

## Meio e condições de cultivo *in vitro*.

Santos, Maria do Desterro Mendes dos<sup>1</sup>; Torres, Antonio Carlos<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Aluna de mestrado da UNB; <sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Hortaliças, Br 060, Km 09, zona rural, Cx. Postal 218, CEP: 70 359-970, Brasília – DF, Fone (61) 3385 9070, email: [torres@cnph.embrapa.br](mailto:torres@cnph.embrapa.br)

## INTRODUÇÃO

O meio de cultura consiste de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono e energia, vitaminas e substâncias reguladoras de crescimento. Os outros componentes incluem aminoácidos e amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas.

Uma consideração relevante nas citações de meios de cultura é que estes são designados como MS, White, B5, etc, embora queira-se referir apenas aos sais minerais de MS, White, B5, etc. Também, deve-se observar se nas referências aos meios não houve alterações nas concentrações dos carboidratos, vitaminas, suplementos orgânicos e substâncias de crescimento. Algumas vezes isso não é muito claro. Os componentes básicos do meio nutritivo o fazem um substrato excelente para o crescimento de bactérias e fungos. A inclusão de fungicidas e bactericidas não é aconselhável, podendo ter efeito tóxico para o explante (Thurston et al., 1979).

### Componentes do Meio Nutritivo

A qualidade da água é muito importante em cultura de tecidos uma vez que este é o componente que entra em maior proporção na preparação do meio. Para melhor controle deve-se usar água destilada deionizada.

### Nutrição mineral

O **nitrogênio** pode ser suplementado na forma de nitrato, nitrito, amônio ou compostos orgânicos, dependendo do material em cultura. É constituinte de aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas, tendo importância na síntese protéica. Meio enriquecido com nitrogênio é fundamental para a indução de embriogênese somática, bem como diferenciação de parte aérea.

O **fósforo** é adicionado ao meio, principalmente, como fosfato ( $H_2PO_4$ ). Desempenha papel importante no metabolismo energético, na regulação de processos enzimáticos e na ativação de enzimas. Necessário para a síntese do ATP; na organogênese está envolvido na diferenciação da parte aérea, pois reverte o efeito das auxinas.

O **potássio** é usado na forma de nitrato, fosfato ou cloreto. Ativador de várias enzimas do metabolismo de carboidratos e proteína. Uma das mais importantes é a quinase do piruvato, enzima envolvida nos processos de glicólise e respiração. É necessário para a embriogênese somática. Esta necessidade é distinta daquela para crescimento de células. Enquanto que 1mM é suficiente para proliferação celular, uma concentração substancial de 20mM é utilizada para produção ótima de embriões somáticos em cenoura.

O **enxofre** é incorporado ao meio, principalmente, na forma de sulfato, outra possibilidade é na forma de aminoácidos (cistina, cisteína e metionina). Envolvido no metabolismo energético na formação do fosfossulfato de adenosina, constituinte da tiamina, biotina e coenzima A.

O **cálcio** é adicionado, principalmente, na forma de cloreto ou nitrato. Possui papel importante no metabolismo da planta. Envolvido na divisão celular, uma vez que um dos componentes da lamela média é o pectato de cálcio, mantém a integridade da membrana celular e é importante na densidade de grãos de polén requerida para germinação. É um agente quimiotrófico para o direcionamento do tubo polínico. Altas concentrações (6 a 9mM) são necessárias para controle da necrose do ápice.

O **magnésio** é mais usada na forma de o sulfato de magnésio. É um dos componentes da clorofila; cofator importante para várias reações enzimáticas que atuam sobre substratos fosforilados.

O **hidrogênio** exerce papel importante no metabolismo da planta. Com exceção do CO<sub>2</sub>, todos os compostos orgânicos têm hidrogênio. Na sua forma oxidada é um próton, tendo assim papel tão importante quanto qualquer elemento.

