

NUTRIÇÃO MINERAL E DETECÇÃO DE ROTENÓIDES DURANTE A MANUTENÇÃO DE CALOS DE TIMBÓ VERMELHO¹

Heraclito Eugenio Oliveira da CONCEIÇÃO²

José Eduardo Brasil Pereira PINTO³

Ismael de Jesus Matos VIÉGAS²

Dilson Augusto Capucho FRAZÃO²

Bárbara Rodrigues de QUADROS⁴

Ana Karolina da Silva RIPARDO⁴

RESUMO: Os inseticidas de origem vegetal são pouco utilizados atualmente, devido ao aparecimento dos defensivos sintéticos. Dentre esses, encontra-se a rotenona, que, entre os rotenóides, é a principal substância contida nas raízes dos timbós. Entretanto, estudos sobre a nutrição mineral e biossíntese de compostos rotenóides de calos de timbó vermelho são escassos. O objetivo deste trabalho é o de estudar os efeitos de variações de concentrações dos sais de N e P do meio MS, na nutrição mineral e biossíntese de compostos rotenóides, durante a fase de manutenção de calos de timbó-vermelho. Explante foliar de 1 cm² e explante radicial de 1 cm de comprimento foram inoculados em meio MS, suplementados com 1,6 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 1,6 mg.L⁻¹ de ANA + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, respectivamente, e mantidos em sala de crescimento durante 28 dias. Após este período, três fragmentos de calos de cerca de 1 cm de diâmetro foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL, contendo 30 mL do meio MS com variações na composição dos sais de N e P, suplementados com 2 mg.L⁻¹ de ANA + 2 mg.L⁻¹ de BAP e mantidos em sala de crescimento, durante 28 dias e, em seguida, subcultivados por mais 28 dias. A redução e/ou a ausência de ambas as formas de N resultou em reduções marcantes de crescimento do calos, independente ou não da redução da concentração de P do meio nutritivo MS. Calos oriundos de explante radicial apresentaram resposta positiva de biossíntese de compostos rotenóides, após 28 e 56 dias de cultivo *in vitro*, nos meios de manutenção.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Derris urucu*, Cultura de Tecido, Nitrogênio, Fósforo, Rotenona, Metabolismo Secundário.

¹ Aprovado para publicação em 16.02.2006

² Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66095-100 – Belém (PA). E-mail: heraclit@cpatu.embrapa.br; ismael@cpatu.embrapa.br; dilson@cpatu.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Titular da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, CEP 37200-000 – Lavras (MG)

⁴ Aluna do Curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, Caixa Postal 917, CEP 66077-530 – Belém (PA).

MINERAL NUTRITION AND DETECTION OF ROTENONDS DURING THE MAINTENANCE OF RED TIMBO CALLUSES

ABSTRACT: The insecticides of vegetable origin are not very used now due to the marketing of synthetic defensives. The rotenone, that enters the rotenoids, it is the main substance contained in the roots of the timbós. However, studies on mineral nutrition and biosynthesis of rotenoids compounds of calluses of red timbó are scarce. The objective of this work was to determine the effects of concentrations variations in N and P salts of the MS medium in the mineral nutrition and biosynthesis of rotenoids compounds during the maintenance of calluses of red timbó. Leaf explant of 1 cm² and root explant of 1 cm of length were inoculated in a MS medium, supplemented with 1,6 mg.L⁻¹ of 2,4-D and 1,6 mg.L⁻¹ of ANA + 1,0 mg.L⁻¹ of BAP, respectively, and kept in growth room for 28 days. After this period, three fragments of calluses of around 1 cm of diameter were inoculated in bottle from glass of 250 mL, containing 30 mL of the MS medium with variations in the composition of the N and P salts, supplemented with 2 mg.L⁻¹ de ANA + 2 mg.L⁻¹ de BAP and kept in growth room for 28 days and, next, subcultivated for more 28 days. The reduction or/and the absence in both sources of N, resulted in outstanding reductions of calluses growth, independently or not of the P concentration reduction in the 'MS' nutrient medium. Calluses originating from root explant presented positive answer of biosynthesis of rotenoids compounds after 28 and 56 days of cultivation in vitro in the maintenance medium..

INDEX TERMS: *Derris urucu*, tissue culture, nitrogen, phosphorus, rotenone, secondary metabolism.

