

# OBTENÇÃO DE CALOS E SUSPENSÃO DE CÉLULAS DE DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS<sup>1</sup>

MAURO AUGUSTO DE PAULA<sup>2</sup>, JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO<sup>3</sup>,  
JOSÉ OSWALDO SIQUEIRA<sup>4</sup> e MOACIR PASQUAL<sup>3</sup>

**RESUMO** - Plântulas de alfafa (*Medicago sativa* L.), puerária (*Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth) e tomateiro (*Lycopersicum esculentum* Mill) com quinze dias após a germinação, e de batata (*Solanum tuberosum* L.) e batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) com 40 dias, foram utilizadas na obtenção de explantes, transferidos para tubos contendo 20 ml de meio Murashige & Skoog (MS) suplementado com 5 mg de 2,4-D e 1 mg de cinetina por litro de meio, para obtenção de calos. Os calos obtidos foram repicados para meio MS com 2 g/l de caseína hidrolizada e utilizados para a obtenção de suspensões de células, em frascos-erlenmeyer, contendo 25 ml de meio MS líquido, suplementados com 5 mg de 2,4-D, 2 mg de biotina, 1 mg de cinetina e 1 g de caseína hidrolizada por litro e de meio. As suspensões de células foram mantidas sob agitação, de 90 rpm, a 27°C e com 16 hs/diárias de luz (1000 lux). O estabelecimento das curvas de crescimento e peso fresco de células foi determinado durante 24 dias, em intervalos de três dias, sendo sua viabilidade monitorada, periodicamente, pela técnica de redução do INT. As suspensões de células obtidas de calos de hipocótilo de alfafa, batata-doce e puerária, apresentaram maior viabilidade e crescimento mais rápido e abundante, que aquelas obtidas de calos de hipocótilo de batata e tomateiro, e radícula de puerária.

Termos para indexação: curvas de crescimento, alfafa, batata, batata-doce, puerária, tomateiro, cultivo *in vitro*.

## OBTENTION OF CALLUS AND CELL SUSPENSION OF DIFFERENT PLANT SPECIES

**ABSTRACT** - Fifteen-day old seedlings of lucerne (*Medicago sativa* L.), pueraria (*Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth) and tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill), and sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) were transferred to tubes containing 20 ml of Murashige & Skoog (MS) medium, amended with 5 mg/l of 2,4-D and 1 mg/l of cinetin per litre of medium, for the obtention of callus. The obtained calluses were transplanted to Erlenmeyer flasks containing MS medium with 2 g/l of casein, and were used for the obtention of cell suspensions, in Erlenmeyer flasks containing 25 ml of liquid MS medium, amended with 5 mg of 2,4-D, 2 mg of biotin, 1 mg of cinetin and 1 g of casein per litre of medium. The cell suspensions were incubated, under 90 rpm shaking at 27°C temperature and 16 h of light a day (1,000 lux). The establishment of the growth curves and fresh weight of cells was determined, every three days, during 24 days with periodical monitoring of cell viability, through INT (iodonitrotetrazolium) monitoring technique. Suspensions from calluses of lucerne, sweet potato and pueraria hypocotyl exhibited more abundant and faster growth rate and greater viability than those from potato and tomato hypocotyl, and pueraria radicles.

Index terms: growth curves, lucerne, potato, sweet potato, pueraria, tomato, culture *in vitro*.

## INTRODUÇÃO

Calos são tecidos não diferenciados, constituídos por um grupo de células diferenciadas e desorganizadas que se desenvolve como resposta a uma lesão química ou física (Yeoman & Macleod 1977), e quando cultivados em meio com elevada concentração de auxina e adição de caseína hidrolizada, apresentam-se

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 15 de janeiro de 1990. Extraído da Dissertação de Mestrado em Agronomia para a ESAL, apresentada pelo primeiro autor e financiada pelo PADCT-FINEP-CNPq.

<sup>2</sup> Eng.-Agr., M.Sc., Esc. Sup. de Agric. de Lavras (ESAL), Dep. de Ciência do Solo, Caixa Postal 37, CEP 37200. Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Eng.-Agr., Ph.D e D.Sc., respectivamente, Prof.-Adj., ESAL, Dep. de Agric. Bolsista do CNPq.

