

Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar⁽¹⁾

Eurico Eduardo Pinto de Lemos⁽²⁾, Micheline de Souza Ferreira⁽²⁾, Liduína Maria Calheiros de Alencar⁽²⁾
Cícero Eduardo Ramalho Neto⁽²⁾ e Marcondes Maurício de Albuquerque⁽³⁾

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura, de sacarose, manitol e sorbitol, como fontes de carbono e reguladores osmóticos, e do ácido abscísico, como regulador de crescimento na conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. Foram utilizadas, como material vegetal, gemas apicais de plantas de 10 meses de idade, do banco de germoplasma *in vivo*, da Universidade Federal de Alagoas. Brotos da quarta repicagem, no estágio de multiplicação *in vitro*, foram a fonte de explantes para três experimentos. Houve efeito positivo da diminuição da temperatura e da utilização da sacarose como fonte de carbono e regulador osmótico na manutenção da viabilidade dos explantes conservados *in vitro*. O ácido abscísico (1 mg/L) foi essencial para manter os explantes em crescimento mínimo por 12 meses (52 semanas). O uso das concentrações de 1 mg/L de ácido abscísico e de 20 g/L de sacarose associadas às condições de temperatura reduzida (15°C) demonstraram que os brotos permaneceram viáveis por um ano no mesmo meio de cultura, sem a necessidade de serem subcultivados.

Termos para indexação: *Saccharum*, explante, cultura de tecido, micropropagação, melhoramento de plantas.

In vitro conservation of sugarcane germplasm

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of temperature, of sucrose, sorbitol and manitol, as carbon source and osmotic regulator, and of abscisic acid, as growth regulator, on *in vitro* germplasm conservation of sugarcane. Stem tips of 10 month old plants collected from the sugarcane germplasm bank of the Universidade Federal de Alagoas in Brazil were introduced *in vitro* and secondary shoots were produced in a multiplication medium. New shoots collected after four subcultures were used in three conservation experiments. There was a positive effect of the low temperature and sucrose as an osmotic regulator and carbon source in maintaining the viability of the explants cultured *in vitro*. Abscisic acid (1 mg/L) was essential to maintain the explants in a reduced growth condition for 52 weeks without any subculture. The explants promptly returned to normal growth *in vitro* or were readily acclimatized after 52 weeks of conservation, in the medium with abscisic acid (1 mg/L) plus sucrose (20 g/L) at 15°C.

Index terms: *Saccharum*, explants, tissue culture, micropropagation, plant breeding.

Introdução

O melhoramento de plantas tem contribuído para o aumento da produção em diversas culturas comerciais de grande relevância em todo o mundo. A obtenção de variedades de alto rendimento e re-

sistência a pragas e doenças requer que os recursos genéticos desejáveis de determinada espécie encontrem-se disponíveis para sua utilização. Com isso, as coleções de germoplasma passam a ter papel fundamental nos programas de melhoramento (Silva et al., 1997).

A conservação das coleções de cana-de-açúcar é comercialmente feita mediante o cultivo de touceiras em campo. Os elevados custos de manutenção, os riscos de perda por intempéries, pragas e enfermidades, tornam o banco de germoplasma *in vitro* um meio bastante atrativo (Withers, 1991).

A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratório, a partir da técni-

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 15 de fevereiro de 2002.

⁽²⁾ Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, CEP 57072-970 Maceió, AL. E-mail: eepl@ceca.ufal.br, micheline.souza@bol.com.br, lijesus@uol.com.br, cem@ofm.com.br

⁽³⁾ Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros, Escritório de Pesquisa e Desenvolvimento de Rio Largo, Caixa Postal 2013, CEP 57061-960 Rio Largo, AL. E-mail: mma@uep.embrapa.al.gov.br

ca da cultura de tecidos (George, 1993). A manutenção dos recursos fitogenéticos se executa quando são feitas mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento das células e dos tecidos (Roca et al., 1991). O objetivo é aumentar ao máximo o período de subcultivo ou estendê-lo indefinidamente; dessa forma se reduz a mão-de-obra e o espaço necessários, além de proporcionar ao melhorista acesso imediato a todo o germoplasma da coleção (Roca et al., 1991; George, 1993).

