

Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaya vermelha

Camila Aparecida Lopes¹, Gabrielen de Maria Gomes Dias¹, Leila Aparecida Salles Pio¹, Flávia Aparecida da Silveira¹, Filipe Almendagna Rodrigues¹, Moacir Pasqual¹

¹ Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, Campus UFLA, CEP 37200-000, Lavras-MG, Brasil. Caixa Postal 3037. E-mail: camilalopes_sjc@hotmail.com; gabriellen@gmail.com; leilapio.ufla@gmail.com; flaviasilveirax@yahoo.com.br; filipealmendagna@yahoo.com.br; mpasqual@dag.ufla.br

RESUMO

A pitaya vermelha de polpa branca (*Hilocereus undatus*) é uma cactácea, pertencente ao grupo das frutíferas tropicais, considerada promissora para o cultivo. Objetivou-se induzir calos e determinar o potencial embriogênico e a estabilidade genética em pitaya. O trabalho foi dividido em 2 etapas: 1^a) Indução de calos com a utilização de doses de 2,4-D (2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e com doses de glutamina (100 e 200 mg L⁻¹); 2^a) Curva de crescimento de calos, por vários períodos de tempo (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105 e 112 dias); 3^a) Análise citoquímica para avaliar o potencial embriogênico dos calos (amostras constituídas de 100 mg de calos); 4^a) Análise de citometria de fluxo para avaliar a estabilidade genética dos calos (comparados com uma plântula *in vitro* - testemunha). Conclui-se que a concentração de 4 mg L⁻¹ de 2,4-D é indicada para indução de calos em explantes da parte aérea de pitaya; a glutamina não influencia na formação de calos. Os calos apresentam maior potencial embriogênico aos 49 dias, portanto devem ser repicados neste período. A citometria de fluxo detectou endoreduplicação no material analisado.

Palavras-chave: citometria de fluxo, curva de crescimento, embriogênese somática, *Hilocereus undatus*

Callus induction, embryogenic potential and genetic stability in red pitaya

ABSTRACT

The red pitaya with white pulp (*Hilocereus undatus*) is a cactus belonging to the group of tropical fruit, considered promising for cultivation. This study aims to induce callus and embryogenic potential and determine the genetic stability in pitaya. The study was divided into four steps: 1^a) Callus induction using doses of 2,4-D (2.0 and 4.0 mg L⁻¹) and with doses of glutamine (100 and 200 mg L⁻¹); 2^a) callus growth curve for various time periods (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105 and 112 days); 3^a) Cytochemical analysis to assess the potential of embryogenic callus (samples consisting of 100 mg of callus) and 4^a) Analysis of flow cytometry to assess the genetic stability of the callus (compared with a seedling *in vitro* - control). The conclusion is that the 4.0 mg L⁻¹ 2,4-D is the best concentration for callus induction in explants shoots of pitaya; the glutamine does not influence the callus formation. The callus has higher embryogenic potential at 49 days, therefore must be spiked in this period. By flow cytometric was detected endoreduplication in the material analyzed.

Key words: flow cytometry, growth curve, somatic embryogenesis, *Hilocereus undatus*

Introdução

A pitaiá [*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose] é uma frutífera cactácea trepadeira nativa das florestas tropicais do México e Américas Central e do Sul considerada uma nova e promissora frutífera (Bellec et al., 2006). Características como: sabor doce e suave, polpa firme e repleta de sementes, têm despertado interesse nos produtores por sua grande aceitação nos mercados consumidores. O alto valor pago pelo quilo da fruta, também constitui grande atrativo para o plantio dessa frutífera.

A propagação de pitaiá é comumente realizada por sementes ou estaquia, no entanto, plantas propagadas por sementes possuem longo período juvenil e há grande risco de proliferação de pragas e doenças na propagação por estaquia. Já a utilização da cultura de tecidos possibilita obtenção de plantas sadias e produção de mudas em larga escala, a partir de pequena quantidade de material propagativo (Menezes et al., 2012).

Em algumas culturas, a micropropagação pode proporcionar alterações genéticas nos explantes, como por exemplo, polissomatia e endopoliploidia ou endoreduplicação. O conteúdo de DNA nuclear de plantas pode ser estimado pela técnica de citometria de fluxo que é um método eficiente, rápido e confiável (Menezes et al., 2012).