<sup>4</sup> Eng.-Agr., Ph.D., Prof.-Adj., ESAL, Dep. de Ciência do Solo. Bolsista do CNPq.

friáveis (Dixon 1985). Calos com essa consistência são requeridos para a obtenção de suspensão de células, que se caracterizam pelo crescimento de agregados ou células dispersas, quando em meio de cultura líquido sob agitação (Eriksson 1965 e Street 1973).

A cultura de calos e de suspensão de células pode ser derivada de um grande número de órgãos da planta (raízes, brotos, folhas) ou tipos de células específicas (endosperma, pólen), sendo a escolha de uma dessas fontes de explantes uma função do objetivo do estudo e do meio de cultura utilizado (Street 1973). Tanto os calos quanto a suspensão de células são de grande importância para o estudo de fenômenos morfogênicos *in vitro*, bem como para a obtenção de variações genéticas no explante inicial (Dixon 1985, Evans et al. 1981, Hildebrandt et al. 1946, Street 1973). Além disso, suspensões de células têm sido utilizadas para a obtenção de produtos secundários, incluindo vários fármacos, representando uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial.

As metodologias para obtenção de calos de várias espécies vegetais são amplamente conhecidas (Dixon 1985, Evans et al. 1981, Henderson et al. 1984, Murashige 1980 e Phillips & Collins 1984), mas adaptações nos métodos de desinfestação superficial, na obtenção de explantes e na suplementação do meio de cultivo, são ainda necessárias, especialmente para novas cultivares, espécies vegetais menos estudadas e estudos com objetivos específicos.

O presente estudo teve como objetivo a obtenção de cultura de calos e de suspensão de células de alfafa, batata, batata-doce, puerária e tomateiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de calos, transferiram-se cinco sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.), puerária (*Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) desinfetadas em hipoclorito de sódio a 0,5%, por 15 minutos, e lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada, para

placas de 9 cm de diâmetro, contendo 30 ml de meio ágar-água a 0,7%, autoclavado, pH 6,0, sendo estas placas incubadas no escuro a 25°C. Plântulas de batata (*Solanum tuberosum* L.) e de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam) foram obtidas de segmentos contendo gemas laterais em meio MS (Murashige & Skoog 1962), 7 g/l de ágar e pH 5,7, incubadas em câmara de crescimento a 25°C, com 16 hs diárias de luz (1.000 lux).

As plântulas de alfafa, puerária e tomateiro, com 15 dias de incubação após a germinação, e plântulas de batata e batata-doce, obtidas após 40 dias de incubação, foram seccionadas em segmentos de hipocótilo e radícula de aproximadamente 2 cm, e transferidos para placas-de-petri contendo papel de filtro umedecido e autoclavado. Nas placas, eles receberam cortes transversais e longitudinais, sendo em seguida transferidos para tubos de 20 x 150 mm contendo 20 ml de meio MS, suplementado com 5 mg de 2,4-ácido diclorofenoxiacético-2,4-D + 1 mg de cinetina, 7 g de ágar por litro de meio, e pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . A transferência foi feita utilizando-se pinça longa, sendo colocado, horizontalmente, apenas um explante na parte superficial de meio de cultivo inclinado. Os tubos foram vedados com tampa de plástico e identificados. Todas essas operações foram realizadas em câmara de fluxo laminar, utilizando-se pinças, estiletes e bisturis desinfestados em álcool etílico 70%.

Os tubos contendo os explantes de alfafa, batata e batata-doce foram incubados em câmara de crescimento em completa escuridão, (Henderson et al. 1984 e Phillips & Collins 1984), enquanto os explantes de puerária e tomateiro foram incubados em câmara com fotoperíodo de 16 hs de luz/8 hs de escuro (Dixon 1985), com intensidade luminosa de 1.000 lux. A temperatura da câmara de crescimento foi mantida em 27°C em ambos os casos. Realizaram-se observações diárias por um período de 40 dias, sendo a ocorrência de contaminações e início de indução de calos devidamente anotados. Após esse período, fragmentos de 3 mm de diâmetro de calos induzidos foram repicados para tubos de 20 x 150 mm contendo 20 ml de meio MS suplementado, conforme descrito anteriormente, sendo adicionados ainda, 2 g/l de caseína hidrolizada. Essa operação de repicagem de calos foi realizada mensalmente, durante todo o período de condução dos diferentes experimentos.

