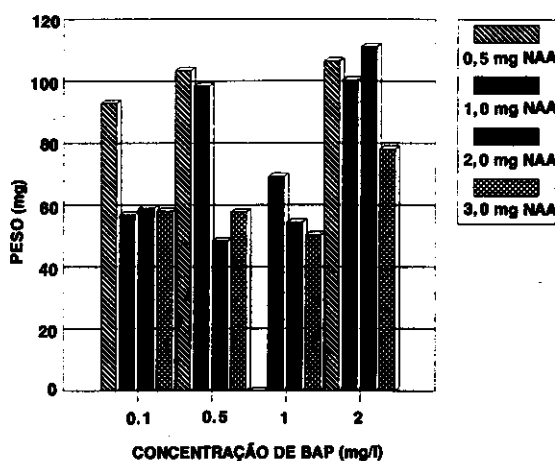


FIG. 4. Peso de matéria fresca de calos obtidos dos hipocótilos superiores e submetidos a 16 combinações hormonais.

obtidas para cada tipo de explante, observou-se que os calos de coloração verde mais intenso foram aqueles formados a partir de cotilédono (Fig. 7).

Os resultados da análise da variância mostraram que há influência da idade e do tipo de

explante no peso de matéria fresca de calo (Tabela 3). Os calos com maior peso desenvolveram-se a partir de cotilédono, e observou-se uma tendência de diminuição do peso dos calos (Fig. 8), bem como de ocorrência de rizogênese (Fig. 9) com o avanço da idade do explante, sendo maior a rizogênese em calos oriundos de cotilédono.

A maior média de peso observada ocorreu

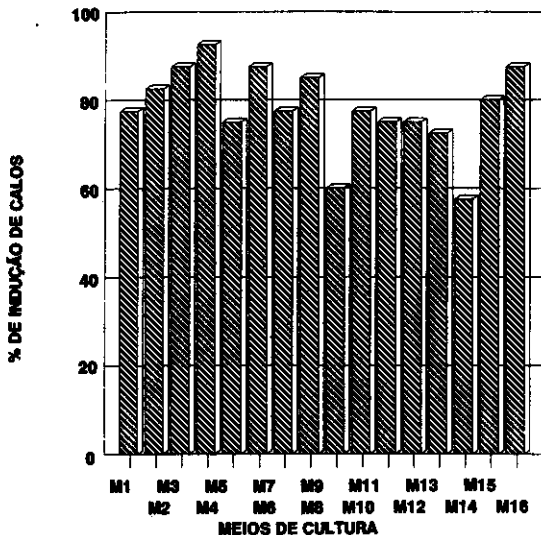


FIG. 5. Indução de calos nos 16 tipos de meio de cultura.

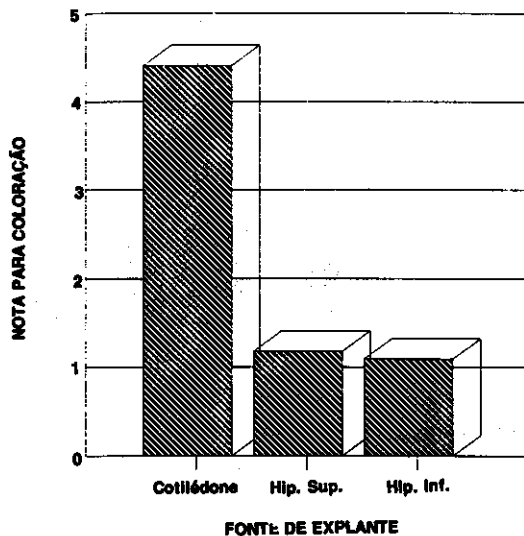


FIG. 7. Calos provenientes de cotilédono, hipocótilo superior e inferior. Notas para coloração: desde pardos (0) até verdes (5).

