



Calogênese *in vitro* de segmentos apicais caulinares e internodais em segurelha (*Satureja hortensis* L.)¹

Callus formation in vitro and internodal stem apices in savory

Marcio Carlos Navroski^{2*}, Daniel Arthur Gaklik Waldow³, Mariane de Oliveira Pereira⁴,
Alessandra de Oliveira Pereira⁵

Resumo - Buscou-se com este trabalho avaliar diferentes reguladores de crescimento sobre a calogênese em segmentos caulinares apicais e internodais de *Satureja hortensis* L.. Os explantes foram isolados de plântulas germinadas *in vitro* e cultivados em meio nutritivo MS acrescido de ANA (0 e 1 μ M) e de BAP (0; 5; 10; 15 e 20 μ M). A presença da auxina ANA proporcionou notas mais altas para os calos aos 30 dias de avaliação, estas notas também aumentaram com o acréscimo da citocinina BAP. Houve interações significativas entre os fatores ANA e BAP na avaliação aos 60 dias, nos dois tipos de segmentos caulinares (apicais e internodais). Nos segmentos apicais caulinares a porcentagem de calos friáveis tendeu a diminuir com o aumento da concentração de BAP. Já nos calos compactos o aumento de BAP ocasionou um aumento da porcentagem deste tipo de calo. A presença de ANA elevou a formação tanto em calos friáveis como em calos compactos. Esta tendência também foi observada em segmentos caulinares internodais. A formação de calos rizogênicos foi altamente observada na presença de ANA, quase não ocorrendo na ausência desta auxina. A utilização de BAP é recomendada em caso de regeneração de plantas por micropropagação, no entanto, se o objetivo for à produção de metabólitos, a utilização de BAP pode ser prejudicial por diminuir a produção de calos friáveis.

Palavras-chave - Cultura de tecidos. Metabólitos secundários. Reguladores de crescimento.

Abstract - We sought to evaluate with this work different growth regulators on callus formation in shoot apical and internodal stem segments of *Satureja hortensis*. The explants were isolated from *in vitro* seedlings and cultured on MS nutrient medium supplemented with NAA (0 and 1 μ M) and BAP (0, 5, 10, 15 and 20 μ M). The presence of auxin NAA gave higher marks to the calluses at 30 days of evaluation, these notes also increased with the addition of BAP. There were significant interactions between factors in evaluating NAA and BAP for 60 days, both in apical stem segments as in internodal stem segments. To stem apices percentage of friable callus tends to decrease with increasing concentration of BAP. As for compact calluses increased BAP leads to an increase in the percentage of this type of callus. The presence of NAA increased callus formation in both friable and compact calluses on. This trend was also observed in internodal stem segments. The callus formation was highly rhizogenic observed in the presence of NAA, hardly occurs in the absence of auxin. The use of BAP is recommended in case of regeneration of plants through micropropagation, if the goal is the production of metabolites, the use of BAP can be harmful by reducing the production of friable callus.

Key words - Tissue culture. Secondary metabolites. Growth regulators.

*Autor para correspondência

¹Enviado para publicação em 19/03/2012 e aprovado em 10/09/2012

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da UFSM. Professor Assistente do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV-UDESC - Lages-SC, navroski@cav.udesc.br

³Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, daniwaldow@hotmail.com

⁴Engenheira Florestal, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, maripereira.florestal@gmail.com

⁵Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria, RS, alessandrale@hotmail.com

Introdução

Satureja hortensis L. (Lamiaceae) conhecida como segurelha, é originária do Mediterrâneo Oriental e cultivada em diversas partes do mundo (SEFIDKON *et al.*, 2006). É largamente utilizada como tempero, mas de suas folhas e hastes também são extraídos óleos, resinas, tinturas e extratos para a indústria de perfumaria (MIHAJLOV-KRSTEV *et al.*, 2009). Folhas, flores e caule de *Satureja hortensis* são, adicionalmente, usados com frequência no preparo de chás ou como aditivo em misturas de especiarias comerciais para alimentos, muitas vezes para oferecer aroma e sabor. Também tem sido usada como planta medicinal para tratar várias doenças, tais como câibras, dores musculares, náuseas, indigestão, diarreia e doenças infecciosas. Apresenta propriedades anti-espasmódicas, anti-diarreicas, sedativas, antioxidantes e antimicrobianas (HAJHASHEMI *et al.*, 2000).