O **carbono** forma o esqueleto de todos os compostos orgânicos.

O **oxigênio** é similar ao carbono, é um dos componentes de todos os compostos orgânicos do organismo vivo: carboidratos, lipídios, ácidos nucléicos, produtos naturais. O papel do oxigênio livre é receptor de elétrons na respiração.

O **ferro** é adicionado na forma de Fe-EDTA. Envolvido nas reações de oxi-redução nos organismos vivos. Há muitos metabólitos contendo ferro. Essencial para a síntese da clorofila e é integrante do grupo protético (heme) das porfirinas.

O **boro** é usado na forma de ácido bórico. Envolvido no metabolismo de carboidratos e ácidos nucléicos. Importante na germinação de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico.

O **molibidênio** é adicionado na forma de molibdato de sódio (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>). Cofator da redutase do nitrato.

O **cobre** é usado como sulfato de cobre. Constituinte da enzima plastocianina que é importante componente do transporte eletrônico.

O **cloro** é essencial para a fotossíntese, sendo requerido durante a reação de Hill.

O **zinco** é usado como sulfato de zinco. Importante nas reações de oxi-redução das plantas. Cofator de enzimas anidrase carbônica.

O **manganês** é adicionado como sulfato de manganês. Essencial para a reação de Hill na fotossíntese, quando a molécula de água é quebrada produzindo elétrons e oxigênio.

O **cobalto** é usado como cloreto de cobalto e está envolvido na expansão foliar.

## Nutrição Orgânica

Os compostos orgânicos importantes são os carboidratos, substâncias reguladoras de crescimento, vitaminas, aminoácidos e amidas, certas purinas e pirimidinas, hexitóis e ácidos orgânicos.

### A. Fonte de carbono e energia

Os carboidratos mais usados são a sacarose, glicose e frutose nos níveis de 2 a 5% (p/v). A concentração de 3% é a mais usada. Concentrações de sacarose de 6 a 12% podem ser usadas em determinadas situações, por exemplo, em cultura de embriões, frutos e anteras, enquanto que nível de 1,5% é usado em cultura de protoplastos.

Glicose e frutose devem ser esterilizadas a frio.

### B. Substâncias reguladoras de crescimento

O controle químico da diferenciação de parte aérea em cultura de calo de *Nicotiana* foi estabelecido por Skoog e Tsui (1948). Em suas observações, a auxina inibia a formação de gemas, enquanto que a adenina bem como o fosfato inorgânico revertiam este efeito estimulando brotações. Este foi o ponto de partida para que Skoog e Miller (1957) constatassem que o processo de organogênese *in vitro* era controlado por substâncias hormonais. Eles observaram que o desenvolvimento de parte aérea, raiz ou calo era determinado pelo balanço entre auxina e citocinina. Meio com concentrações relativamente alta de auxina e baixa de citocinina favorecia o enraizamento e o balanço inverso promovia a formação de parte aérea. Concentrações iguais propiciava a produção de calo. Por esta razão as auxinas e citocininas são componentes importantes no controle da morfogênese *in vitro*.

As concentrações das auxinas nos meios variam de 0,01 a 10mg/l. As auxinas mais usadas são AIA, AIB, ANA, 2,4-D, 2,4,5-T, 4-CPA e picloran. A auxina 2,4-D é bastante usada para a indução de calo *in vitro* e tem o efeito de supressão da morfogênese. O 4-CPA é uma das auxinas menos tóxicas para o tecido e, talvez, a que tenha o efeito menos detrimental na morfogênese. A auxina 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), e picloran induzem a formação de calo em monocotiledôneas. As auxinas são termo-estáveis não decompondo quando autoclavadas. O AIA é a auxina natural e a menos estável, sendo destruído em pH baixo, luz (após 12 dias de exposição à intensidade luminosa de 1500 lux, 10-15% do AIA foi decomposto) (Posthumus, 1971), peróxidos, oxidação catalítica, e peroxidases. As auxinas 2,4-D e ANA são sintéticas e têm efeitos semelhantes as auxinas de ocorrência natural (Stepan-Sarkissian, 1990), sendo mais estáveis á degradação. As soluções estoques de AIA não devem ser usadas após uma semana de seu preparo, enquanto soluções estoques de 2,4-D e ANA podem ser armazenadas até 2 meses sem ocorrer decomposição.