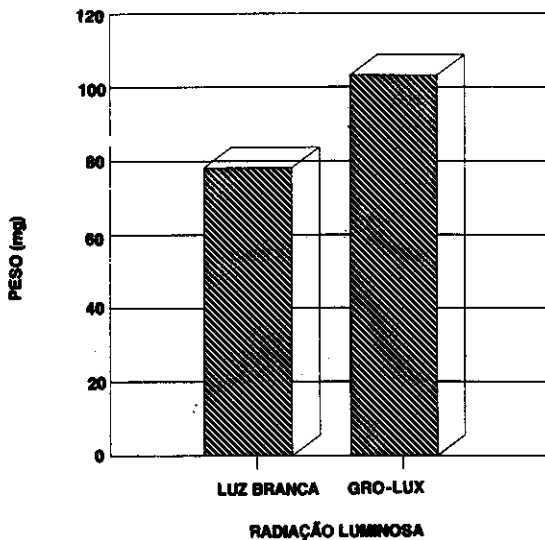


FIG. 6. Peso de matéria fresca de calos desenvolvidos sob duas condições de luz.

TABELA 3. Análise da variância do peso de matéria fresca de calos provenientes de duas fontes de explante, e quatro idades.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Prob > F
Idade	3	714432.469	238144.156	0.00001
Explante	1	10263209.556	10263209.556	0.00001
Idade x explante	3	356261.019	118753.673	0.00001
Resíduo	152	1524142.550	10027.254	
Total	159	12858045.594		

no tratamento onde utilizaram-se explantes cotilédones de 20 dias de idade. Porém, notou-se que tal tratamento foi o que apresentou maior percentagem de calos com rizogênese, o que, segundo alguns autores, deve prejudicar a

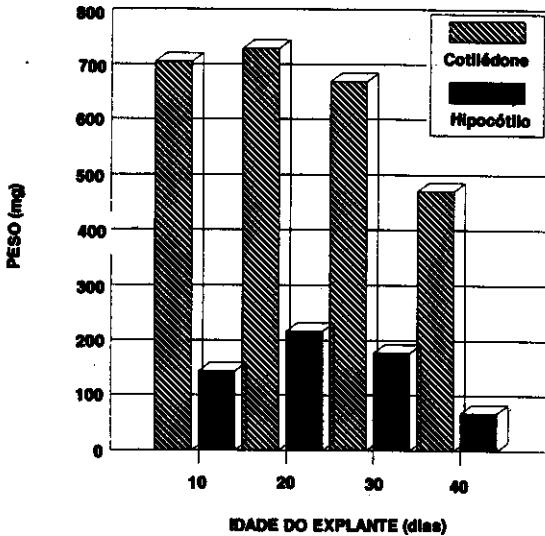


FIG. 8. Peso de matéria fresca de calos desenvolvidos a partir de 2 tipos de explante, inoculados em diferentes idades.

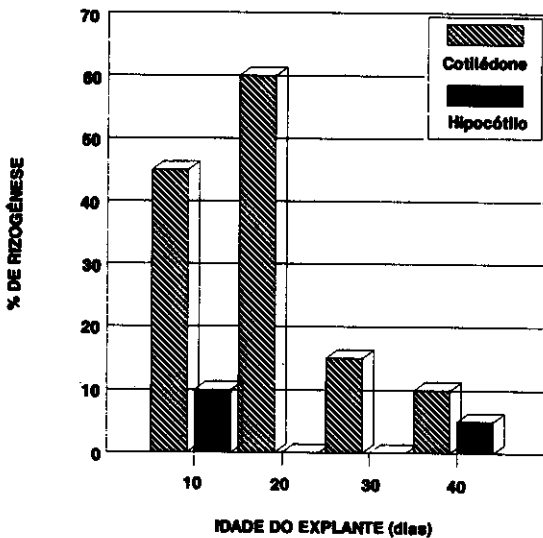


FIG. 9. Rizogênese em calos oriundos de 2 tipos de explante, inoculados em diferentes idades.

regeneração posterior de parte aérea (Scowcroft & Adamson 1976, Meijer & Broughton 1981, Mroginski & Kartha 1981, Ferreira 1983, Meijer 1984, Godwin et al. 1987b), embora tenham sido observados calos com formação de raízes e parte aérea, simultaneamente (Fig. 10).