Informações sobre o efeito das condições ambientais no metabolismo secundário de plantas provêm, principalmente, de esforços da pesquisa para maximizar a produção de constituintes ativos de espécies medicinais e aromáticas. Como aplicação prática, avanços no sentido de compreender a influência dos fatores ambientais na regulação de biossíntese de metabólitos secundários, podem contribuir para um aumento na produção de compostos de interesse nestas espécies (MORAIS, 2009).

A produção desses compostos é geralmente baixa (menos de 1% da biomassa seca), sendo resultado dos processos de biossíntese, transporte, degradação e armazenamento, os quais são afetados pelo genótipo, estágio ontogenético e por fatores ambientais. A maioria dos compostos é armazenada nos vacúolos de células que fazem parte de tecidos específicos da planta (FLORES, 2006).

Os metabólitos secundários são essencialmente produzidos e extraídos a partir de plantas cultivadas no campo sobre a influência de variações sazonais. A utilização de técnicas biotecnológicas apresenta-se como um recurso alternativo para a produção de fármacos. Dentre essas técnicas, destaca-se a cultura de tecidos por meio da técnica da calogênese, uma vez que o crescimento de calos é desejável para induzir variação somaclonal e estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de metabólitos secundários com o crescimento celular (RODRIGUES; ALMEIDA, 2010).

Alguns calos são compactos e crescem vagarosamente, outros são friáveis e desintegram-se facilmente quando manipulados. A friabilidade é importante para cultivos de células em suspensão, pois as células se dividem facilmente no meio de cultura. Recentemente, o cultivo de calos tem sido uma alternativa

viável para o estudo e a produção de metabólitos secundários. Calos com diferentes taxas de crescimento e níveis de diferenciação (friáveis, compactos) podem diferir na capacidade de sintetizar compostos bioativos. Investigações fitoquímicas dos diferentes cultivos são necessárias para verificar a produção e o teor de metabólitos de interesse e servirem de subsídios para estudos posteriores (FLORES, 2006).

Considerando-se que *Satureja hortensis* tem grande importância na utilização como condimento, cosmética e principalmente medicinal é importante o desenvolvimento de um protocolo para calogênese desta espécie, sendo que está técnica de cultura de tecidos pode aumentar a quantidade de metabólitos secundários, compostos de extrema utilidade na fabricação de fitoterápicos.

Desta forma objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito de 6-Benzilaminopurina (BAP), na presença e na ausência de Ácido Alfa-naftaleno acético (ANA), sobre a calogênese em segmentos caulinares apicais e internodais de *Satureja hortensis*.

Material e métodos

Os explantes utilizados foram provenientes da germinação *in vitro* de sementes de *Satureja hortensis* em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar. Previamente, as sementes foram desinfestadas superficialmente pela imersão, por 30 segundos em etanol a 70% (v/v), em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) por 15 minutos, e, por fim, foram submetidas a um triplo enxágue com água destilada e autoclavada.

Das plântulas obtidas foram isolados os explantes, segmentos apicais caulinares e segmentos caulinares internodais (epicótilo), com aproximadamente 1 cm de comprimento, sendo inoculados em meio nutritivo MS, acrescido de sacarose, mio-inositol e ágar nas mesmas concentrações usadas para a germinação *in vitro*.

Na germinação e na propagação *in vitro*, o pH foi ajustado para 5,8 imediatamente antes da autoclavagem, efetuada por 20 minutos a 120°C e a 1 atm. Os frascos com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo foram mantidos em sala de crescimento a uma temperatura de 25°C ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 20 μmol⁻²m⁻²s⁻¹ obtida por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, correspondendo às concentrações de ANA (0 e 1 μM) e de

BAP(0; 5; 10; 15 e 20 μM), totalizando 10 tratamentos, com seis repetições, cada uma composta por três explantes.

Aos 30 dias após o início do cultivo *in vitro* foi realizada uma avaliação por meio de notas para os calos, sendo: **0** = explante oxidado e/ou contaminado; **1** = explante sem alteração morfológica; **2** = explante com bordas onduladas; **3** = explante com formação de pequenos calos e **4** = explante com calos totalmente formados.

