

ISSN 1808-9909
Volume 3, Número 1, 2007

PLANT CELL CULTURE & MICROPROPAGATION



Cultura de Células & Micropropagação de Plantas

**Publicação Científica da Associação Brasileira
de Cultura de Tecidos de Plantas**

Plant Cell Cult. Micropropag., Lavras, MG, v. 3, n. 1, p. 1-54, 2007

INDUÇÃO DE CALOS *IN VITRO* DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum* HUBER EX DUCKE)

IN VITRO INDUCTION OF CALLUS OF *Schizolobium amazonicum* HUBER EX DUCKE

IRACEMA MARIA CASTRO COIMBRA CORDEIRO¹, OSMAR ALVES LAMEIRA²,
SELMA TOYOKO OHASHI³, LANA ROBERTA SOUSA REIS⁴

¹Engenheira Florestal, Doutoranda – Universidade Federal Rural da Amazônia/UFRA – Av. Presidente Tancredo Neves, Nº 2501 – Montese – Cx. P. 917 – 66.077-530 – Belém, PA – mgti@amazon.com.br

²Engenheiro Agrônomo, Doutor – Embrapa Amazônia Oriental – Laboratório de Biotecnologia – Tv. Eneas Pinheiro, sn – Marco – Cx. P. 48 – 66095-100 – Belém, PA – osmar@cpatu.embrapa.br

³Engenheira Florestal, Doutoranda – Universidade Federal Rural da Amazônia/UFRA – Av. Tancredo Neves, 2501 – Terra Firme – Cx. P. 917 – 66077530 – Belém, PA – selma.ohashi@ufr.edu.br

⁴Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UFRA/Embrapa Amazônia Oriental – Tv. Eneas Pinheiro, sn – Cx. P. 48 – 66095-100 – Belém, PA – lana__robert@yahoo.com.br

RESUMO

Conduziram-se ensaios com o objetivo de testar diferentes concentrações de reguladores de crescimento na indução de calos e regeneração de plantas de paricá com intuito de iniciar o processo de embriogênese somática. Segmento nodal de plântulas germinadas *in vitro* foram inoculados em diferentes concentrações de BAP associado a AIB em meio MS, solidificado com 6 g L⁻¹ de agar, 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de PVP. Para o subcultivo dos calos os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial 2 x 2, sendo constituídos pelas combinações das condições presença e ausência de luz, com as concentrações de 67,86 µM 2,4 D + 49,21 µM 2iP e 4,41 µM TDZ. O meio de cultura utilizado foi ½ MS com a concentração de nitrato de amônio reduzida a ¼, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de ácido ascórbico. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados através das variáveis de respostas qualitativas e quantitativas. Aos vinte dias de cultivo, o tratamento mais eficiente para indução de calos foi a combinação de 6,66 µM de BAP e 4,92 µM de AIB, com 90% de calos. A oxidação foi mais acentuada nos tratamentos com maiores concentrações de BAP. Os calos apresentaram textura friável, coloração variando de bege a amarelo. No subcultivo foi obtido 61,53% de formação de parte aérea no meio ½ MS contendo ¼ NH₄NO₃ + 4,41 µM TDZ na presença de luz.

Termos para indexação: Cultura de tecidos, regulador de crescimento, *Schizolobium amazonicum*, paricá.

ABSTRACT

The objective of this work was to test different growth regulators concentrations for callus induction and regeneration of *Schizolobium amazonicum* plants in order to initiate the process of somatic embryogenesis. Nodal segments of *in vitro* germinated plantlets were inoculated in different concentrations of BAP combined with IBA in MS medium, solidified with 6 g L⁻¹ agar, 30 g L⁻¹ sucrose and 1 g L⁻¹ PVP. A 2 x 2 factorial with the presence and absence of light and the concentrations 67.86 µM 2,4-D + 49.21 µM 2iP and 4.41 µM TDZ was used. The used medium culture was MS 50% with the ammonium nitrate concentration reduced to 25% supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and 1 g L⁻¹ ascorbic acid. The effects of the treatments were evaluated through qualitative and quantitative responsive

variables. With twenty days of culture, the most efficient treatment for callus induction (90%) was the combination of 6.66 µM BAP and 4.92 µM IBA. Oxidation was observed in treatments with higher concentrations of BAP. The callus presented friable texture and coloration varying from beige to yellow. Subculture provided the formation of 61.53% shoots in MS 50% containing 25% NH₄NO₃ + 4.41 µM TDZ in the presence of light.