O objetivo do trabalho foi induzir calos de pitaiá vermelha e determinar a curva de crescimento destes, bem como avaliar o potencial embriogênico por meio de análise citoquímica e verificar sua estabilidade genética utilizando a técnica de citometria de fluxo.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, sendo dividido em duas etapas: 1ª) Indução de calos, curva de crescimento e análise citoquímica e 2ª) Análise de citometria de fluxo para avaliar a estabilidade genética de calos

Indução de calos, curva de crescimento e análise citoquímica

Sementes de pitaiá vermelha (*Hylocereus undatus*) foram estabelecidas *in vitro*, após serem submetidas ao procedimento de assepsia. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sem fitoreguladores e com adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5,5 g.L⁻¹ de ágar.

Após 70 dias, cladódios (caules modificados) foram seccionados a 1 cm de comprimento e utilizados como fonte de explantes para a cultura de calos. Esse material foi inoculado em meio MS acrescido de 1 mg L⁻¹ de biotina, onde permaneceram por 90 dias. No primeiro ensaio utilizou-se 2,4-D (2,4 diclorofenoxiacético) nas seguintes concentrações: (a) 2 e (b) 4 mg L⁻¹; e o meio foi acrescido de 100 mg L⁻¹ de glutamina. Foi realizado um segundo ensaio utilizando a glutamina nas seguintes concentrações: (a) 100 e (b) 200 mg L⁻¹, acrescidos de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. O meio foi autoclavado a 121 °C por 20 min a 1 atm. Posteriormente, as culturas foram

acondiionadas em sala de crescimento a 25 °C, na ausência de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo 4 tratamentos com 6 repetições e cada repetição constituída de 6 tubos, por experimento. As avaliações referentes ao desenvolvimento e crescimento dos calos foram realizadas após 90 dias de cultivo, por intermédio do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, no Software Sisvar (Ferreira, 2011).

Em relação à curva de crescimentos, os calos utilizados tinham 1 cm² e matéria fresca média de 0,35 g obtidos a partir de explantes da parte aérea, cultivados em meio MS, suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 100 mg L⁻¹ de glutamina, foram repicados duas vezes, em intervalos de 30 dias. Após a segunda repicagem, estabeleceu-se a curva de crescimento por meio da determinação da matéria fresca a partir do dia da inoculação (tempo 0), em intervalos de sete dias, durante 112 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 17 tratamentos, constituídos pelos intervalos de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105 e 112 dias). Foram utilizadas três repetições, sendo cada repetição constituída pela média de três tubos e cada tubo contendo um calo. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando software Sisvar (Ferreira, 2011). A curva de crescimento foi plotada a partir da média de três repetições em cada tempo de determinação de matéria fresca.

Para a realização do teste com carmim visando à confirmação do potencial embriogênico, utilizou-se 100 g de calos aos 112 dias de cultivo. Foram adicionadas de 3 a 5 gotas de corante azul de Evans (0,1%) (peso/volume) por 2 a 3 minutos em uma lâmina. Após este período, retirou-se o excesso do mesmo e adicionou-se de 3 a 5 gotas de corante carmim acético (2%) (peso/volume) pelo mesmo período de tempo. Retirou-se o excesso do corante, adicionando-se, em seguida, uma a duas gotas de glicerina. As amostras foram cobertas com uma lamínula, e em seguida as lâminas prontas foram submetidas a leves batidas com um bastão de vidro, visando espalhar o material na lâmina. A seguir, as amostras foram fotografadas em microscópio óptico de luz Olympus BX 50 e analisadas visualmente.

Análise de citometria de fluxo para avaliar a estabilidade genética de calos

Foram avaliadas quatro amostras, compostas por três repetições cada. Três amostras continham calos de pitaiá vermelha, e a quarta amostra era uma planta micropropagada (testemunha). Essas amostras foram submetidas à análise de citometria de fluxo, para verificar a estabilidade genética dos calos. Para a determinação do conteúdo de DNA, 50 mg de calo de pitaiá, juntamente com *Pisum sativum* (padrão de referência interno) foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 para a liberação dos núcleos. A suspensão de núcleos foi filtrada através de malha de 50 µm. Os núcleos foram com 25 µl de solução de iodeto de propídeo, em cada amostra. As amostras foram analisadas imediatamente após o preparo. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se escala logarítmica. A análise foi realizada no

citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8. Além disto, as médias relacionadas à quantidade de DNA foram submetidas à análise estatística pelo programa SISVAR e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

Indução de calos, curva de crescimento e análise citoquímica

Os tratamentos com 2,4-D apresentaram diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, no entanto, os tratamentos com glutamina não diferenciaram entre si (Tabela 1).