A dissolução das auxinas é feita em NaOH 1N. Utiliza-se 0,3ml desta base para dissolver 10mg de auxina (3 gotas dessa base, em pipeta Pasteur).

As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies. Induzem a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea (Smith, 1992). As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina (CIN), benziladenina (BA), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e thidiazuron (TDZ). As concentrações recomendadas destas substâncias variam de 0,03 a 30 mg/l. Cinetina, zeatina e isopentenil adenina são considerados termo-estáveis, uma vez que nenhum produto de sua decomposição foi observado após sua autoclavagem a 120°C, durante 1 hora (Dekhuijzer, 1971). A benziladenina permanece estável quando autoclavada a 110°C, durante 20 minutos, mas a degradação fotoquímica pode ocorrer.

A dissolução das citocininas pode ser feita em HCl 1N, levemente aquecido. Utiliza-se 0,3ml deste ácido para dissolver 10mg de citocinina.

O ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) é usado, algumas vezes, em cultura de "meristemas", na recuperação de plantas livres de vírus. O GA<sub>3</sub> deve ser dissolvido em água com pH ajustado a 5,7 (Smith, 1992) ou em base. As soluções de GA<sub>3</sub> devem ser esterilizadas em filtro bacteriológico uma vez que esta substância se decompõe por autoclavagem. Van Bragt e Pierik (1971) observaram que GA<sub>3</sub> submetido a autoclavagem a 114°C, durante 20 minutos, teve sua atividade reduzida em mais de 90%. As soluções estoques devem ser preparadas na hora.

O ácido abscísico (ABA) é um fitohormônio envolvido no processo de dormência e abscisão de folhas e frutos (Smith, 1992). Na cultura de tecidos o papel deste composto ainda não está bem definido (Gamborg, 1991), embora tenha efeito na embriogênese somática. Este composto é termo-estável, mas é fotossensível. Entretanto, Gamborg (1971) recomenda a esterilização à frio. O ABA é dissolvido em água ou base.

A Tabela 1 contém a relação de hormônios e substâncias reguladoras de crescimento mais comumente usados em cultura de tecidos.

### C. Vitaminas

**Tiamina (Vit. B<sub>1</sub>)** a sua importância no metabolismo celular é devido ao seu papel como coenzima na descarboxilação dos cetoácidos. Ex: Piruvato e cetoglutárico.

**Ácido nicotínico (Niacina ou Vitamina B<sub>3</sub>)**. É um componente das coenzimas NAD e NADP, importantes na transferência de hidrogênio.

**Piridoxina, Piridoxal e Piridoxamina (complexo vit. B<sub>6</sub>)**. Fazem parte do piridoxal-fosfato, coenzima importante no metabolismo de aminoácidos. Estas vitaminas têm papel importante nas reações de transaminação e descarboxilação.

**Biotina**. Influência no metabolismo do ácido aspártico, especialmente, nas reações do ciclo de Krebs que leva à formação deste ácido.

**Ácido ascórbico (vit. C).** Catalisador de fosforilização fotossintética devido ao poder de oxidar e reduzir facilmente.

#### **D. Aminoácidos e amidas**

**L-tirosina** tem influência na iniciação de parte aérea em cultura de calo, **L-arginina** no enraizamento, e **L-serina** na obtenção de embriões haplóides mediante o cultivo de micróspero.

As amidas **L-glutamina** e **L-asparagina** são benéficas na obtenção de embriões somáticos, e a **Cisteína** é incluída, às vezes, como agente redutor.