Aos 60 dias de cultivo *in vitro* foi efetuada a avaliação dos segmentos apicais caulinares, classificaram-se os calos, quanto à sua textura, em calos friáveis (desmancham-se ao toque do bisturi) e compactos (resistência à introdução do bisturi). Não foi realizada avaliação em calos rizogênicos visto que não ocorreu a formação das raízes a partir da formação dos calos. Nos segmentos caulinares internodais foi realizada avaliação de calos friáveis, calos compactos e calos rizogênicos.

Após avaliar a normalidade dos erros pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett, os dados foram transformados pela função $\sqrt{x + 0,5}$ e submetidos, após, à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, médias de tratamentos qualitativos foram submetidos à comparação de médias por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. O programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) foi utilizado para a análise estatística dos dados.

A precisão dos experimentos foi medida através da acurácia seletiva (AS) calculada por $\sqrt{1 - 1/Fcal}$ que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos. A estatística AS não depende apenas da magnitude do erro experimental e do número de repetições, mas também da proporção entre as variações de natureza genética e residual associadas ao caráter em avaliação (STORCK *et al.*, 2010). Quanto maior a acurácia, maior a confiança na avaliação.

Resultados e discussão

De acordo com a análise de variância a avaliação de calos por notas, 30 dias após a inoculação, mostrou que não houve interação entre os fatores principais, mas houve efeito significativo para os fatores isolados ($P < 0,05$). A avaliação aos 60 dias mostrou interação entre os fatores ANA e BAP ($P < 0,05$) para todas as variáveis analisadas, exceto em calos rizogênicos, no qual houve efeito significativo somente para o fator ANA

($P = 0,006$). A acurácia seletiva foi moderada (0,66) para calos rizogênicos e alta a muito alta (0,75 – 0,96) para as demais variáveis, segundo a classificação de Resende e Duarte (2007).

Quanto às notas para a formação calogênica em segmentos caulinares internodais a presença de ANA promoveu notas mais altas, atingindo em média a nota 2, caracterizando formação de calos em maior escala que na ausência de ANA, no qual a média foi inferior a 1 (Tabela 1).

Tabela 1- Médias das notas de calos em segmentos caulinares internodais de segurelha, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS, em função da ausência ou presença de ANA (1 μM)

ANA	Médias das notas de calos
Presença (1 μM)	2,033 a*
Ausência (0 μM)	0,966 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se à resposta desejada no cultivo *in vitro*.

Este acréscimo na formação de calos, visualizado por meio de notas, com a presença de ANA, pode ser explicado pela tendência das auxinas em algumas combinações com citocininas formarem calos. As diferentes respostas exercidas pelas auxinas se devem a diferenças no metabolismo e estabilidade das mesmas, sugerindo a possibilidade de outros tipos de auxinas poderem promover resultados similares àquelas rotineiramente utilizadas (COSTA *et al.*, 2008).

Na indução de calogênese o uso de auxinas é frequente. As auxinas atuam na inicialização da divisão celular e controlam os processos de crescimento e alongação celular. Algumas delas atuam também no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros que decodificam proteínas para o crescimento, podendo induzir uma desordenada proliferação celular, provocando o aparecimento de calos (GEORGE, 1996).

Em relação ao fator BAP a concentrações de 19,45 μM foi responsável pela maior média das notas de calos (2,05). Com o uso de concentrações menores de BAP, houve diminuição nas notas de calos dos segmentos caulinares internodais de segurelha (Figura 1).

A formação calogênica em segmentos apicais caulinares e segmentos caulinares internodais foi avaliada aos 60 dias e classificada segundo o aspecto dos calos, separando-se em: calos friáveis (Figura 2A), calos compactos (Figura 2B) e calos rizogênicos (Figura 2C).

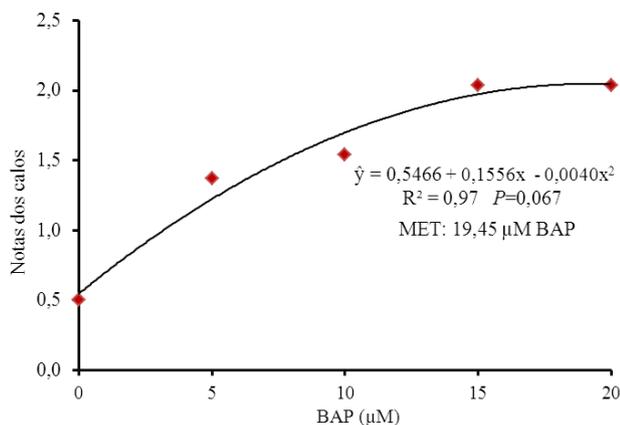


Figura 1 - Notas de calos em segmentos caulinares internodais de segurelha, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de BAP.