Os calos desenvolvidos a partir de hipocótilo apresentaram maior percentagem de regeneração de gemas, em comparação com os calos originados de cotilédone, sendo que a tendência à regeneração diminuiu com o aumento da idade dos explantes (Fig. 11).

O quadro da análise de variância referente aos dados das pesagens dos calos obtidos, mostrou que existe influência dos níveis de BAP e do tipo de explante sobre o peso de matéria fresca de calo (Tabela 4), sendo que o aumento da concentração de BAP no meio favoreceu o maior desenvolvimento dos calos (Fig. 12).

Os calos provenientes de hipocótilo mostraram uma média de peso maior que dos calos originados de explantes de cotilédone, sendo que a diferença entre as médias de ambos ten-

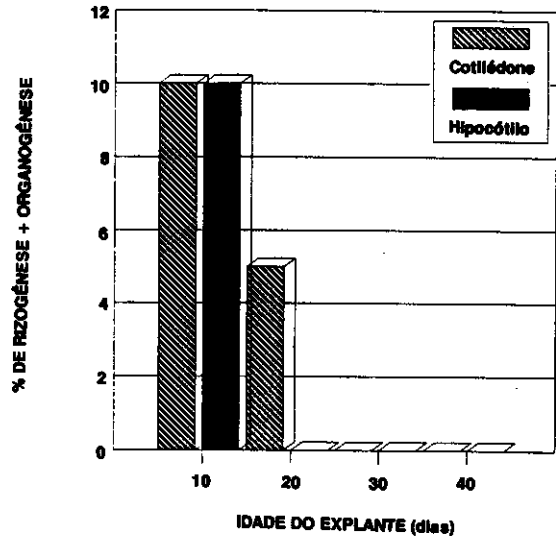


FIG. 10. Formação de raiz e parte aérea, simultaneamente, em calos regenerados a partir de cotilédone e hipocótilo, inoculados em diferentes idades.

de a aumentar conforme se eleva a concentração de BAP (Fig. 12). A ausência de auxina no meio favoreceu o desenvolvimento dos calos provenientes de hipocótilo, o que não ocorreu nos meios contendo auxina, caso em que as médias de peso dos calos provenientes de cotilédone foram sempre maiores (Fig. 1 e 8).

As médias de peso dos calos de hipocótilo,

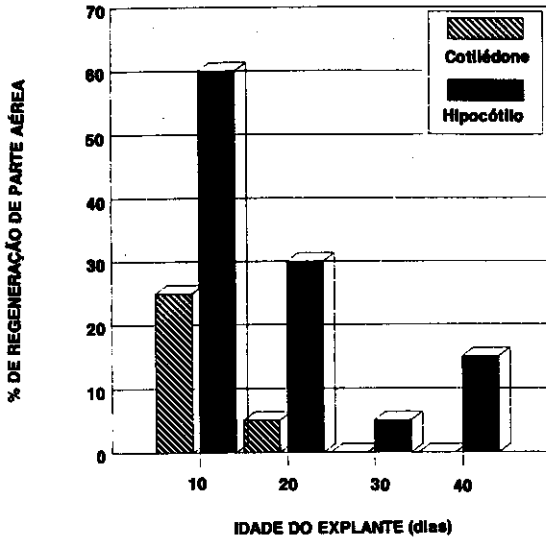


FIG. 11. Calos com regeneração de parte aérea, provenientes de cotilédone e hipocótilo, inoculados em diferentes idades.

TABELA 4. Análise da variância de peso de matéria fresca de calos provenientes de quatro fontes de explante e submetidos a quatro níveis de BAP e ausência de auxina no meio basal MS.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Prob. > F
Meio de cultura	3	776824.203	258941.401	0.00001
Explante	3	318789.132	106263.044	0.00001
Meio x explante	9	61360.949	6817.883	0.04595
Resíduo	432	1527374.964	3535.592	
Total	447	2684349.248		

100 a 200 mg, foram maiores na ausência de auxina no meio e diminuíram para 30 a 150 mg na presença de NAA, ocorrendo o oposto com os calos provenientes de cotilédone, que mostraram pesos de 80 a 220 mg na presença de auxina e de 50 a 100 mg na ausência de NAA.