#### **E. Outros suplementos orgânicos**

- **Hexitóis:** O mais usado é o **inositol**, myo-inositol é a forma inativa e i-inositol é a ativa. O Meso-inositol é uma mistura das formas **d** e **l**. O inositol é considerado estimulador de processos de crescimento *in vitro* e pode servir como fonte de carboidrato. Desempenha papel importante na biossíntese do ciclitol, no armazenamento de compostos polihídricos como reserva, na germinação de sementes, no transporte de açúcar, na nutrição mineral, no metabolismo de carboidratos, na estrutura de membranas, formação de parede celular, homeostase de hormônios e no stress fisiológico (Loevus e Loewus, 1983).

- **Purinas e Pirimidinas:** A **adenina** ou **sulfato de adenina** estimula o crescimento de brotações *in vitro*. A concentração usada varia de 40 a 160mg/l.

- **Ácidos orgânicos:** A adição de ácidos de compostos intermediários do ciclo de Krebs, tais como malato ou citrato, é comum em meio destinado a cultura de protoplasto. Estes compostos parecem estar envolvidos na minimização do efeito inibidor da amônia (Gamborg, 1991). A concentração de até 10mM de sais de potássio é recomendada. O **ácido ascórbico** e o **ácido cítrico** são usados para prevenir o escurecimento de tecidos excisados de plantas. As soluções antioxidantes são preparadas usando uma mistura de **100mg de ácido ascórbico** e **150mg de ácido cítrico**, dissolvido em 1 litro de água. Esta solução não deve ser autoclavada e sua esterilização é feita em filtro bacteriológico de 0,22 ou 0,45 micras. A inclusão de 2000 mg/l de ácido ascórbico estimula o crescimento de calo.

- **Compostos fenólicos:** Muitos derivados fenólicos (mono-OH) promovem o desenvolvimento de parte aérea (Lee e Skoog, 1965) e iniciação de raízes (bi-OH) (Rucker e Paupardin, 1969). Estas substâncias atuam na degradação oxidativa do AIA. Por outro lado, compostos fenólicos (bi-OH) inibem a degradação oxidativa do AIA, tendo efeito benéfico no enraizamento.

- **Extratos naturais:** São preparações obtidas de produtos naturais, de composição indefinida, que servem para enriquecer o meio de cultivo. São fontes de fatores, até então desconhecidos, que estimulam o crescimento *in vitro*. A inclusão destes extratos em meio de cultura só é feita, em último caso, quando as tentativas de adequação não forem suficientes para promover determinado processo morfogênico. Em trabalhos de rotina, estas preparações podem ser usadas caso estimulem respostas desejadas.

**Leite de coco.** É o endosperma de *Cocos nucifera* na fase gelatinosa. É um suplemento bastante usado. Recomenda-se que seja esterilizado à frio.

**Água de coco.** É o endosperma líquido de *Cocos nucifera* comprado no mercado. Bastante usado nos laboratórios do Brasil.

**Suco de laranja, tomate e outros.** Também podem ser adicionados ao meio nutritivo. O suco de laranja contém ácido cítrico e outras substâncias de crescimento não identificadas. Pode-se usar suco de laranja fresco ou congelado.

**Polpa de banana.** Tem sido usada na suplementação de meio de cultura de orquídeas. O seu efeito depende da cultivar e da quantidade, bem como, se originária de frutos verdes ou maduros.

**Extrato de levedura.** É extraído com álcool, contendo em sua composição produtos solúveis neste solvente. É fonte de aminoácidos e vitaminas. Ver composição em anexo.

Tabela 1. Relação de e substâncias reguladoras de crescimento mais usadas em cultura de tecidos de plantas.