1 INTRODUÇÃO

Timbó é o nome pelo qual são conhecidas na Amazônia, inúmeras plantas de cultura pré-colombiana, que apresentam propriedades ictiotóxicas. Há muitas espécies de timbó, mas as de uso mais generalizado na Amazônia são os timbós vermelho, *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride, e o timbó branco, *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbride (PIRES, 1978).

Os inseticidas de origem vegetal são pouco utilizados atualmente, devido ao aparecimento dos defensivos sintéticos. Dentre os primeiros, cita-se a nicotina, que praticamente não é mais utilizada. Outro

composto orgânico é a rotenona, que, entre os rotenóides, é a principal substância contida nas raízes dos timbós. Essa substância é um veneno violentíssimo para insetos e animais de sangue frio. Atua como veneno de contato, estomacal e traqueal, reunindo os três métodos técnicos usados no combate às pragas por contato, envenenamento e asfixia (CRAVERO; GUERRA; SILVEIRA, 1976).

Os rotenóides têm outros efeitos biológicos importantes, tais como a inibição da formação de microtúbulos da tubulina e atividade anticancerígena. Há interesse na influência dos rotenóides sobre certas relações planta/inseto e um interesse permanente no seu uso como veneno para peixes, em reservatórios de águas que utilizam espécies mais

valiosas ou na pesca indígena (CROMBIE; WHITING, 1998).

O cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui uma alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal, independente de mudanças climáticas ou condições do solo.

O meio nutritivo mais utilizado em cultura de tecidos é o MS de Murashige e Skoog (1962), embora a concentração de nutrientes deste meio nutritivo deva ser melhor estudada devido a diferentes respostas obtidas por diversas espécies (PIERIK, 1987; CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Tecidos originados de diferentes partes de uma planta podem possuir diferentes requerimentos para um desenvolvimento satisfatório (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Os macronutrientes são incluídos nos meios nutritivos na forma de sais inorgânicos, sendo que o nitrogênio (N) e o enxofre (S) podem ser adicionados, também, como componentes de suplementos orgânicos (aminoácidos, por exemplo) (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). É usual suprir o nitrogênio na forma de íons NH_4^+ e NO_3^- , embora algumas plantas possam se desenvolver em soluções contendo N somente na forma de nitrato (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

Embora algumas plantas respondam satisfatoriamente à adição de apenas nitrato ao meio nutritivo e a maioria delas necessita de nitrogênio nítrico e amoniacal, sendo necessário encontrar o balanço ideal de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ para o ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro*, o total de N re-

querido é de 168 a 840 mg.L^{-1} ; a quantidade de NH_4^+ varia de 108 a 360 mg.L^{-1} e a de NO_3^- entre 372 a 2 480 mg.L^{-1} (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

O fósforo (P) é absorvido pelas plantas na forma de íon H_2PO_4^- e é nesta forma que é acrescentado nos meios de cultura de tecidos (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). No meio MS, o fosfato de potássio monobásico é usado na concentração de 170,13 mg.L^{-1} . Este nível é considerado baixo para algumas culturas, sendo recomendada a suplementação com um nível igual de fosfato de sódio monobásico (MURASHIGE, 1974).

Carneiro (1997) estudou em condições de cultivo *in vitro*, a influência de doses de N e de P no crescimento de explantes primários da bananeira Maçã. Verificou que a supressão do nitrogênio amoniacal do meio MS, mantendo-se apenas o nitrato, não foi suficiente para proporcionar um maior crescimento em termos de peso da massa fresca de brotos de bananeira Maçã. Também, a redução do nitrogênio amoniacal do meio nutritivo MS não afetou grandemente o peso da massa fresca de brotos, após 28 dias de cultivo, em dosagem normal e duplicada de fósforo.

Silva e Goleniowski (1994) relatam que a adição de inibidores do metabolismo primário de terpenos (KCN – cianeto de potássio, cloramfenicol, ciclohexamida e ácido ferúlico) em cultura de calos de *Ambrosia tenuifolia* inibiu completamente a produção de lactona sesquiterpeno. Fontes de nitrogênio (adenina, asparagina, arginina e leucina)

promoveram a biossíntese desse metabólito enquanto, a adição de possíveis precursores de lactona sesquiterpeno (coronopilin ou ácido peruvínico) aumentou o seu conteúdo em calos.