Analisando-se a formação de calos em segmentos apicais caulinares ajustou-se modelo quadrático para calos compactos, tanto na ausência quanto na presença de ANA, e para calos friáveis na ausência de ANA (Figura 3). Já na presença de ANA o número de calos friáveis ajustou-se a um modelo linear decrescente, havendo maior formação de calos com o uso de menores concentrações de BAP, tendendo diminuir a formação destes com o aumento dessa concentração. Calos compactos ocorreram em concentrações mais elevadas de BAP, além de incidirem mais na presença de ANA, alcançando quase 80% de formação com 20 uM de BAP.

Analisando-se a formação de calos em segmentos caulinares internodais a maior incidência de calos friáveis foi alcançada na presença de ANA sem adição de BAP (90%), onde o modelo se ajustou a uma função quadrática (Figura 4). Com a adição de BAP ocorreu diminuição na formação deste tipo de calo reduzindo para

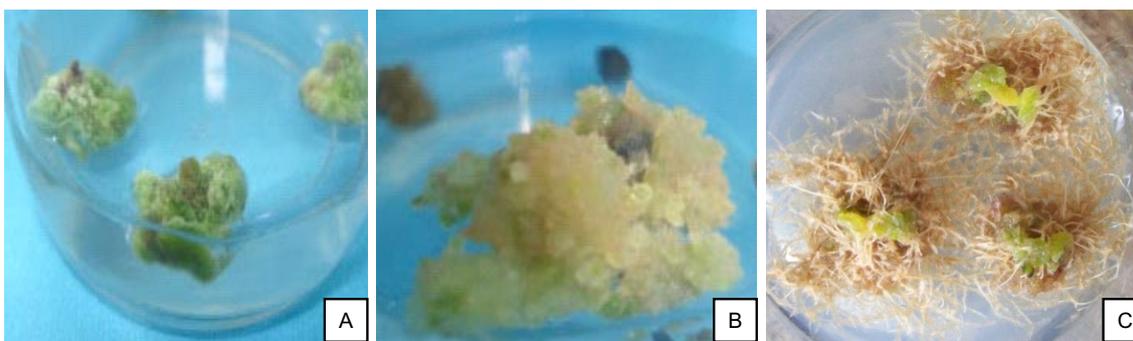


Figura 2 - Aspecto da formação de calos compactos (A), calos friáveis (B) e calos rizogênicos (C) em segmentos apicais caulinares e segmentos caulinares internodais de segurelha aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de BAP, considerando-se a ausência ou presença de ANA (1uM). Fonte: Marcio Carlos Navroski.

aproximadamente 30% de calos na maior concentração de BAP testada. Na ausência de ANA e de BAP não ocorreu a formação de calos friáveis, entretanto o surgimento de calos tende a elevar-se com o aumento das concentrações de BAP, principalmente na concentração de 20 uM, tendo o modelo se ajustado a uma função quadrática positiva (Figura 4).

A maior formação de calos friáveis somente com o uso de auxina mostra que o balanço hormonal entre a auxina adicionada somada às citocininas endógenas é suficiente para uma alta formação deste tipo de calo em segurelha. Ozias-Akin e Vasil (1985) mencionam que citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitas vezes há o desenvolvimento de calos *in vitro* apenas com suprimento de auxinas.

O uso de auxinas é recomendado em vários estudos para a produção de calos friáveis. Silva *et al.* (2003) estudando o efeito de reguladores de crescimento em carqueja detectaram maior indução e crescimento de calos friáveis na presença de ANA. Pereira *et al.* (2007) também observaram a necessidade do uso de auxina para a indução de calos friáveis em explantes foliares de *Uncaria guianensis* J. F. Gmel. Da mesma forma Gopi e Ponmurugan (2006) encontraram maior proporção de calos friáveis com a utilização de auxina em explantes foliares de *Ocimum basilicum* L.