A suspensão de células foi obtida em frascos-erlenmeyer de 125 ml, vedados com algodão e papel alumínio, contendo 25 ml de meio líquido autoclava-

do, meio MS suplementado com 5 mg de 2,4-D, 2 mg de biotina, 1 mg de cinetina e 1 g de caseína hidrolizada, por litro de meio, e pH 6,0. Fragmentos friáveis de calos, de aproximadamente 200 mg, foram obtidos 30 dias após a repicagem e mantidos sob agitação em agitador recíprocante a 90 rpm, 27°C e com 16 hs de luz diárias (1.000 lux), conforme Gamburg (1966). Após 20 dias de cultivo, foram transferidos, aproximadamente, 0,4 g de células para frascos-erlenmeyer contendo 25 ml de meio MS, descrito anteriormente. As curvas de crescimento das células foram obtidas pela determinação do peso fresco, a cada três dias, durante 24 dias de incubação. Para a determinação do peso fresco, procedeu-se à filtração a vácuo, de três repetições de cada suspensão, utilizando-se filtro de membrana com poro de 0,25 µm.

A viabilidade das células vegetais obtidas após lavagem por três vezes em solução estéril de sacarose a 0,2%, conforme Carr et al. (1985) – utilizando-se unidades de filtração contendo papel de filtro esterilizado –, foi avaliada pela incubação em placas de 60 mm de diâmetro, por 12 horas, no escuro e a 27°C, em mínimo de três amostras contendo aproximadamente 200 células (quantificadas em lâminas microscópicas quadriculadas), imersas em 20 ml de solução de iodonitrotetrazolium violeta (INT) a 0,2%, em tampão Tris HCl 0,2 M (pH 7,4). As células foram consideradas viáveis, quando apresentaram intensa pigmentação avermelhada, mediante observações feitas em microscópio estereoscópico com aumento de 40 vezes, caracterizando a redução de tetrazolium para formazan (Carr et al. 1985 e Mac Donald 1980). Os resultados foram expressos em percentagem média de células viáveis.

Em todos os experimentos, utilizaram-se no mínimo sete repetições para cada tratamento, com excessão das curvas de crescimento das células, em que se utilizaram apenas três repetições.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O início da formação dos calos nos explantes das diferentes espécies vegetais variou em função do tempo de incubação (Tabela 1). Para a alfafa, a indução teve início aos oito dias após a inoculação, com o surgimento de áreas esbranquiçadas e proliferação intensa de células sobre os cortes superficiais, apresentando aspecto gelatinoso. Na batata, e puerária,

tanto de hipocótilo quanto de radícula, e tomateiro, só houve sinais de indução de calos aos quinze dias. Para a batata e tomateiro, verificaram-se calos de coloração clara e aspecto grumoso, recobrendo os cortes à superfície dos explantes. Na puerária, explantes tanto de hipocótilo quanto de radícula apresentaram calos de aspecto grumoso e de coloração amarelada. O início da indução de calos em batata-doce só foi verificado aos 22 dias, quando ocorreu intensa proliferação de aspecto gelatinoso e coloração amarelada. Essa resposta diferenciada das espécies vegetais à indução de calos em relação ao tempo de incubação já foi relatada por Evans et al. (1981), e está relacionada a exigências nutricionais específicas (Hildebrandt et al. 1946), condições de incubação (temperatura, luminosidade etc.) e a características intrínsecas da espécie ou mesmo cultivar.