<b>Auxinas</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>M.M.</b>
01. Ácido Indolil-3-acético	AIA	175,2
02. Ácido Indolil-3-butírico	AIB	203,23
03. Ácido Naftalenoacético	ANA	186,2
04. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4 -D	221,04
05. Ácido 4-clorofenoxiacético	4-CPA	184,5
06. Ácido 4-amino-3,5,6-Tricloropicolínico	Picloram	241,46
07. Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético	2,4,5-T	255,49
08. Ácido-Naftoxiacético	NOA	202,21
<b>Citocininas</b>		
09. 6-Furfurilaminopurina ou Cinetina	CIN	215,2
10. 6-Benzilaminopurina ou 6-benziladenina	BA, BAP	225,2
11. N <sup>6</sup> -(4-hidroxi-3-metilbut-2enil) aminopurina ou Zeatina	ZEA	219,2
12. (6-benzilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl) 9H-purina	PBA	300
13. N <sup>6</sup> -3-dimetil-2-butylaminopurina ou Isopenteniladenina	2ip	203,3
14. Thidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-thiadi-azol-5yl) ureia	TDZ	220,2
<b>Giberelinas</b>		
14. Ácido giberélico	GA <sub>3</sub>	346,4
<b>Outros</b>		
15. Ácido 2-(cloroetil) fosfônico ou Ethephon ou Ethrel	CEPA	144,5
16. Ácido abscísico	ABA	264,31

#### Materiais de suporte

**Ágar:** É um dos componentes mais impuros em cultura de tecidos. É um polissacarídeo obtido pela purificação de algas marinhas. O ágar deve ser de boa qualidade, por exemplo, TC ágar, ou Taiyo ágar. A concentração usada varia de 0,6% a 1% (de 6 a 10 g/l). O ágar impuro é constituído de polissacarídeos, aminoácidos, sais, açúcar, etc., devendo ser lavado em água destilada antes de ser usado. O ágar é alcalino, líquido à temperatura de 80°C e se solidifica à 40°C.

Outros produtos gelificantes incluem-se **Gelrite** (Calbiochem) e **Phytigel** (Sigma). São mais puros que o ágar e, provenientes de fermentações bacterianas. Usados na concentração de 0,2% (2 g/l). Citam-se que estes produtos podem causar vitrificação em algumas espécies.

Alguns laboratórios sugerem o uso de polvilho de mandioca ou de milho (maizena) como gelificantes.

**Outros produtos:** Poliacrilamida, sílica gel e papel de filtro

**Considerações sobre carvão ativado:** Esse produto é um pó bastante fino e de cor escura. É utilizado para eliminar substâncias tóxicas produzidas pelo explante *in vitro*. A concentração é em torno de 0,3%. É usado quando ocorre o escurecimento do tecido *in vitro*, descoloração de meio de cultura, formação de calo na fase de enraizamento de propágulos, ou quando o crescimento do tecido é inibido. Adsorve produtos provenientes de metabolismo, bem como

substâncias hormonais e vitaminas. Sugere-se, em alguns casos, aumento da concentração de auxina, quando na presença de carvão ativado. A pureza deste produto é variável.

Qualidades físicas do meio

### 1. Meio sólido

### 2. Meio líquido

**Estacionário:** Com suporte de papel de filtro ou sem suporte

**Com agitação:** Suave, vigorosa, recíproca e orbital.

### pH

O crescimento do tecido *in vitro* é melhor em torno de pH 5,0. Recomenda-se este valor para formulações líquidas. Em meios gelificados, com ágar, o pH deve ser ajustado para 5,7, pois em pH 5,0, ocorre a hidrólise de polissacarídeos, enquanto que em pH 6,0-6,2 verifica-se a precipitação de sais.

Quantidade de meio

Como regra geral, quanto menor o explante, menor a quantidade de meio a ser utilizado. Para ápices caulinares de batata e batata-doce, 4ml de meio líquido é suficiente para a diferenciação e crescimento inicial, entretanto, em culturas estabelecidas, a taxa de crescimento é diretamente proporcional à quantidade de meio (Murashige, 1977).