Estudos sobre nutrição mineral e biossíntese de compostos rotenóides durante a fase de manutenção de calos em timbó vermelho são escassos. Desta forma, este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar os efeitos de variações das concentrações dos sais de N e de P do meio de cultura MS durante a fase de manutenção de calos, oriundos de explantes foliar e radicial de plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os calos foram induzidos usando-se explantes foliar e radicial de plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro*. O explante foliar de 1 cm² foi inoculado em meio MS, suplementado com 1,6 mg.L⁻¹ de 2,4-D e os explantes radicial (quatro segmentos) de 1 cm de comprimento foram inoculados em meio MS, suplementado com 1,6 mg.L⁻¹ de ANA + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 150 x 25 mm, contendo 15 mL do meio de cultura adicionado de sacarose 3%, solidificado com 0,7% de ágar, pH ajustado para 5,7±0,1 e mantidos em sala de crescimento a 26±1 °C, umidade relativa do ar a 70±5%, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 25 μmol.m⁻².s⁻¹, durante 28 dias. Após este período, procedeu-se a etapa de manutenção dos calos, na qual três fragmentos de calos com cerca de 1

cm de diâmetro, oriundos dos tratamentos de indução foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL, contendo 30 mL do meio MS com variações na composição dos sais de N e P (Tabela 1), suplementados com 2 mg.L⁻¹ de ANA + 2 mg.L⁻¹ de BAP, sacarose 3%, solidificado com 0,7% de ágar, pH ajustado para 5,7±0,1 e mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições da fase de indução de calos, durante 28 dias e, em seguida, subcultivados por mais 28 dias.

Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: massas fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente) e teor de compostos rotenóides aos 28 e 56 dias de cultivo. A quantificação de compostos rotenóides foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), usando-se extratos metanólicos oriundos de amostras duplicadas de 10 mg de calos secos e triturados por amostra por tratamento. Durante a extração, adicionaram-se 10 mL de metanol à, aproximadamente, 10 mg da amostra. Em seguida, procedeu-se a agitação em banho de ultrason, durante 5 minutos e a filtragem a vácuo. A quantificação foi realizada em um cromatógrafo Marca SHIMADZU, Modelo LC-9A, equipado com coluna PEGASIL ODS. Durante a operação, a fase móvel usou metanol/água (70/30), vazão de 1 mL.min⁻¹, injeção de 20 μL da amostra e detecção após 20 minutos, em detector SHIMADZU, Modelo SPD-6AV SPECTROPHOTOMETRIC UV-VIS a 280 nm.

Os calos oriundos de cada tratamento de indução foram considerados na etapa de manutenção de calos como um experimento

isolado. O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 x 2 (10 variações de N e P e 2 subculturas), com três repetições cada uma constituída por um frasco de 250 mL contendo 30 mL do meio MS, com as devidas variações dos sais de N e P e 3 fragmentos de calos. Os dados obtidos na etapa de manutenção de calos foram submetidos à análise

de variância para as variáveis de resposta em questão, através do programa de estatística computacional SANEST – Sistema de Análise Estatística (ZONTA; MACHADO; SILVEIRA JÚNIOR, 1984), e, de acordo com os resultados das análises, os dados foram novamente processados e as médias comparadas através do teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Tabela 1 – Tratamentos usados na fase de manutenção de calos oriundos de explantes foliar e radicial de *D. urucu*, com ênfase nas variações das concentrações dos sais de N e de P do meio MS, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de ANA + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Tratamento	N e P (concentração relativa do meio nutritivo de 'MS')			Tratamento	N e P (concentração relativa do meio nutritivo de 'MS')		
	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	P-KH ₂ PO ₄		N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	P-KH ₂ PO ₄
1	½	0	½	6	½	0	1
2	0	½	½	7	0	½	1
3	½	½	½	8	½	½	1
4	1	1	½	9	1	1	1
5	2	2	½	10	2	2	1

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de variância dos dados de MFCALO e MSCALO mostraram efeitos significativos diferenciados para fatores e suas interações nestas variáveis de resposta, indicando que as variações do meio de cultura MS, às épocas de avaliação e sua interação tiveram influências determinantes nestas variáveis de resposta.