A combinação entre ANA e BAP promoveu a maior formação de calos compactos, aumentando à medida que crescem as concentrações de BAP utilizadas. A ausência de ANA proporcionou menor formação deste tipo de calo em

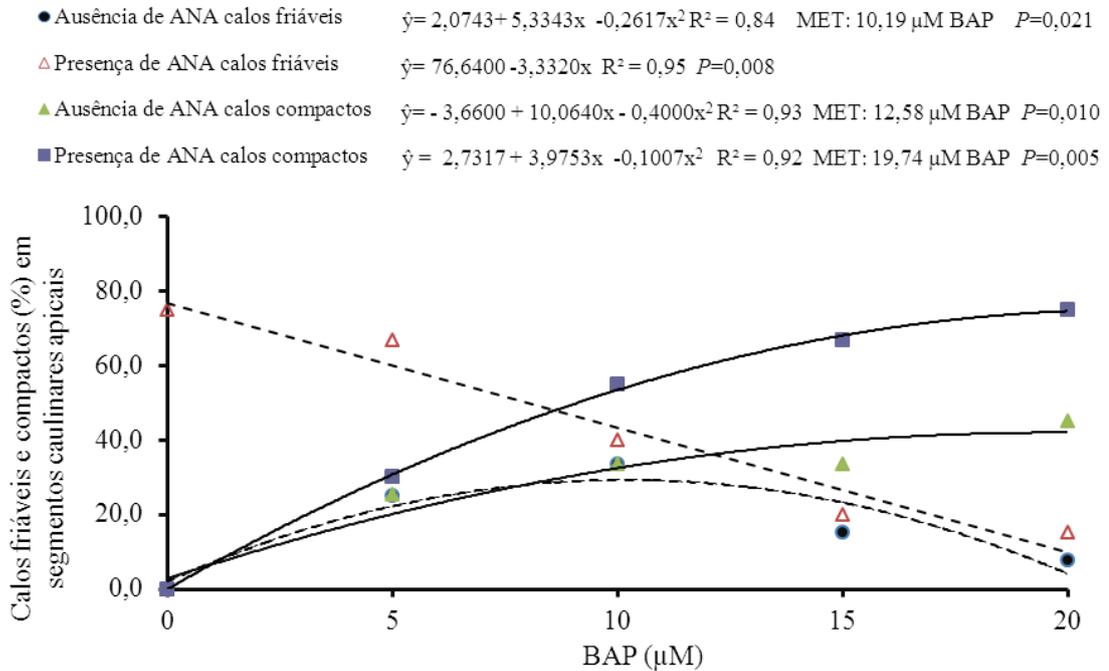


Figura 3 - Porcentagem de explantes que apresentaram formação de calos friáveis (linhas tracejadas) e calos compactos (linhas contínuas) em segmentos apicais caulinares de segurelha, em função de diferentes concentrações de BAP, na ausência e presença de ANA (1 μM), aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