Após 10 dias da inoculação dos explantes houve aparecimento de calos friáveis e de calos compactos, ambos de cor amarela e/ou roxa (Figura 1). Foram suficientes 90 dias para que todos os explantes inoculados atingissem seu potencial máximo de cobertura calogênica.

O melhor crescimento de calos em meio suplementado com auxinas, especialmente o 2,4-D, tem proporcionado resultados satisfatórios na organogênese (Bonfill et al., 2002). O 2,4-D é a auxina mais frequentemente utilizada na indução de calos, e no caso da pitáia, os explantes responderam positivamente a sua presença. As diferentes concentrações desta auxina adicionada ao meio de cultura influenciaram a formação de calos. A maior concentração de 2,4-D (4 mg L^{-1}) foi a melhor para indução de calos de pitáia. Na concentração de 2 mg L^{-1} de 2,4-D a média obtida foi de 3,1 g de calo, porém quando a concentração passou para 4 mg L^{-1} de 2,4-D obteve-se 4,6 g de calo.

Nogueira et al. (2007), trabalharam com murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) e concluíram que a concentração de $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D é a ideal para a máxima cobertura de calos.

Tabela 1. Pitáia vermelha submetida a ensaios com 2,4-D e glutamina para indução de calos

Ensaio com 2,4-D	Médias (g)	Ensaio com glutamina	Médias (g)
2 mg L^{-1}	3,13 b	100 mg L^{-1}	1,25 a
4 mg L^{-1}	4,60 a	200 mg L^{-1}	1,36 a

Médias com a mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott.

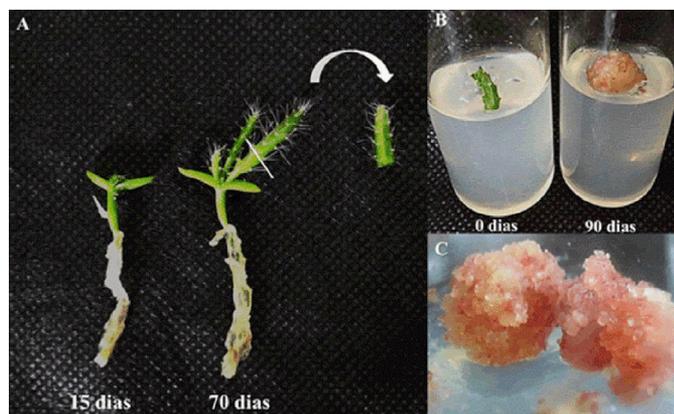


Figura 1. Plantas de pitáia produzidas *in vitro*. A) Tipos de explantes utilizados aos 70 dias de germinação; B) Explante no meio de cultura aos 0 e 90 dias evidenciando a indução de calos; C) Calos de pitáia no tratamento com 4 mg L^{-1} de 2,4-D e 100 mg L^{-1} de glutamina

Nenhum trabalho havia sido realizado até então visando à obtenção de calos de pitáia. No presente trabalho verificou-se diferença no tipo de calo formado em cada tratamento. O tratamento 1 apresentou calos menos friáveis que no tratamento 2. Esse resultado influencia na formação de embriões que poderão ser utilizados em futuros trabalhos de regeneração de plantas. Calos friáveis são altamente embriogênicos e que calos não friáveis não formam embriões.

As diferentes concentrações de glutamina não influenciaram no desenvolvimento dos calos. Estatisticamente e visivelmente não diferiram entre si, concordando com encontrados por Werner et al. (2010), trabalhando com explantes de pau-brasil. No entanto, assim como no experimento de Minardi et al. (2011), neste presente trabalho a suplementação do meio de cultura com 2,4-D e glutamina (independente da sua concentração) induziu a formação de calos. Segundo Leljak-Levanic et al. (2004), a adição da auxina e de uma fonte de nitrogênio, neste caso a glutamina, no meio de cultura, pode provocar reações de estresse nas células, e estas reações estão envolvidas na aquisição de potencial embriogênico e formação dos calos. Este fato justifica o resultado encontrado no presente trabalho.

Os explantes foram mantidos no escuro para o desenvolvimento e crescimento dos calos de pitáia. Outros trabalhos, como o de Nogueira et al. (2007), comprovam que o melhor desenvolvimento de calos ocorre na ausência de luz, independente da espécie.