Pela Tabela 2, observam-se os valores das médias dos pesos da MFCALO e MSCALO de *D. urucu* oriundos de explantes foliar e radicial, aos 28 e 56 dias de cultivo *in vitro*, em 10 variações do meio MS para manutenção de calos. Pode-se notar que, aos 28 dias de cultivo, o melhor resultado da MFCALO oriundo de explante foliar foi obtida pelos tratamentos 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10. Aos 56 dias, os tratamentos 4, 5, 9 e 10 foram superiores aos demais tratamentos.

Tabela 2 – Massas fresca (MFCALO) e seca de calos (MSCALO), induzidos em explantes foliar e radicial de *D. urucu*, mantidos por 28 e 56 dias, em diferentes meios de manutenção, suplementados com ANA e BAP ($2,0 + 2,0 \text{ mg.L}^{-1}$)¹.

Tratamentos ²	Variáveis de resposta									
	Explante foliar					Explante radicial				
	MFCALO (g)		MSCALO (g)			MFCALO (g)		MSCALO (g)		
	28 dias	56 dias	28 dias	56 dias		28 dias	56 dias	28 dias	56 dias	
1 (1/2+0+1/2)	2,94bcD	3,59cdC	0,18aB	0,26cB		1,34abD	1,49deD	0,10abC	0,15cB	
2 (0+1/2+1/2)	2,60bcD	1,45dD	0,16aC	0,12dC		0,24bE	0,21eE	0,03bD	0,02dC	
3 (1/2+1/2+1/2)	3,34abcC	9,60bAB	0,17aC	0,45bA		2,33abC	7,80bAB	0,15aB	0,43abA	
4 (1+1+1/2)	4,91abB	14,76aA	0,18aB	0,53abA		3,63aB	13,72aA	0,17aB	0,53aA	
5 (2+2+1/2)	5,57abB	15,86aA	0,23aB	0,58abA		1,37abD	3,72cdC	0,10abC	0,16cB	
6 (1/2+0+1)	3,90abcC	6,37cB	0,20aB	0,47abA		0,27bE	2,72dC	0,02bD	0,16cB	
7 (0+1/2+1)	1,55cD	1,91dD	0,14aC	0,17cdD		0,33bE	0,35eE	0,04bD	0,04dC	
8 (1/2+1/2+1)	5,19abB	11,34bA	0,23aB	0,49abA		1,46abD	5,18cB	0,12abB	0,42bAB	
9 (1+1+1)	6,39aB	15,54aA	0,25aB	0,60aA		3,13aB	9,55bA	0,15aB	0,40bAB	
10 (2+2+1)	4,55abcB	14,53aA	0,20aB	0,59aA		1,35abD	9,25bA	0,08abC	0,42bAB	

¹ Letras minúsculas, na vertical e maiúsculas na horizontal, em cada parâmetro, indicam diferenças estatísticas significativas ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

² Referentes às concentrações dos sais de N e P do meio nutritivo 'MS'.

Para os valores das médias da MSCALO oriundos de explante foliar, aos 28 dias de cultivo *in vitro*, não houve efeitos significativos, enquanto que aos 56 dias, os melhores resultados foram apresentados pelos tratamentos 4, 5, 6, 8, 9 e 10. Em geral, independentemente dos tratamentos, houve um aumento no crescimento de calos nos meios de manutenção, avaliados em termos de MFCALO e MSCALO oriundos de explante foliar, entre 28 e 56 dias de cultivo. O crescimento de calos, em termos de MFCALO, oriundos de explante foliar foi reduzido pelas reduções nas concentrações e formas de N e independente da concentração de P. A MSCALO oriunda de explante foliar aos 56 dias, na presença da $\frac{1}{2}$ de N-NH_4^+ (tratamento 6) ou $\frac{1}{2}$ de $\text{N-NH}_4^+ + \frac{1}{2}$ de N-NO_3^- (tratamento 8), em combinação com toda a fonte de P, não sofreu redução de crescimento. O dobro da concentração dos sais de N do meio nutritivo MS, independentemente da concentração de P usada não afetou o crescimento. Ficou comprovado que a redução da concentração dos sais de MS afetou o crescimento de calos de *D. urucu* oriundos de explante foliar e a maior exigência da nutrição nítrica com o aumento do tempo de cultivo *in vitro*.