Index terms: Tissue culture, growth regulators, *Schizolobium amazonicum*, paricá.

INTRODUÇÃO

O intenso processo de exploração tem levado à busca de novas fontes de produção de madeira, como o reflorestamento. A espécie florestal *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá) vem sendo utilizada nos programas de reflorestamento, no estado do Pará, pelo rápido crescimento, com idade de rotação prevista para 14 anos de idade. Seleção de material genético de qualidade pode reduzir este tempo de rotação para oito anos ou menos. Para tanto a cultura de tecidos, através da regeneração das plantas *in vitro*, diretamente, a partir do explante ou através do cultivo de calos, pode ser uma alternativa para propagação deste material de qualidade. Pesquisas vêm sendo desenvolvidas para definir metodologia de micropropagação da espécie, com vistas ao melhoramento dos plantios.

Os tipos de cultivo *in vitro* para propagação de espécies lenhosas não diferem muito daqueles utilizados para outra espécie de planta. Entretanto, para estas

(Recebido em 02 de agosto de 2003 e aprovado em 25 de maio de 2007)

espécies, como o paricá, a utilização de protocolos convencionais de micropropagação tem sido dificultada por vários fatores, destacando-se a formação de calos e a constante presença de oxidação.

O calo é um tecido formado pela intensa divisão das células do explante quando este é cultivado em meio com alta concentração de auxina, na presença ou não de citocinina. Em alguns casos, podem-se obter respostas *in vitro*, sem o uso de reguladores de crescimento, no entanto, muitas vezes, o crescimento e a morfogênese são regulados pela interação e balanço entre reguladores de crescimento, adicionados ao meio, e pelos níveis endógenos, produzidos nas células cultivadas *in vitro*.

A concentração ideal dos reguladores de crescimento depende dos padrões de absorção, translocação e metabolismo na planta. O tipo de calo formado, seu grau de diferenciação celular e o potencial morfogenético dependem do explante e dos constituintes do meio de cultura (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Os calos também diferem em textura, friabilidade e coloração. Alguns são compactos e crescem vagarosamente, outros são friáveis e desintegram-se facilmente, quando manipulados (AITCHISON et al., 1977); também a friabilidade é importante para o cultivo de células em suspensão (CID, 1992).

A manipulação de reguladores de crescimento é uma das técnicas mais utilizadas no intuito de maximizar a organogênese *in vitro*, entretanto, não foram encontrados na literatura relatos de trabalhos sobre a indução de calos de paricá. Conduziu-se, este trabalho para testar diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento na indução de calos e regeneração de plantas de paricá, visando iniciar a metodologia para o processo de embriogênese somática.

MATERIAL E MÉTODOS

Indução de calogênese

Foram utilizados como explantes segmentos nodais provenientes de plântulas de paricá, obtidas de germinação *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi MS (MURASHIGE

& SKOOG, 1962) solidificado com agar na concentração de 6 g L⁻¹, contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidone), suplementado com 0,0; 4,44; 6,66; 8,88; 11,1 e 13,32 µM de BAP (6-benzilaminopurina), associado com 4,92 µM de AIB (ácido indol butírico). O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120 °C por 15 minutos. Após este procedimento os explantes foram mantidos, por um período de 20 dias, em sala de incubação, com temperatura de 25° C ± 1° C, na ausência de luz.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, constando de 7 tratamentos com 5 repetições, sendo cada repetição composta por 5 tubos, com um explante cada. Aos vinte dias de cultivo, foi realizada a coleta de dados com a contagem de presença e ausência de calos, oxidação, observação da coloração e textura dos calos. As variáveis, calo e oxidação foram avaliados através do teste qui-quadrado (X²) e expressos em percentagem. Para coloração e textura utilizou-se avaliação visual e para o tamanho dos calos considerou-se como pequenos (P < 0,5 cm.); médios (M = 0,5 cm) e grandes (G > 1,0 cm).

Subcultivo de calos

Os calos formados foram submetidos aos seguintes tratamentos: na ausência e presença de luz, com as concentrações de 67,86µM 2,4 D + 14,76µM 2iP e 4,41µM TDZ. O meio líquido básico utilizado foi o ½ MS modificado com a concentração do nitrato de amônio reduzida a ¼, adicionado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de ácido ascórbico. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. Após a inoculação o material foi mantido em sala de incubação em agitação de 76 rpm (rotação por minuto), com temperatura de 25 ± 2°C.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2. A avaliação foi realizada ao final de 20 dias, onde foram observadas oxidação (OX), presença de pontos esverdeados (PE), Raiz (R) e Parte aérea (Pa). Os resultados foram expressos em percentagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução de Calogênese

Na Tabela 1 estão registrados os resultados do teste qui-quadrado, onde aparecem diferenças significativas entre as concentrações de BAP, combinadas com AIB, ao nível de 5% de probabilidade, permitindo a identificação do tratamento com o maior percentual de formação de calos e oxidação.