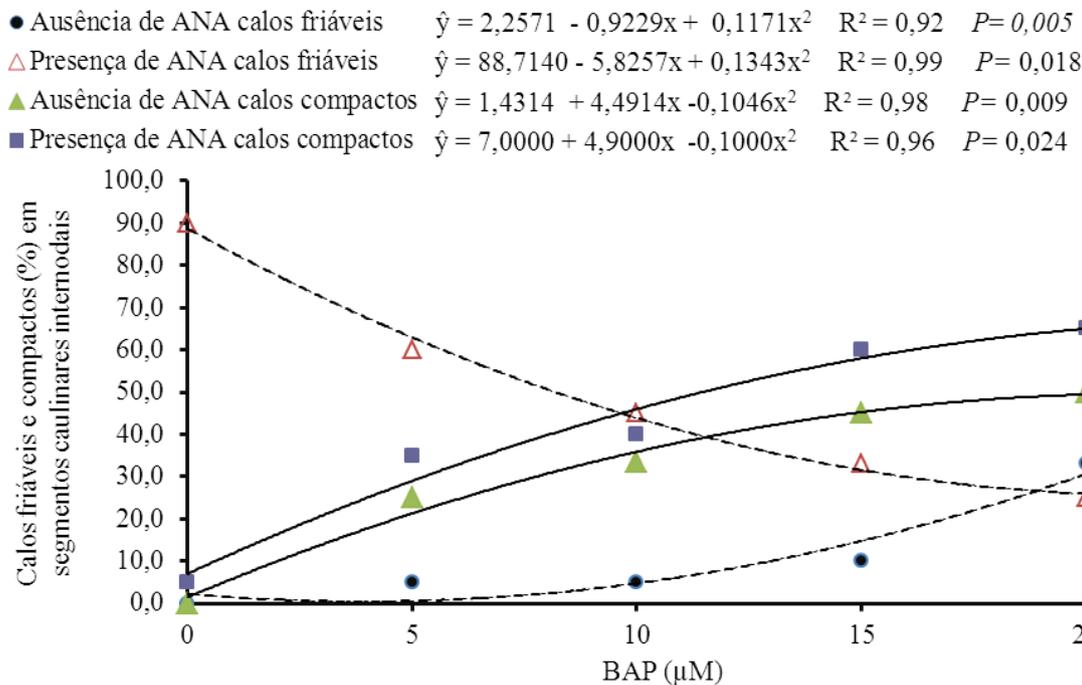


Figura 4 - Porcentagem de explantes que apresentaram formação de calos friáveis (linhas tracejadas) e calos compactos (linhas contínuas) em segmentos caulinares internodais de segurelha, em função de diferentes concentrações de BAP, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, considerando-se a ausência ou presença de ANA (1 μM).

todas as concentrações de BAP. O aumento da concentração de BAP influencia positivamente a formação de calos, alcançando as maiores taxas na concentração 20 μM .

A interação entre ANA e BAP formando calos compactos pode ser explicada pelas elevadas concentrações de citocinina que interagem com a quantidade de auxina exógena e endógena presente no explante (SANTOS, 1998), fato verificado a partir dos resultados obtidos nesse estudo. A textura e morfologia do calo, manipulada pelas variações nos constituintes do meio nutritivo produz calos friáveis em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina e se a relação é inversa, ocorre a produção calos de tecido compacto e com células pequenas (GAMBORG, 1982; GEORGE, 1996).

Resultados semelhantes quanto à formação de calos friáveis foram obtidos em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) no qual foi encontrada maior proliferação destes calos com a associação da citocinina BAP (1 μM) e a auxina 2,4-D (10 μM) em segmentos nodais e raízes (FLORES *et al.*, 2006). Semelhança nos resultados também foi encontrada em *Pfaffia glomerata* (Spreng.), sendo que os calos friáveis formaram-se a partir de segmentos nodais em meio com concentrações reduzidas de BAP e presença da auxina 2,4-D (FLORES, 2006).

O efeito de concentrações de reguladores de crescimento na consistência de calos também foi estudado em plantas ornamentais da espécie *Alocasia micholitziana* Sander (Araceae), no qual concentrações reduzidas de BAP e 2,4-D formaram calos friáveis, enquanto concentrações mais elevadas induziram calos compactos (THAO *et al.*, 2003).

Os calos friáveis têm a característica de desintegrarem-se facilmente quando manipulados. Essa friabilidade é importante para cultivos de células em suspensão, método mais utilizado para o estudo da produção de metabólitos, pois as células se dividem rapidamente e se dispersam facilmente no meio de cultura (BARRUETO CID, 1992). Desta forma faz-se necessária à determinação prévia de protocolos eficientes para a indução e manutenção de calos friáveis.

Já os calos mais propícios à regeneração são aqueles que se apresentam com constituição firme, e esta depende, principalmente, da atividade citocinínica ou da combinação com auxina em suas células (TERMIGNONI, 2005), característica comprovada pelos resultados obtidos neste trabalho. Além do tipo e concentração de auxina, a consistência dos calos também é influenciada por outros fatores, como a concentração de citocinina, tipo de explante e pelo genótipo (REMOTTI; LOFFLER, 1995). Todos estes fatores devem ser levados em consideração durante a otimização de protocolos que tenham como propósito a produção de calos.

A presença de ANA no meio nutritivo foi responsável por grande formação de calos rizogênicos (Tabela 2). Já na ausência de ANA a formação de calos rizogênicos praticamente não ocorreu.