Houve diferença significativa entre os períodos de tempo em que os calos permaneceram em cultivo. Cinco fases foram detectadas para pitáia vermelha: exponencial, linear, estacionária, desaceleração e declínio (Figura 2A). O comportamento da curva de calos varia em função da espécie em estudo e do explante utilizado (Santos, 2010).

A curva de crescimento dos calos de *Hilocereus undatus* inicia-se com a fase exponencial, na qual já se tem intensa divisão celular. Esta fase permaneceu de 0 aos 14 dias. O presente resultado contrasta com os obtidos por Nogueira et

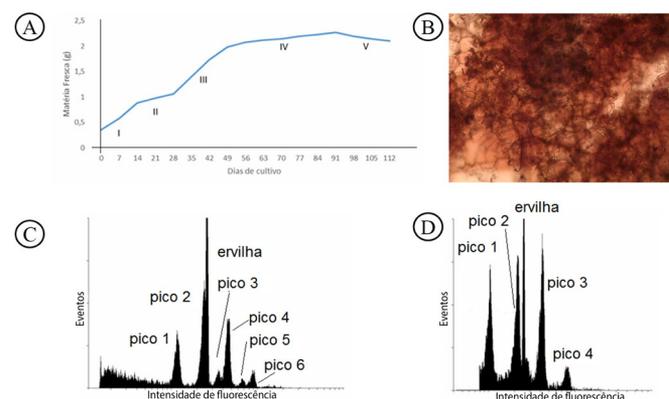


Figura 2. A) Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes da parte aérea de pitáia (*Hilocereus undatus*) inoculados em meio MS com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e 100 mg L^{-1} de glutamina. I) Fase de crescimento exponencial; II) Fase linear; III) Fase de desaceleração; IV) Fase estacionária; V) Fase de declínio. B) Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans em calos embriogênicos de pitáia vermelha, induzidos a partir de segmentos da parte aérea, por 4 mg L^{-1} de 2,4-D e 100 mg L^{-1} de glutamina. C) Histograma de citometria de fluxo em calos compactos de coloração amarela em pitáia. D) Histograma de citometria de fluxo em explantes de pitáia

al. (2008), com murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) e por Lima et al. (2007), com sangra d'água (*Croton urucurama*), nos quais a curva de crescimento de calos se inicia com a fase lag, a qual não foi identificada na curva de crescimento para pitaiá vermelha. O período de crescimento linear, no qual os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular, foi observado entre 14 e 28 dias. Esse rápido período se deve ao explante, que por ser secundário, o tecido se apresenta mais homogêneo (Serra et al., 2000).

A fase de desaceleração envolve o período de 28 a 49 dias. Esta fase é curta quando comparada a diversas espécies como castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), de 60 a 67 dias (Serra et al., 2000), lechiera (*Litchi chinesis*), de 63 a 77 dias (Mesquita et al., 2002) ou murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), de 60 a 80 dias (Nogueira et al., 2008). No entanto, para pinhão-manso (*Jatropha curcas*), a fase de desaceleração ocorre entre 14 e 28 dias. Segundo Smith (2012), é na fase de desaceleração que os calos devem ser repicados, em razão principalmente da redução de nutrientes ou secagem do ágar. A maioria das espécies citadas anteriormente atingiram a fase de desaceleração muito tardiamente em relação à pitaiá vermelha e, por isso para aquelas, a repicagem é recomendada no início da fase de desaceleração. Como para a pitaiá vermelha a desaceleração inicia-se aos 28 dias, provavelmente, ainda não houve tempo suficiente para redução de nutrientes ou secagem do ágar terem se estabelecido. Portanto, recomenda-se a repicagem no final da fase de desaceleração, ou seja, aos 49 dias. Após esse período, os calos entraram na fase estacionária, a qual se estendeu até aos 91 dias. Essa fase é praticamente imóvel com relação ao ganho em matéria fresca, pois não há mais divisão celular, o calo está, portanto, em subsistência. Ao final dos 91 dias, os calos de *Hilocereus undatus* entram na fase de declínio, em processo de senescência.

Observou-se que todos os calos de pitaiá vermelha (friáveis ou compactos) apresentaram reação positiva ao carmim acético, confirmando seu potencial embriogênico (Figura 2B). Massas calosas e pró-embriônicas reagem fortemente ao carmim acético e fracamente ao azul de Evans. Para Steiner et al. (2005), a reação positiva ao carmim acético está associada à competência da célula para o desenvolvimento celular.