Não se observou rizogênese nos meios contendo exclusivamente BAP, concordando com as observações de outros autores (Meijer & Broughton 1981, Godwin et al. 1987a, 1987b), e mesmo na ausência de NAA e BAP ocorreu a formação de calo, indicando a existência de teores endógenos de fitorreguladores nos explantes utilizados, o que não se observou no caso de explantes retirados dos genótipos australianos de *S. scabra*, analisados por Godwin et al. (1987b).

O tratamento onde se utilizou hipocótilo como fonte de explante (considerando-se que não houve diferença significativa entre o peso de calos provenientes da região superior e inferior do hipocótilo) e a concentração de 2,0 mg . l⁻¹ BAP mostrou-se superior para a indução e o desenvolvimento dos calos. Já para o caso de *S. humilis*, a concentração ideal

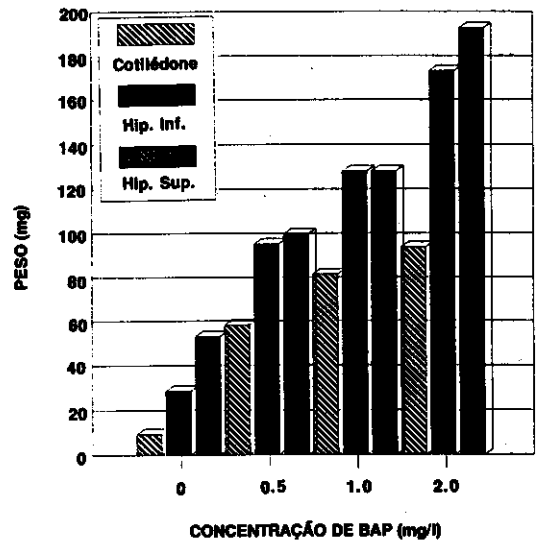


FIG. 12. Peso de matéria fresca de calos provenientes de três fontes de explante, submetidos a níveis crescentes de BAP.

de BAP, na ausência de NAA, para a indução e desenvolvimento de calos derivados de hipocótilo, havia sido descrita como sendo de $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Meijer 1982a).

CONCLUSÕES

1. O peso de calos de *Stylosanthes scabra* é influenciado pela relação NAA/BAP existente no meio de cultura, pela idade e fonte dos explantes utilizados, e pelo tipo de radiação luminosa.

2. A presença de NAA no meio de cultura, favorece o aumento do peso de calos quando se utilizam explantes cotiledonares, e provoca diferenças significativas entre os pesos de calos provenientes de hipocótilo superior e inferior.

3. A ausência de NAA e níveis crescentes de BAP favorecem o peso de calos desenvolvidos a partir de explantes de hipocótilo, e nesta condição, desaparecem as diferenças de peso entre os calos provenientes de hipocótilo superior e inferior.

4. De modo geral, com o aumento da concentração de BAP em meios contendo ou não NAA, há um aumento no peso dos calos.

5. Quando a relação NAA/BAP é alta (maior ou igual a 1,5), ocorre rizogênese, o que dificulta a regeneração de parte aérea (Scowcroft & Adamson 1976, Meijer & Broughton 1981, Mroginski & Kartha 1981, Ferreira 1983, Meijer 1984, Godwin et al. 1987b).

6. A idade do explante influi no peso de calo e na percentagem de calos com regeneração de parte aérea e de raízes, cujas frequências tendem a diminuir com o aumento da idade do explante.

7. 835 lux de radiação luminosa, emitidos por duas lâmpadas Gro-lux, favorecem o peso de calos em relação a quando se utiliza 1.600 lux de radiação, emitidos por uma lâmpada fluorescente branca fria.