Tabela 2 - Médias da formação de calos rizogênicos em segmentos caulinares internodais de segrelha, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS, em função da ausência ou presença de ANA (1 μM)

ANA	Formação de calos rizogênicos
Presença (1 μM)	66,0 a*
Ausência (0 μM)	2,5 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se à resposta desejada no cultivo *in vitro*.

Os resultados encontrados na formação de calos rizogênicos reforçam a teoria referente ao balanço entre reguladores de crescimento, em que se espera que concentrações elevadas de auxinas induzam à rizogênese (HINOJOSA, 2000), além de servir como parâmetro para avaliar a capacidade de resposta morfogênica dos explantes. A formação de raízes adventícias é um processo complexo, pois envolve múltiplos fatores endógenos da planta, reguladores de crescimento e fatores ambientais como, por exemplo, a luminosidade (SORIN *et al.*, 2005).

Através da análise dos resultados obtidos e dependendo do objetivo, pode-se afirmar que para a produção de metabólitos secundários a utilização da citocinina BAP não é recomendada por diminuir a formação dos calos friáveis. Já se o objetivo for a regeneração de plantas por meio de calos compactos a utilização de BAP é recomendada.

Conclusões

A maior ocorrência de calos friáveis é obtida na presença de ANA e com a utilização de menores concentrações de BAP.

Os calos compactos tendem a aumentar com a utilização de maiores concentrações de BAP, independente da presença de ANA. Esta auxina é responsável pela formação de calos rizogênicos, praticamente não ocorrendo na ausência desta.

De uma forma geral, a formação de calos é superior em segmentos caulinares internodais quando comparada a segmentos apicais caulinares.

Literatura científica citada

- BARRUETO CID, L. P. B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, n. 18, p.02-07. 1992.
- COSTA, F. H. S.; LOUREIRO, T. S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 02, p. 269-274, 2008.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)** (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria. 168p. 2006.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfológicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.
- GAMBORG, O. L. Callus and cell culture. In: WETTER, L.R.; CONSTABEL, F. **Culture methods**. Ottawa, Saskatoon, p. 1-9. 1982.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. Reino Unido: Exegetics Limited, Parte 2, 1361p. 1996.
- GOPI, C.; PONMURUMGAN, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 206-264, 2006.
- HAJHASHEMI, V.; SADRAEI, H.; GHANNADI, A. R.; MOHSENI, M. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 71, p. 187-192. 2000.
- HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen. p. 15 - 53. 2000.
- MIHAJLOV-KRSTEV, T.; RADNOVIĆ, D.; KITIĆ, D., ZLATKOVIĆ, B.; S. BRANKOVIĆ. Composition and antibacterial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. **Central European Journal of Biology**. v. 4, n. 3, p. 411-416. 2009.
- MORAIS L, A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4050-4063. 2009.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497. 1962.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Florida: Academic, v. 2, p. 128-147. 1985.
- PEREIRA, R. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; BERTOLLUCI, S. K. V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (UNHA DE GATO). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 69-77, 2007.
- REMOTTI, P. C.; LÖFFLER, H. J. M. Callus induction and plant regeneration from gladiolos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.171-178. 1995.
- RESENDE, M. D. V. de; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, p.182-194. 2007.
- RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n 3, p.333-340. 2010.
- SANTOS, M. R. A. **Germinação, calogênese e caracterização e saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach**. 1998. 81f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- SEFIDKON, F.; ABBASI, K.; BAKHSHI KHANIKI, G. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. **Food Chemistry**, v. 99: p. 19-23. 2006.
- SILVA, F. G.; PINTO, J. E. P. B.; SALES, J. F.; DIVINO, S. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.3, p.541-547. 2003.
- SORIN, C.; BUSSELL, J. D.; CAMUS, I.; LJUNG, L.; KOWALCZYK, M.; GEISS, G.; MCKHANN, H.; GARCION, C.; VAUCHERET, H.; SANDBERG, G.; BELLINI, C. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require argonaute1w. **The Plant Cell**, v. 17, n. 5, p. 1343 – 1359. 2005.
- STORCK, L.; CARGNELUTTI FILHO, A.; LÚCIO, A. D.; MISSIO, E. L.; RUBIN, S. A. L. Avaliação da precisão experimental em ensaios de competição de cultivares de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 572-578. 2010.
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005. 182 p. 2005.
- THAO, N. T. P.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 285-289. 2003.