Embriões somáticos foram obtidos de calos por Infante (1992), em pitaiá amarela (*Mediocalyx coccineus*), por Torres-Munoz (1996), em *Turbinicarpus pseudomacrolele* e por Moebius-Goldammer et al. (2003), em *Ariocarpus Kotschoubeyanus*. Estudos mais detalhados devem ser desenvolvidos com o objetivo de obter embriões somáticos de pitaiá vermelha e posteriormente regeneração de plantas.

Análises de citometria de fluxo para avaliar o potencial embriogênico de calo.

Pelas análises de citometria de fluxo, observou-se a presença de vários picos nos histogramas, caracterizando o fenômeno da endorreducação (Tabela 2). Este fenômeno se caracteriza por células com várias ploidias dentro de um mesmo tecido. Normalmente essas ploidias apresentam valores múltiplos, como se fossem diplóides, tetraplóides e octaplóides. Segundo Menezes et al. (2012), pitaiás apresentam endorreducação em segmentos do caule cultivados *in vitro*. No presente

Tabela 2. Quantidade de DNA de calos e explantes de pitaiá vermelha submetida a análise de citometria de fluxo

Tratamentos	Pico					
	1	2	3	4	5	6
Calo compacto amarelo	4,14 c	8,47 c	12,52 c	16,04 c	23,72 b	31,47 c
Calo friável amarelo	4,00 b	8,24 b	9,96 b	15,97 b	15,73 a	30,48 a
Calo compacto roxo	4,14 c	10,02 d	-	15,97 b	-	31,31 b
Explante	3,60 a	7,51 a	14,41 a	28,35 c	-	-

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott.

trabalho, a endorreducação também foi observada em calos de pitaiá.

Calos amarelos (compactos e friáveis) apresentaram 6 picos, caracterizando 6 níveis diferentes de ploidia (Figuras 2C). No entanto, calos roxos apresentaram apenas 4 níveis de ploidia (Figuras 2D). Isso pode ser devido ao teor de antocianina presente no material, representado pela coloração roxa. Pigmentos e metabólitos secundários podem dificultar as análises de citometria por impedirem o acesso do iodeto de propídeo ao DNA.

A planta micropropagada apresentou 4 picos com quantidades de DNA aproximadamente múltiplas entre si, caracterizando bem a endorreducação (Figura 2D). Por outro lado, nos calos observaram-se que a quantidade de DNA segue tendência de endorreducação, porém não em múltiplos aproximados, como aconteceu com a planta. Esse fato pode ser devido à instabilidade genética desse material, sugerindo que os calos podem apresentar mixoploidia ou variação somaclonal.

Segundo Gilissen et al. (1993), provavelmente, a origem das células endopoliploides nos calos se deve a ocorrência dessas células nos órgãos e tecidos do explante. Silva (2012), trabalhando com calos de *Passiflora cincinnata* verificou diferentes ploidias em um mesmo calo. Kubaláková et al. (1996), concluíram que em *Cucumis sativus*, a ocorrência de células poliploides em calos embriogênicos detectadas pela citometria de fluxo explica a origem de regenerantes poliploides. Já Gajdosová et al. (1995), trabalhando com calos embriogênicos de *Albion alba*, não verificaram ocorrência de mudanças do nível de ploidia durante a indução e cultivo de calos, demonstrando estabilidade cromossômica.

Conclusões

A concentração 4 mg L⁻¹ de 2,4-D é indicada para indução de calos em explantes da parte aérea de pitaiá vermelha.

A glutamina não influencia a formação de calos.

A repicagem dos calos deve ser realizada ao final da fase de desaceleração, ou seja, aos 49 dias, de acordo com a curva de crescimento de calos.

Os calos de pitaiá vermelha apresentam potencial embriogênico, endorreducação e tendência a instabilidade genética.

Literatura Citada

Bellec, F.L.; Vaillant, F.; Imbert, E. Pitahaya (*Hilocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits*, v.61, n.4 p.237-250, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1051/fruits:2006021>>.