A coloração dos calos obtidos variou com o período de incubação (Tabela 1). No caso de alfafa, batata, batata-doce e tomateiro, a coloração inicialmente esbranquiçada passou a amarelada, possivelmente em decorrência da síntese de pigmentos, alterações no metabolismo celular e amadurecimento das células, conforme Nozue et al. (1987). O surgimento de pigmentação verde em calos de puerária, tanto naqueles obtidos de hipocótilo quanto naqueles de radícula, está associado à presença de clorofila (Evans et al. 1981). As colorações dos calos tornaram-se mais intensas com a idade. No final da incubação, verificou-se o surgimento de áreas necrosadas na parte basal dos calos de alfafa, batata e tomateiro. De acordo com Yeoman & Macleod (1977), esses sintomas são comuns na fase de envelhecimento de calos, e são devidos à morte progressiva das células envelhecidas, acúmulo de substâncias tóxicas e esgotamento dos nutrientes do meio de cultivo. Verificou-se que aos 40 dias de incubação, os calos obtidos de hipocótilo de puerária apresentaram o dobro do diâmetro observado em calos de radícula. Notou-se ainda, um aumento de áreas necrosadas e envelhecidas nos calos de radícula, indicando reduzida viabilidade nas condições de

**TABELA 1.** Início da formação (indução) de calos e aspectos visuais em diferentes espécies vegetais em meio MS. Médias de 7 repetições.

Período de Incubação (dias)	Puerária											
	Alfafa		Batata		Batata-doce		Hipocótulo		Radícula		Tomateiro	
	indução	coloração	indução	coloração	indução	coloração	indução	coloração	indução	coloração	indução	coloração
8	*	esbranquiçada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	esbranquiçada	*	esbranquiçada	-	-	*	amarelada	*	amarelada	*	esbranquiçada
22	+	amarelada	+	esbranquiçada	*	esbranquiçada	+	esverdeada	+	amarelada	+	esbranquiçada
30	+	amarelada	+	esbranquiçada	+	amarelada	+	esverdeada	+	esverdeada	+	esbranquiçada
40	+	amarelada	+	amarelada	+	amarelada	+	esverdeada	+	esverdeada	+	amarelada

- sem alteração

\* início da indução

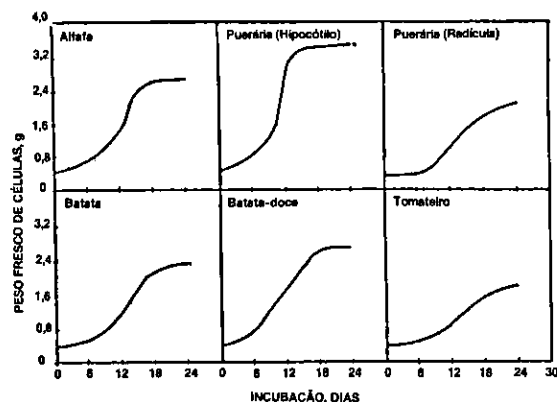
+ calos induzidos, presença de proliferação de células à superfície do propágulo.

cultivo adotadas. Além disso, os calos de radícula de puerária apresentaram aspecto mais rígido e compacto em relação aos calos de hipocótulo, sendo estes últimos caracterizados pela intensa proliferação de células e elevada friabilidade.

Após a repicagem para meio MS suplementado os calos apenas apresentaram diferenças em crescimento e vigor a partir de quinze dias de incubação, quando os calos obtidos de hipocótulo e radícula de puerária apresentaram maior crescimento em relação aos demais, que praticamente não diferiram entre si (Tabela 2). No entanto, os calos de hipocótulo apresentaram crescimento mais vigoroso, coloração esverdeada mais intensa, bastante friáveis e com pequeno número de partes necrosadas, comparativamente aos calos de radícula. Aos 22 dias, os calos de hipocótulo atingiram o dobro do diâmetro de calos de radícula. De acordo com Dixon (1985), esse crescimento mais lento de calos de radícula pode ser associado a características dos meios de cultivo utilizados, aspectos intrínsecos do explante e luminosidade. Quanto a esse último fator, tubos contendo calos de radícula, quando incubados no escuro, apresentaram crescimento mais lento e senescência mais rápida. Calos das demais espécies vegetais, apesar de terem apresentado crescimento inferior ao verificado para calos de hipocótulo de puerária, mostraram-se bastante friáveis e com prolife-

ração intensa de células na superfície. A coloração dos calos obtidos persistiu conforme descrito no período de indução, ou seja, amarelada na alfafa, batata, batata-doce e tomateiro e esverdeada na puerária.