A presença de calos foi observada a partir do sexto dia após a inoculação. Aos vinte dias de cultivo, explantes mantidos na presença de BAP e, na combinação deste com AIB, formaram calos. Por outro lado, quando os explantes foram cultivados apenas com a presença de AIB, não houve formação de calos (Tabela 1). Os resultados indicaram a necessidade da citocinina no meio de cultura. Tisseart (1985) observou aumento na formação de calos quando adicionou citocinina ao meio. Isso, provavelmente, deve-se ao fato de que o BAP possibilita a diferenciação e desenvolvimento dos explantes em curto espaço de tempo, dado o alto grau de atividade biológica das células.

Nos tratamentos contendo 6,66 e 11,1 μ M de BAP ocorreu o maior percentual de calos formados nos explantes, respectivamente, 90 e 85,4%. Essas observações estão de acordo com as afirmações de Laszloffy et al. (1992), que relatam a presença de altas concentrações de citocinina no meio de cultura, o que induz à excessiva formação de

calos em explantes de espécies lenhosas. Andrade et al. (2000), utilizando segmentos internodal e cotiledonar de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allem.), verificaram surgimento de calos em praticamente todas as combinações com altas concentrações de ANA, com BAP e Cinetina. Para Litz & Jarret (1991), freqüentemente se induz à formação de calos em explantes cultivados em meio contendo auxina, ou com uma alta relação citocinina/auxina.

Lameira et al. (1997) obtiveram até 100% de formação de calos em segmentos caulinares de erva-baleeira (*Cordia verbenaceae* DC.), quando utilizou em meio de cultura MS, 2,04 e 6,13 μ M de TDZ. E Cerqueira et al. (2002), obtiveram 75% de formação de calos em segmentos foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) quando adicionaram, ao meio de cultura, as mesmas concentrações de ANA e BAP. Do mesmo modo Silva (2000) em seu estudo com *Carapa guianensis* Aubl, obteve 100% de formação de calos quando utilizou a interação de 5,37 μ M de ANA e 4,64 μ M de cinetina.

Geralmente concentrações semelhantes de auxina e citocinina, no meio de cultura, promovem a formação de calos, entretanto, as respostas de combinação ou a interação desses reguladores de crescimento na indução de calos, segundo George & Sherrington (1984) podem variar de acordo com as condições da cultura, tipo de explante e principalmente do genótipo. Santos

TABELA 1 – Percentagem de calos e oxidação em explantes nodais de paricá mantidos, na ausência de luz, em meio MS suplementado com BAP e AIB. Embrapa Amazônia Oriental, Belém/ Pará, 2003.

Meio de Cultura (μ M)	Calos (%)	Intensidade de Oxidação (%)
4,44 BAP + 0,00 AIB	35,2	20,0
0,00 BAP + 4,92 AIB	0,0	23,0
4,44 BAP + 4,92 AIB	75,0	30,0
6,66 BAP + 4,92 AIB	90,0	36,0
8,88 BAP + 4,92 AIB	45,0	47,0
11,1 BAP + 4,92 AIB	85,4	52,0
13,32 BAP + 4,92 AIB	25,0	70,0
X ²	21,43*	52,73*

*Diferenças significativas pelo teste qui-quadrado, ao nível de 5% de probabilidade.

(1998) explica que os reguladores de crescimento agem sobre a expressão gênica, fazendo com que, a partir de células de tecidos organizados, se forme uma massa de células cujo crescimento é, geralmente, rápido e muito irregular.

No que concerne à oxidação, foi observado que, à medida que aumentava a concentração de BAP com a associação de AIB, maior era o percentual de oxidação (Tabela 1). Altas concentrações de citocinina ao meio de cultura podem provocar toxidez nos tecidos, fazendo com que não haja absorção dos nutrientes contidos no meio, o que ficou evidente no tratamento com a concentração de 13,32 μM de BAP, onde o percentual de oxidação foi de 70%. Os menores percentuais de oxidação ocorreram nos tratamentos contendo somente BAP ou AIB, respectivamente, 20 e 23% (Tabela 1). O processo oxidativo também pode estar relacionado à intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura e à concentração de sais minerais no meio de cultura (MONACELLI et al., 1999).