8. A melhor condição para a cultura dos calos, observada neste estudo, ocorre quando a fonte de explante utilizada é o cotilédone, com 20 dias de idade, inoculado em meio suplementado com $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de NAA +

$1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP. Entretanto, devido à ocorrência de rizogênese nestas condições, recomenda-se o uso de explantes de hipocótilo (superior ou inferior, indiferentemente), com 10 dias de idade, inoculados em meio basal MS suplementado com $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP. Recomenda-se ainda o uso de 835 lux de radiação luminosa emitida por duas lâmpadas Gro-lux.

AGRADECIMENTOS

A Carlos Alberto de Oliveira, pelo apoio técnico, e ao Dr. José Sebastião Cunha Fernandes, pelo auxílio na elaboração das análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

- BURT, R.L.; MILLER, C.P. *Stylosanthes* - a source of pasture legumes. **Tropical Grasslands Journal**, v.9, p.117-123, set. 1962.
- FERREIRA, M.E. Produção de calo e regeneração de plantas de *Stylosanthes bracteata*. In: REUNIAO DA SOCIEDADE LATINO-AMERICANA DE FISILOGIA VEGETAL, 9., e SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE RELAÇÕES ÁGUA-PLANTA E ENCONTRO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1983, Viçosa, MG. **Anais**. . . Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1983.
- GODWIN, I.D.; GORDON, G.H.; CAMERON, D.F. Callus culture-derived somaclonal variation in the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Plant Breeding**, v.98, p.220-227, 1987a.
- GODWIN, I.D.; GORDON, G.H.; CAMERON, D.F. Plant regeneration from leaf-derived callus cultures or the tropical pasture legume *Stylosanthes scabra* Vog. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.9, p.3-8, set. 1987b.
- MANNERS, J.M. Transformation of *Stylosanthes* spp. using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.6, p.204-207, 1987.
- MANNERS, J.M. Transgenic plants of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Plant Science**, v.55, p.61-68, 1988.

- MANNERS, J.M.; WAY, H. Efficient transformation with regeneration of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis* using *Agrobacterium rhizogenes* and a Ti plasmid-binary vector system. **Plant Cell Reports**, v.8, p.341-345, 1989.
- MEIJER, E.G.M. High-frequency plant regeneration from hypocotyl - and leaf-derived tissue cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Physiologia Plantarum**, v.56, p.381-385, 1982a.
- MEIJER, E.G.M. Shoot formation on tissue cultures of three cultivars of the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis*. Sw. **Zeitschrift fuer Pflanzenzuechtung**, v.89, p.169-172, 1982b.
- MEIJER, E.G.M. Some aspects of long-term tissue culture of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (Leguminosae). **Journal of Plant Physiology**, v.117, p.131-135, 1984.
- MEIJER, E.G.M.; BROUGHTON, W.J. Regeneration of whole plants from hypocotyl - root -, and leaf-derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guianensis*. **Physiologia Plantarum**, v.52, p.280-284, 1981.
- MEIJER, E.G.M.; STEINBISS, H.H. Plantlet Regeneration from suspension and protoplast cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Annals of Botany**, v.52, p.305-310, 1983.
- MROGINSKI, L.A.; KARTHA, K.K. Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. **Plant Science Letters**, v.23, p.245-251, 1981.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- REY, H.Y.; BOWD, O.A.; MROGINSKI, L.A. Cultivo *in vitro* de tejidos de tres especies de *Stylosanthes* (Leguminosae). **Rev. d'Agron.**, v.5, n.9, p.819-823, 1985.
- SCOWCROFT W.R.; ADAMSON, J.A. Organogenesis from callus cultures of the legume *Stylosanthes hamata*. **Plant Science Letters**, v.7, p.39-42, 1976.
- STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Eds.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney: Academic Press, 1984. 636p.
- SZABADOS, L.; ROCA, W.M. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*. A tropical forage legume. **Plant Cell Reports**, v.3, p.174-177, 1986.
- THOMAS, D. Global ventures in *Stylosanthes*. I. South America. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Eds.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney: Academic Press, 1984. p.451-466.