As curvas de crescimento de suspensões de células das diferentes espécies vegetais, obtidas a partir dos calos induzidos, são apresentadas na Fig. 1. Baseando-se no modelo de curva característica de crescimento de células *in vitro*, proposto por Wilson et al. (1971), apenas as suspensões de células obtidas de calos de hipocótulo de alfafa, batata, batata-doce e



**FIG. 1.** Curvas de crescimento de suspensão de células de diferentes espécies vegetais em meio Murashige & Skoog (MS) suplementado.

puerária apresentaram comportamento característico. As demais suspensões de células apresentaram crescimento bastante inferior, com dilatação das fases log e exponencial. Esses períodos das fases de crescimento de suspensões de células das diferentes espécies vegetais, crescendo em meio MS suplementado, são apresentados na Tabela 3. Observa-se que suspensões de células de alfafa, batata-doce e puerária apresentaram crescimento mais favorecido, em relação às demais, sendo que o menor crescimento de suspensão de células de batata, radícula de puerária e tomateiro pode ser atribuído à qualidade dos calos de origem, à curta viabilidade no meio de cultivo utilizado e ao não atendimento de todas as exigên-

cias necessárias para a maximização de seu crescimento *in vitro*. No entanto, as condições de cultivo adotadas mostraram-se favoráveis às suspensões de células de alfafa, batata-doce e hipocótilo de puerária, que apresentaram coloração esverdeada, com células alongadas em intensa divisão, dispersas, e viabilidade em torno de 60 a 80%, avaliada pela redução do INT. Observou-se, porém, que a viabilidade das células, de forma geral, diminuiu a partir da fase de desaceleração de crescimento, sendo esse efeito mais notório em suspensão de células de tomateiro e radícula de puerária.

Apesar de os calos serem um tecido não diferenciado e crescerem como um grupo de células desorganizadas (Yeoman & Macleod

TABELA 2. Diâmetro médio (mm) de calos obtidos após repicagens, em diferentes épocas (dias) em meio MS. Médias de 7 repetições.

Incubação	Alfafa	Batata	Batata-doce	Puerária		Tomateiro
				Hipocótilo	Radícula	
8	3,45 ± 0,13*	3,50 ± 0,62	3,31 ± 0,75	3,28 ± 0,49	3,14 ± 0,38	3,10 ± 0,13
14	3,76 ± 0,30	3,70 ± 0,43	3,68 ± 0,17	5,43 ± 1,51	4,57 ± 0,53	3,80 ± 0,21
22	5,84 ± 0,45	7,72 ± 1,12	6,79 ± 0,89	10,86 ± 1,68	5,85 ± 0,90	6,95 ± 0,43
30	12,46 ± 1,12	13,50 ± 0,90	15,45 ± 0,12	16,43 ± 2,31	9,57 ± 1,13	11,20 ± 0,29

\* Desvio padrão da média.

TABELA 3. Período (dias) das fases<sup>1</sup> de crescimento de suspensões de células de diferentes espécies vegetais, em meio MS suplementado.

Fases	Alfafa	Batata	Batata-doce	Puerária		Tomateiro
				Hipocótilo	Radícula	
log	0-3	0-6	0-3	0-3	0-6	0-6
exponencial	3-9	6-12	3-9	3-9	6-12	6-12
linear	9-15	12-18	9-15	9-15	12-18	12-18
progressiva						
desaceleração	15-18	18-21	15-18	15-18	18-21	18-21
estacionária	18-24	21-24	18-24	18-24	21-24	21-24

<sup>1</sup> As diferentes fases foram caracterizadas com base na curva de crescimento de células, apresentada na Fig. 1, que seguiu modelo característico proposto por Wilson et al. (1971).

1977), estes podem apresentar metabolismo, composição bioquímica e exigências distintas em relação ao explante de origem. Segundo Phan et al. (1987), de forma geral, em plântulas obtidas *in vitro*, os açúcares solúveis e compostos fenólicos diminuem, enquanto os ácidos orgânicos e proteínas solúveis tendem a aumentar. Porém, calos obtidos desses explantes apresentam maior conteúdo de compostos fenólicos, ácidos orgânicos e açúcares reduzidos. Assim, essas características bioquímicas e metabólicas dos calos podem ter sido modificadas durante seu crescimento, influenciando conseqüentemente, as suspensões de células obtidas nas condições de meios de cultivo e incubação adotadas. Conforme os resultados apresentados, observa-se que o meio de cultivo utilizado, mostrou-se mais adequado para a obtenção de suspensão de células de hipocótilo de alfafa, batata-doce e puerária. Outras suplementações do meio MS ou mesmo alterações nas concentrações daquelas utilizadas, podem permitir melhor crescimento das outras suspensões de células *in vitro*.