Na Tabela 2, estão as respostas de variáveis qualitativas obtidas em calos de segmento nodal de paricá. De modo geral os explantes foram envolvidos por uma massa globular, de coloração predominantemente bege na presença das menores concentrações de BAP, de bege amarelado na presença de 8,88 e 11,1 μM de BAP

e chegando até amarelo, na presença da maior concentração de BAP. O tamanho dos calos variou entre grande, médio e pequeno durante todo período de cultivo, os maiores tamanhos coincidem com as concentrações mais altas de BAP associado á auxina e os menores na concentração mais baixa, associada ou não à auxina. Resultados semelhantes foram obtidos por Landa et al. (2000), em experimento com *Caryocar brasiliensis* Camb. (pequizeiro), com segmentos foliares de plantas jovens, e foi observado que o uso apenas de BAP proporcionou pequena formação de calos, porém, a interação entre os reguladores de crescimento BAP e ANA os calos apresentaram-se bem maiores. A textura foi constantemente friável, porém, o aspecto visual foi melhor, em concentrações mais baixas dos reguladores de crescimento.

Diversos fatores podem influenciar na coloração e consistência dos calos, entre eles concentração e tipo do regulador de crescimento, usado no meio de cultura. Geralmente, calos friáveis são correlacionados com um menor estágio de diferenciação do que os calos compactos. Conceição (2000) relata que, calos friáveis são induzidos a partir de calos compactos, obtidos inicialmente em meio sólido. Por outro lado Cid (1992) afirma que calos com essa característica geralmente são aclorofilados, com coloração amarela ou bege.

TABELA 2 – Respostas de variáveis qualitativas, em calos de segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke, mantidos na ausência de luz, em meio MS, suplementado com BAP e AIB. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-Pará, 2003.

Reguladores de crescimento (μM)	Variáveis de Respostas		
	CC	TC	T
4,44 BAP + 0,00 AIB	B	F	P
0,00 BAP + 4,92 AIB	-	-	-
4,44 BAP + 4,92 AIB	B	F	P
6,66 BAP + 4,92 AIB	B	F	M
8,88 BAP + 4,92 AIB	BA	F	G
11,1 BAP + 4,92 AIB	BA	F	G
13,32 BAP + 4,92 AIB	A	F	G

LEGENDA: Cor do calo (CC): (A= amarelo, B=bege e BA= bege amarelado); Textura do calo (TC): (F = friável e C= compacto); e Tamanho do calo (T): (P < 0,5 cm, M = 0,5 cm e G > 1,0 cm): (-) sem formação de calo.

Subcultivo de calos

De modo geral, todos os calos, quando transferidos para o meio líquido, apresentaram formação de pontos esverdeados, ocorrendo o maior percentual (69,23%) no tratamento contendo o meio ½ MS, com ¼ NH₄NO₃ + 4,41µM de TDZ, na presença de luz. A formação de parte aérea somente ocorreu nos tratamentos que continham o TDZ (Tabela 3). Respostas similares foram observadas por Camargo (1997), com *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (castanha-do-Brasil), e por Landa et al. (2000) em explantes foliares de *Caryocar brasiliensis* Camb. (pequizeiro). Não foi observada a formação de raízes e os calos ficaram com aspecto oxidado e/ou necrosado, não havendo regeneração.

Segundo relatos de George & Sherrington (1984) e Lameira et al. (1997), os calos quando são cultivados por várias semanas apresentam a desaceleração do crescimento, necrose, escurecimento e finalmente secamento. Estes fatos, provavelmente são resultados da carência ou exaustão de nutrientes no meio; inibição da absorção dos nutrientes; evaporação, acompanhada pelo aumento na concentração de algum nutriente; toxidez pela acumulação de metabólitos; e desequilíbrio no balanço dos reguladores de crescimento. Entretanto, essas respostas variam em função do balanço hormonal de cada espécie.

Durante o primeiro cultivo, os calos eram bege, bege amarelado e amarelo e todos friáveis; quando

transferidos para o subcultivo os calos, gradualmente, tornaram-se marrom. Após esse período, os calos ficaram mais escuros e perderam a capacidade de regeneração. Esses resultados diferem dos encontrados por Monacelli et al. (1999) em segmentos caulinares de *Vismia guianensis* Seem. em meio MS, suplementado com 2,4 D e KIN, onde os calos inicialmente eram escuros, duros com crescimento lento, mas após cinco a seis subcultivos, tornaram-se mais claros, friáveis e com crescimento rápido.