- Bonfill, M.; Cusidó, R.; Palazón, J.; Piñol, M.; Morales, C. Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in panax ginseng calluses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.68, n.1, p.73-78, 2002. <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1012996116836>>.
- Ferreira, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>>.
- Gajdosová, A.; Vooková, B.; Kormut'ák, A.; Libiaková, G.; Dolezel, J. Induction, protein composition and dna ploidy level of embryogenic calli of silver fir and its hybrids. *Biologia Plantarum*, v.37, n.2, p.169-176, 1995. <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02913205>>.
- Gilissen, L.J.W.; Staveren, M.J.V.; Creemers-Molenar, J.; Verhoeven, H. A. Development of polysomaty in seedlings and plants of *Cucumis sativus*. *Plant Science*, v.91, n.2, p.171-179, 1993. <[http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90140-U](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(93)90140-U)>.
- Goto, R. Reflexões sobre a cadeia de frutas e hortaliças. In: AGRICULTURAL 2010. Anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2010. p.345-347.
- Infante, R. In vitro axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocalyx coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.31, n.2, p.155-159, 1992. <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00037700>>.
- Kubaláková, M.; Dolezel, J.; Lebeda, A. Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus culture. *Biologia Plantarum*, v.38, n.3, p.475-480, 1996. <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02896685>>.
- Leljak-Levanić, D.; Bauer, N.; Mihaljević, S.; Jelaska, S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *Journal Plant Physiology*, v.161, n.2, p.229-236, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-01055>>.
- Lima, E.C.; Paiva, R.; Soares, F.P.; Nogueira, R.C.; Emrich, E.B.; Nicioli, P.M. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). *Magistra*, v.19, n.3, p.184-190, 2007. <http://www.magistra.ufrb.edu.br/3_07_19_3.html>. 23 Out. 2015.
- Menezes, T.P.; Gomes, W.A.; Pio, L.A.S.; Pasqual, M.; Ramos, J.D. Micropropagação e endoreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* Haw. *Bioscience Journal*, v.28, n.6, p.868-876, 2012. <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/13986>>. 23 Out. 2015.
- Mesquita, A.C.; Paiva, R.; Santiago, E.J.A.; Paiva, P.D.O.; Paiva, L.V.; Gomes, G.A.C. Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinesis* Sonn.). *Magistra*, v.14, n.1, p.1-6, 2002. <http://www.magistra.ufrb.edu.br/3_02_14.html>. 23 Out. 2015.
- Minardi, B.; Voytena, A.P.; Zaffari, G. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. *Insula Revista de Botânica*, n.40, p.70-81, 2011. <<http://dx.doi.org/10.5007/2178-4574.2011n40p70>>.
- Moebius-Goldammer, K.G.; Mata-Rosas, M.; Chavez-Avila, V.M. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, v.39, n.4, p.388-393, 2003. <<http://dx.doi.org/10.1079/IVP2003427>>.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, p.473-497, 1962. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>.
- Nogueira, R.C.; Paiva, R.; Lima, E.C.; Soares, G.A.; Oliveira, L.M.; Santos, B.R.; Emrich, E.B.; Castro, A.H.F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.10, n.1, p.44-48, 2008.
- Nogueira, R.C.; Paiva, R.; Oliveira, L.M.D.; Soares, G.D.A.; Soares, F.P.; Castro, A.H.F.; Paiva, P.D.O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, n.2, p.366-370, 2007. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000200015>>.
- Santos, D.N. Caracterização de massas pró-embriogênicas em pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010. 118p. Dissertação Mestrado. <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/2213>>. 25 Out. 2015.
- Serra, A.G.P.; Paiva, R.; Paiva, P.D.O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). *Ciência e Agrotecnologia*, v.24, n.4, p.833-840, 2000. <<http://www.editora.ufla.br/index.php/component/phocadownload/category/38-volume-24-numero-4?download=596:vol24numero4>>. 25 Out. 2015.
- Silva, T.C.R. Heterogeneidade vertical da ploidia de DNA em calos de *Passiflora cincinnata* analisada por citometria de fluxo. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. 39p. Dissertação Mestrado. <<http://repositorio.ufv.br/handle/123456789/4770>>. 10 Set. 2015.
- Smith, R.H. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. 3.ed. London: Academic Press, 2012. 208p.
- Steiner, N.; Vieira, F.N.; Maldonado, S.; Guerra, M.P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48, n.6, p.895-903, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000800005>>.
- Torres-Munoz, L.; Rodriguez-Garay, B. Somatic embryogenesis in the threatened cactus *Turbinicarpus pseudomacroleche* (Buxbaum and Backeberg). *Journal of the Professional Association of Cactus Development*, v.1, p.36-38, 1996. <<http://www.jpacd.org/downloads/Vol1/008V1P%2036-38.pdf>>. 23 Out. 2015.
- Werner, E.T.; Milanez, C.R.D.; Mengarda, L.H.G.; Vendrame, W.A.; Cuzzuol, G.R.F.C. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Acta Botanica Brasilica*, v.24, n.4, p.1046-1051, 2010. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062010000400019>>.