Condições de incubação

Devem ser consideradas as exigências de luz, temperatura, trocas gasosas e acúmulo de produtos tóxicos no meio.

### A. Luz

Não ocorre diferenciação de parte aérea em culturas mantidas no escuro. As características intensidade luminosa, período de exposição e qualidade da luz, são fundamentais.

Qualidade da luz

A qualidade do espectro da lâmpada utilizada é de suma importância na iniciação de parte aérea e raiz em cultura *in vitro*. As lâmpadas recomendadas são fluorescentes branca fria, Gro-lux ou outros tipos de lâmpadas com emissões nas regiões do vermelho (430nm) e azul (660nm). Estas regiões do espectro influenciam os processos morfogenéticos. As lâmpadas incandescentes não são recomendadas, pois emitem nas faixas do vermelho e vermelho distante e, este último não é adequado.

A região do azul é crítica para indução de parte aérea e a iniciação de raízes adventícias é estimulada por luz vermelha. Em *Helianthus tuberosus*, a iniciação de raízes adventícias em secções de tubérculo, foi efetiva quando as culturas foram expostas a luz emitida próximo a 600nm (Letouze e Beauchesne, 1969).

A luz vermelha também pode inibir a iniciação de raízes laterais, enquanto que a infravermelha pode reverter este efeito (Furuya e Torrey, 1964). A diferenciação de raízes laterais e adventícias parecem ter exigências diferentes.

Logo, em cultura de tecidos, quando se objetiva a multiplicação de plantas, as lâmpadas devem conter emissões adequadas nas regiões da luz azul e vermelho, pois ambas estão envolvidas na iniciação de parte aérea e raiz.

Muitas das lâmpadas disponíveis foram desenhadas para serem utilizadas em casa de vegetação, onde a fotossíntese é importante, mas em cultura de tecidos a fotossíntese não é tão limitante.

As lâmpadas fluorescentes devem ser trocadas a cada seis meses.

Período de exposição diária á luz

Fotoperíodo

As exigências em fotoperíodo devem ser satisfeitas. O início de determinado processo morfogênético só se manifesta quando as culturas estão expostas à adequado comprimento do dia. Em geral, 16 horas de iluminação tem se mostrado satisfatório várias espécies, utilizando-se lâmpadas fluorescentes branco fria ou Gro lux. A manutenção das culturas sob iluminação constante não é recomendada.

Quantidade total de energia

Deve-se considerar a intensidade luminosa e o número de horas de exposição por dia. Em fumo não há exigência de fotoperíodo, mas, máxima formação de parte aérea ocorre com 16 horas de fotoperíodo e,  $30-50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa.

B. Temperatura

As exigências de temperatura para desenvolvimento da planta em condições naturais devem ser consideradas como ponto de partida para estabelecer cultivo *in vitro* da espécie em questão. Deve-se ter sempre em mente que os requerimentos são um reflexo do que ocorre *in vivo*. Espécies oriundas de *habitat* tropical, temperado e desértico têm diferentes temperaturas ótimas para crescimento e desenvolvimento.

C. Umidade relativa

Em condições de clima seco pode-se usar tapas algodão, pois estas permitem boa troca gasosa, entretanto, o meio pode secar mais rápido em condições de baixa umidade relativa. Quando em clima úmido cuidados devem ser tomados com relação as contaminações. As tampas de algodão podem ser usadas com cautela, e deve-se usar um desumidificador na câmara de crescimento.