Vários trabalhos (GEOGE & SHERRINGTON, 1984; JOSEPH et al., 1996; MONACELLI et al., 1999; SANTOS, 1998) têm demonstrado que, certos grupos de plantas respondem mais facilmente em culturas *in vitro*, que outros. Estas diferenças mostram que as condições ideais à calogênese dependem de vários fatores, tais como: tamanho do explante; composição do meio de cultura; reguladores de crescimento; órgão fornecedor do explante; idade e época do ano em que o explante é colhido; e genótipo da planta doadora. Assim sendo, a manutenção dos calos pode apresentar alta frequência de variação, dependendo da espécie vegetal e do refinamento metodológico utilizado. Provavelmente, isso tenha ocorrido por efeito fitotóxico da elevada concentração dos reguladores de crescimento utilizados no meio, o que comprova a necessidade de realização de novos trabalhos.

TABELA 3 – Respostas morfogênicas (%), observadas aos 20 dias de cultivo, em calos de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke, submetidos a tratamentos para as condições presença e ausência de luz. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-Pará, 2003.

Meio de cultura – ½ MS (¼NH ₄ NO ₃) (µM)	Condições de luz	Respostas morfogênicas (%)			
		Pe	Pa	R	Ox
67,86 2,4 D+ 14,76 2iP	Ausência	40,00	0	0	100
67,86 2,4 D + 14,76 2iP	Presença	7,14	0	0	100
4,41 TDZ	Ausência	45,45	36,36	0	100
4,41 TDZ	Presença	69,23	61,53	0	100

Pe = Pontos Esverdeados; Pa = Parte aérea; R = Raiz e Ox = Oxidação.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que, em segmento caulinar de paricá do tipo nodal, houve a formação de calos na maioria dos tratamentos testados, sendo que o maior percentual ocorreu no meio MS, contendo 6,66 µM de BAP + 4,92 µM de AIB. E ocorreu maior percentual de oxidação nos tratamentos que continham as maiores concentrações da citocinina.

Os calos apresentaram tamanhos variados, friáveis e coloração, variando do bege ao amarelo, no primeiro cultivo e marrom no subcultivo. O maior percentual na formação da parte aérea ocorreu no subcultivo no meio ½ MS, contendo ¼ NH₄NO₃ + 4,41 µM de TDZ, na presença de luz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITCHISON, P. A.; MACLEOD, A. J.; YEOMAN, A. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. California: University of Califórnia, 1977. cap. 10, p. 267-306.
- ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 174-180, jan./jun. 2000.
- CAMARGO, I. P. de. **Estudos sobre a propagação da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.)**. 1997. 127 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R. de; CASTRO, N. E. A. de; CARDOSO, M. das G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax Procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, mar./abr. 2002.
- CID, L. P. B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, São Paulo, n. 18, p. 2-7, 1992.
- CONCEIÇÃO, H. E. O. da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de retenóides em timbó (*Derris* sp)**. 2000. 191 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue cultura**. Eversley: Exegetics, 1984.
- JOSEPH, B.; JOSEPH, D.; PHILIP, V. J. Plant regeneration from somatic embryos in black pepper. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, p. 87-90, 1996.
- LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. das G.; GAVILANES, M. L. Efeito de thiadizuron na indução e manutenção de calos de erva baleeira (*Cordia verbenácea* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 47-49, 1997.
- LANDA, F. de S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O.; BARROS FILHO, J. S. de S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, dez. 2000. Edição especial.
- LASZLOFFY, K.; KADER, A. M. A.; MATHE, A. In vitro propagation of 'Julyred' apple. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 300, p. 149-154, 1992.
- LITZ, R. E.; JARRET, R. L. Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos, embriogênese somática y organogênese. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 143-172.
- MONACELLI, B.; PASQUA, G.; CUTERI, A.; VITALI, A. In vitro plant regeneration of *Vismia guianensis* through organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, n. 2, p. 75-81, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, Washington, v. 15, p. 473-497, 1962.
- SANTOS, M. R. A. dos. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga grisebach***. 1998. 81 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- SILVA, A. T. de A. **Propagação e indução de calos in vitro de andirobeira (*Carapa guianensis*, Aubl)**. 2000. 49 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém, 2000.
- TISSEART, B. Embryogenesis, organogenesis in plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxiford: IRL, 1985. p. 79-105.