### CONCLUSÕES

1. Calos friáveis de alfafa, batata, batata-doce, puerária e tomateiro, foram obtidos em meio MS suplementado com caseína hidrolizada, cinetina e 2,4-D.

2. Suspensões de células obtidas de calos de hipocótilo de alfafa, batata-doce e puerária, apresentaram crescimento mais rápido e abundante que daquelas obtidas de calos de hipocótilo de batata e tomateiro, e radícula de puerária, em meio MS suplementado.

3. Tanto calos, quanto suspensão de células obtidas de hipocótilo apresentaram crescimento mais rápido e abundante, e maior viabilidade do que aqueles obtidos de radícula de puerária.

### REFERÊNCIAS

- CARR, G.R.; HINKLEY, M.A.; LE TACON, F.; HEPPER, C.M.; JONES, M.G.K.; THOMAS, E. Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension - cultured plant cells. *The New Phytologist*, London, **101**: 417-26, 1985.
- DIXON, R.A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: ————. *Plant cell culture*. Oxford, IRL Press, 1985. p.1-20.
- ERIKSSON, T. Studies on the growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, **18**: 976-93, 1965.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; FUCK, C.E. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: THORPE, T.A. ed. *Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*. New York, Academic Press, 1981. p.45-114.
- GAMBORG, O.L. Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cell. *Can. J. Biochem.*, Ottawa, **44**:791-9, 1966.
- HENDERSON, J.H.M.; PHILLS, B.R.; WHARTLEY, B.T. Sweet potato. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., eds. *Handbook Plant Cell Culture*. New York, Macmillan, 1984. p.302-26.
- HILDEBRANDT, A.C.; RIKER, A.J.; DUGGAR, B.M. The influence of the composition of the medium on growth *in vitro* of excised tobacco and sunflower tissue cultures. *Am. J. Bot.*, Columbia, **33**:591-7, 1946.
- MAC DONALD, R.M. Cytochemical demonstration of catabolism in soil micro-organisms. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, **12**:419-23, 1980.
- MURASHIGE, T. Principles of rapid propagation. In: HUGHES, K.W.; HENKE, R.; CONSTANTIN, N. *Propagation of higher plants through tissue culture*. Washington, U.S.A. Dept. of Energy, Gout. Printing Office, 1980. p.14-24.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, **15**:473-97, 1962.
- NOZUE, M.; KAWAI, J.; YOSHITAMA, K. Selection of high anthocyanin - producing cell line of sweet potato cell cultures and identifica-

- tion of pigments p-hydroxybenzoic, caffeic and ferulic acids amongst pigments. **J. Plant Physiol**, Stuttgart, 129(1/2):81-8, 1987.
- PHAN, C.T.; DO, C.B.; HEGEDUS, P. Metabolic aspects of *in vitro* culture of plants; problems and applications comparison of soluble contents, marker enzymes between explant, callus and cell suspension culture. **Exp. Biol.**, 46(3):58, 1987.
- PHILLIPS, G.C. & COLLINS, G.B. Red clover and other forage legumes. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook plant cell culture**. New York, MacMillan, 1984. p.169-210.
- STREET, H.E. Cell (suspension) cultures: techniques. In: ———; ed. **Plant tissue and cell culture**. Berkeley, University of California, 1973. p.59-99.
- WILSON, S.B.; KING, P.J.; STREET, H.E. Studies on the growth in culture of plant cells. XII. A versatile system for the large scale batch or continuous culture of plant cell suspensions. **J. Exp. Bot.**, London 21:177-207, 1971.
- YEOMAN, M.M. & MACLEOD, A.J. Tissue (callus) cultures-techniques. In: STREET, H.E. ed. **Plant tissue and cell culture**. Berkeley, University of California, 1977. p.31-59.