D. Trocas gasosas

A cultura de tecidos é um sistema fechado. A acumulação de  $\text{CO}_2$  em altas concentrações conduz à anaerobiose, fermentação e produção de álcoois. Em alguns casos, altas concentrações de gás carbônico induzem distúrbios no crescimento e desenvolvimento da planta *in vitro*. Deve-se observar a sensibilidade da planta a voláteis. A maneira de fechar o frasco é bastante importante. Em cultura de tecidos de *Solanum tuberosum*, nunca se deve vedar os frascos com parafilm, devido ao acúmulo de altas concentrações de  $\text{CO}_2$  e etileno (Calbo e Torres, 1989), fazendo com que os propágulos apresentem anomalias caracterizadas pelo entumescimento do caule, folhas ausentes ou pequenas, iniciação de raízes adventícias em vários pontos do caule, e o efeito indireto da necrose do ápice caulinar (deficiência nas trocas gasosas reduz a transpiração e a translocação do cálcio é dificultada). Em laboratórios comerciais de produção de batata-semente livre de viroses não é recomendado a vedação das culturas.

Em locais onde há muita poluição ambiental recomenda-se o uso de filtro de carvão ativado.

## Esterilização do meio de cultura

Tabela 2. Tempo mínimo necessário, recomendado para esterilização de meio para cultura de tecidos de plantas (Catálogo da Sigma, 1990).

Tempo mínimo de autoclavagem de meio em cultura de tecidos de planta*	
Volume de meio por recipiente (ml)	Tempo mínimo de autoclavagem
25	20
50	25
100	28
250	31
500	35
1000	40
2000	48
4000	63

\*121°C e 1,05 Kg/cm<sup>2</sup>

## REFERÊNCIAS

BALL, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media, a neglected aspect in the technique of culture of plant tissue. **Bull. Torrey Bot. Club**, v. 80, p. 409-411, 1953.

CALDAS, L.; HARIDASSAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. 509 p.

CORNEJO-MARTIN, M. J.; MINGO-CASTEL, A. M.; PRIMO-MILLO, E. Z. **Pflanzenphysiol**, v. 94, p. 117-123, 1979.

DALTON, C. C.; IQBAL, K.; TURNER, D. A. Iron phosphate precipitation in Murashige e Skoog media. **Physiol. Plant.**, v. 57, p. 472-476, 1983.

DEKHUIJZEN, H.M. Sterilization of cytokinins. In: VAN BRAGAT, J.; BRAGT, J. V.; MOSSEL, D. A. A.; PIERIK, R. L. M.; VELDSTRA, H. (Eds). **Effects of Sterilization on Components in Nutrient Media**. Wageningen: Kniphorst Scientific Bookshoop, 1971. p. 129-132.

FUJIMURA, T.; KOMAMIME, A. Z.. **PflanzenPhysiol**, v.99, p. 1-8, 1980.

GAMBORG, O.L. Callus and cell culture. In GAMBORG, O.L.; WETTER, L.R. (Eds). **Plant Tissue Culture Methods**. Wat. Res. Council of Canada. 1975.

GAMBORG, O. L.; MURASHIGE, T.; THORP, T. A.; VASIL, I. K. Plant Tissue Culture Media. **in vitro**, v. 12, n. 7, p. 473-478, 1976.

GAMGORG, O. L. Media preparation. **Plant Tissue Culture Manual A1**:1-24, 1991.

Gautheret, R. J. Investigations of the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* cultured *in vitro*. **Am. J. Bot.** 56:702-712, 1969.

- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant. Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories.** Exegetics Limited, 1984.
- HUANG, Li-Chun; MURASHIGE, T. Plant tissue culture media: major constituents, their preparation and some applications. **TCA Manual**, v.3, n. 1, p. 539-548, 1976.
- KAMADA, H.; HARADA, H. **Z. Pflanzenphysiol**, v.91, p. 255-266, 1979.
- LOEWUS, F.A.; LOEWUS, M. W. Myo- inositol: it's biosynthesis and metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 34, p. 137-167, 1983.
- MARGARA, J. Étude des facteurs de la néoformation de bourgeons en culture *in vitro* chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. Var. Botrytis) **Ann. Physiol. Veg.**, v.11, p.95-112, 1969.
- MOSSEL, D. A. A.; PIERIK, R. L. M.; VELDSTRA, H. (Eds): **Effects of Sterilization on Components In Nutrient Media.** Wageningen, The Netherlands: Knipphorst Scientific Bookshop, 1971.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. The role of gibberellin in shoot differentiation in tobacco tissue culture. In: WHITE, P. R.; GROVE, A. R. (Eds). **Plant Tissue Culture.** McCutchan Pub. Corp., Berkeley, 1963. p. 401-409.
- MURASHIGE, T. Sample preparations of media. In. KRUSE, P. F.; Patterson, Jr, N.K. (Eds). **Tissue Culture Methods and Applications.** Academic Press, 1973. p. 698-703.
- MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant tissue culture. **Bot. Bull. Academia Sinica**, v. 18, p. 1-24, 1977.
- NABORS, M. W.; HEYSER, J. W.; DYKES, T. A.; Demott, K. J. Long-duration, high - frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. **Planta**, v.57, p. 385-391, 1983.
- PEER, H. G. Degradation of sugars and their reactions with amino acids. In: VAN BRAGT, J.; MOSSEL, D. A. A.; PIERIK, R. L. M.; VELDSTRA, H. (Eds): **Effects of Sterilization on Components in Nutrient Media.** Wageningen, The Netherlands: Knipphorst, p. 105-113, 1971.
- PIERIK, R. L. M. **In Vitro Culture of Higher Plants.** Dordrecht: Boston, Martinus Nijhoff Publishers, Lancaster, 1987. 344p,
- STENPAN-SARKISSIAN, G. Selection of media for tissue and cell culture. In: POLLARD, J. W.; WALKER, J. M (Eds). **Plant Cell and Tissue Culture.** Clifton, New Jersey: Human Press, 1990, 597p.
- Posthumus, A. C. Auxins. In: VAN BRAGT, J., MOSSEL, D.A. A., PIERIK, R.L.M.; VELDSTRA, H. (Eds): **Effects of Sterilization on Components in Nutrient Media.** Misc. Papers 9 (1971) Landbouwhogeschool Wageningen: The Netherlands, 1971. p. 125-128.
- SMITH, R. H. **Plant Tissue Culture.** Techniques and Experiments. , San Diego: Academic Press, 1992, 171p.
- STREET, H. E. Nutrition and metabolism of plant tissue culture. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 19, p. 467-485, 1957.

TENLTAM, E.J. Vitamins. In: VAN BRAGT, J.; MOSSEL, D. A. A.; PIERIK, R. L. M.; VELDSTRA, H. (Eds): **Effects of Sterilization on Components In Nutrient Media**. Misc. Papers 9 (1971) Wageningen. The Netherlands: Landbouwhogeschool, 1971. p. 121-123.

THURSTON, K.C.; SPENCER, S. J.; ARDITTI, J. Phytotoxicity of fungicides and bactericides in orchid culture media. **Amer. J. Bot.**, v. 66, n. 7, p. 825-835, 1979.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V.R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.P.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A .V. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001.20p. (Circular técnica n.24).

VAN BRAGT, J.; PIERIK, R.L.M. The effect of autoclaving on the gibberellins activity of aqueous solutions containing gibberellins A3. In: VAN BRAGT, J.; MOSSEL, D.A.A.; PIERIK, R.L.M.; VELDSTRA, H. (Eds): **Effects of Sterilization on Components in Nutrient Media**. Misc. Papers 9 (1971), Wageningen, The Netherlands: landbouwhogeschool, 1971. p. 125-123.

YAMAKAWA, T.; KURAHASHI O.; ISHIDA, K.; KATO, S.; KODAMA, T.; MINODA, Y. Stability of indole-3-acetic acid to autoclaving aeratioin and light illumination. **Agric. Biol. Chem.**, v. 43, n.4, p. 879-880, 1979.

**PALAVRAS CHAVES:**

Cultivo *in vitro*, meio de cultura.