Após 28 dias de cultivo, verificou-se que os melhores resultados da MFCALO oriundos de explante radicial foram obtidos pelos tratamentos 1, 3, 4, 5, 8, 9 e 10, enquanto que, aos 56 dias de cultivo, o tratamento 4 foi superior aos demais tratamentos. Para os valores das médias da MSCALO oriundo de explante radicial aos 28 dias, verificou-se a superioridade dos

tratamentos 1, 3, 4, 5, 8, 9 e 10, enquanto que aos 56 dias os tratamentos 3 e 4 foram superiores aos demais tratamentos. Em geral, os efeitos nas reduções nas concentrações e formas dos sais de N do meio nutritivo MS para calos oriundos de explante radicial de *D. urucu* seguiram a mesma tendência dos obtidos para explante foliar. Entretanto, detectaram-se maiores exigências das formas dos sais de N, na presença da metade ou de toda a dose de P, no crescimento de calos oriundos de explante radicial, medido em termos de MFCALO e MSCALO. Aos 56 dias de cultivo, o crescimento da MFCALO e MSCALO, oriundo de explante radicial, foi afetado na presença do dobro da concentração de N e independente da concentração de P do meio de cultura de MS.

O nitrogênio difere dos demais macronutrientes pelo fato de apresentar-se na forma de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato). O efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas de tecidos vegetais é marcante; o nitrato, como única fonte de N, sustenta uma boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo, também, a melhor forma de N para diversas culturas (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). No entanto, há espécies que não crescem bem com nitrato no meio. O balanço entre os íons, nitrato e amônio, tem merecido maior destaque nos estudos realizados sobre crescimento e multiplicação *in vitro* (CALDAS; CALDAS, 1976; OJIMA; OHIRA, 1978; CARNEIRO, 1997; SANTIAGO; CONCEIÇÃO; CARVALHO, 1999).

Caldas e Caldas (1976) recomendam a utilização de amônio no máximo de um terço do nitrogênio total; caso contrário, as células *in vitro* podem apresentar sintomas de toxidez, reduzindo o crescimento das plantas. De acordo com esses autores, a mesma concentração de amônio, que é inibitória quando a concentração de nitrato é baixa, permite um bom crescimento quando se aumenta a concentração de nitrato. Neste trabalho, a redução e/ou ausência de ambas as formas de N resultou em reduções marcantes de crescimento de calos expressos como MFCALO ou MSCALO, independente ou não na redução da concentração do P do meio nutritivo MS e da origem do explante.

A análise química de compostos rotenóides determinadas por CLAE em calos de *D. urucu* oriundos de explante foliar de plântulas de exemplares do clone 37 germinadas *in vitro* não detectaram a presença destes compostos. Estes resultados diferiram dos obtidos por Tailang, Kharya e Dixit (1997), em calos de células de *Glycyrrhiza glabra* e por Li et al. (1995), em calos induzidos em diversos tipos de explantes de *Barberis pruniosa*.

Quanto aos calos de *D. urucu* oriundos de explante radicial, as análises química de compostos rotenóides determinados por CLAE indicaram a presença destas substâncias neste tipo de material. Estes compostos foram detectados nos tratamentos 5, 6 e 8, após 28 e 56 dias de cultivo *in vitro* com teores de oscilaram entre 0,015 e 0,060%. A presença de compostos rotenóides em

cultura de raiz tem sido relatada para *D. elliptica*. Kudakesseril e Staba (1988) relatam a utilização de culturas de calos e de suspensão de células para determinar a quantidade de rotenóides em *D. elliptica* e *Tephrosia vogelli* cultivadas em MS líquido contendo diferentes combinações de 2,4-D e cinetina.

Compostos secundários produzidos pela planta mãe, na maioria dos casos, não são encontrados em calos. Apenas a regeneração da raiz, dos brotos foliares e da própria planta restauram a produção destes compostos (KAWAGUCHI et al., 1993). Em particular, o calo funciona como meristema e a não produção dos compostos secundários está relacionada com a alta atividade metabólica direcionada pela mitose. A diferenciação destas células, assim como a desaceleração da atividade mitótica, progressivamente, permite o acúmulo dos compostos secundários. A biossíntese de metabólitos secundários pode ocorrer em todos os tecidos e células de uma dada espécie vegetal, devido a totipotência celular. Entretanto, como via de regra, a biossíntese é restrita a determinado órgão, tecido e/ou célula especializada e está relacionada com a diferenciação e o desenvolvimento celular (WIERMANN, 1981). Em nível intracelular, existem sítios específicos de biossíntese de natureza lipo e hidrofílicas que armazenam os produtos secundários de acordo com suas propriedades. Alguns precursores, assim como a própria molécula, pode ser transportados intra ou intercelularmente através de transporte passivo ou ativo.

4 CONCLUSÃO

A redução e/ou a ausência de ambas as formas de N resultou em reduções marcantes de crescimento do calos, independente ou não da redução da concentração de P do meio nutritivo MS e da origem do calo.

Calos oriundos de explantes radiciais são mais exigentes, tanto da forma quanto da concentração de sais de N da formulação do meio MS.

A produção de massas fresca e seca de calos oriundos de explantes radiciais é menor do que em explantes foliares.

Calos oriundos de explante radicial apresentaram resposta positiva de biossíntese de compostos rotenóides, após 28 e 56 dias de cultivo *in vitro*, com teores que oscilaram entre 0,015 e 0,060%.

REFERÊNCIAS

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, 1998. v.1, p.87-132.
- CALDAS, R.A.; CALDAS, L.S. Nitrate, ammonium and Kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. *Physiologia Plantarum*, v.37, p.111-116, 1976.
- CARNEIRO, I.F. *Adequação de técnicas de cultura in vitro na obtenção de mudas de bananeira (Musa AAB) cultivar Maçã*. 1997. 106p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1997.
- CRAVERO, E.S.; GUERRA, M. de S.; SILVEIRA, C.P.D. da. *Manual de inseticidas e acaricidas: aspectos toxicológicos*. Pelotas: Aimara, 1976. 229p.
- CROMBIE, L.; WHITING, A.D. Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. *Phytochemistry*, Oxford, v.49, n.6, p.1479-1507, 1998.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Tissue culture media: plant propagation by tissue culture*. Eastern Press, 1984. 709p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, 1998. v.1, p.183-260.
- KAWAGUCHI, K.; ASAKA, I.; HIROTANI, M.; FURUYA, T.; KATSUKI, S. Cardenolides in the regenerated plants obtained from *Strophanthus divaricatus* calli. *Phytochemistry*, v.34, n.5, p.1317-1321, 1993.
- KUDAKASSERIL, G.J.; STABA, E.J. Insecticidal phytochemicals. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. (Ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants: phytochemicals in plant cell cultures*. San Diego: Academic Press, 1988. v.5, cap.31.

- LI, Q.R.; YANG, J.Y.; CAO, A.F.; ZHAO, M. Callus culture of *Barberis pruinosa* e berberine content in callus. *Acta Botanica Yunnanica*, v.17, n.3, p.325-330, 1995. (CD-ROM)
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, v.25, p.135-166, 1974.
- _____; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p. 473-497, 1962.
- OJIMA, K.; OHIRA, K. Nutritional requirements of callus and cell suspension cultures. In: THORPE, T.A. (Ed.) *Frontiers of plant tissue culture 1978*. Calgary: University of Calgary, 1978. p.265-275.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro culture of higher plants*. Netherlands: Martinus Nijhoff, 1987. 344p.
- PIRES, J.M. Plantas icotóxicas: aspecto da botânica sistemática. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 5., 1978, Campinas. *Anais...* Campinas: SBPC, 1978. p.37-41.
- SANTIAGO, E.J.A. de; CONCEIÇÃO, H.E.O. da; CARVALHO, J.G. de et al. Growth of the pepper (*Pipier hispidinervium* DC.) submitted to different levels of N and P in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Largo Drive West, v.35, n.3 (Part II), p.50-A, Mar. 1999.
- SILVA, G.L.; GOLENIOWSKI, M.E. Stimulants and inhibitors of psilostachyinolide production in callus culture. *Journal of Natural Products*, v.57, n.2, p.225-229, 1994. (CD-ROM).
- TAILANG, M.K.; KHARYA, M.D.; DIXIT, V.K. Mutation induced bioproduction of glycyrrhetic acid from callus culture of *Glycyrrhiza glabra* L. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.59, n.1, p.22-25, 1997. (CD-ROM).
- WIERMANN, R. Secondary products and cell and tissue differentiation. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (Ed.). *The biochemistry of plants*. New York: Academic Press, 1981. v.7, p.85-115.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. *Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST)*. Pelotas: UFPEL, 1984. 115p.