No desenvolvimento desse método, dois procedimentos têm sido adotados: o crescimento lento – que envolve a depressão do metabolismo das plantas –, e o da supressão completa do crescimento por armazenamento em temperaturas ultra-baixas, a chamada criopreservação (Kantha, 1987; Primrose, 1987).

O crescimento lento tem sido utilizado com sucesso para conservar cultura de gemas de muitas espécies (Withers & Williams, 1990). De acordo com Malaurie et al. (1998), cerca de 20 espécies de inhame são conservadas no Institut de Recherche pour le Développement (IRD) sob condições de crescimento mínimo.

O método do crescimento lento consiste em reduzir o metabolismo da planta, aumentando ao máximo os intervalos de subcultivos ou estendendo-o indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plântulas. Na redução do metabolismo das plantas, têm-se utilizado como estratégia, modificações nas condições físicas (temperatura) ou químicas do meio de cultivo (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) (Roca et al., 1991).

Embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, os sucessos obtidos têm sido animadores, e será possível desenvolver um método adequado de crescimento lento para uma nova espécie que exija menos manipulação (Withers & Williams, 1998).

A baixa temperatura como alternativa para armazenamento *in vitro* de células e órgãos de plantas tem sido aplicada amplamente e com sucesso em kiwi (Monette, 1986), maçã, pêra, ameixa e cereja (Wilkins et al., 1988), uva, morango, batata (Dodds & Roberts, 1993), beterraba, batata-doce, mandioca, várias forrageiras (Souza, 1988), abacaxi (Zee & Munekata, 1992) e brócolis (Kubota et al., 1996).

Segundo Withers (1985), a maneira mais utilizada para retardar o crescimento é reduzir a temperatura de cultivo. Uma alternativa frequentemente usada em combinação com a redução da temperatura é a aplicação de reguladores osmóticos ao meio de cultivo. A combinação desses dois procedimentos e a incorporação de inibidores de crescimento ao meio de cultivo são caminhos possíveis para o desenvolvimento de protocolos de conservação *in vitro* em novas espécies.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver métodos para conservação, *in vitro*, de explantes de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

O material vegetal utilizado foi proveniente de plantas matrizes com 10 meses de idade, do banco de germoplasma *in vivo* da Estação de Floração e Cruzamento Serra do Ouro, da Universidade Federal de Alagoas (Ufal), Murici, AL. Ápices caulinares, palmitos com cerca de 50 mm de comprimento, foram, inicialmente, lavados em água corrente e com detergente comercial, por 2 a 3 minutos. Em seguida, foram submetidos a um processo de desinfestação com NaOCl comercial a 0,6% (v/v), por 30 minutos; enxágüe em água destilada e autoclavada, por três vezes; imersão em HgCl₂ a 0,02% (v/v), por 15 minutos, e novo enxágüe com água autoclavada, por três vezes.

Meristemas apicais envoltos com quatro primórdios foliares foram inseridos em tubo de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), semi-sólido e suplementado com cinetina - Kin (0,1 mg/L), ácido indolbútrico - AIB (0,002 mg/L), sacarose (20 g/L) e ágar (7 g/L). Passados 30 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para frascos (250 mL), contendo 25 mL do meio de cultura MS, líquido e suplementado com AIB (0,002 mg/L), benzilaminopurina - BAP (0,2 mg/L), ácido cítrico (150 mg/L) e sacarose (20 g/L). Os brotos foram subcultivados a cada 30 dias, por quatro vezes, neste meio de cultura. As condições de cultivo foram em ambiente com 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz fotossinteticamente ativa e fotoperíodo de 16 horas.

Foram avaliadas diferentes fontes de carbono, temperatura de ambiente e diferentes níveis de ácido abscísico (ABA), como inibidor de crescimento, no meio de cultura para a conservação *in vitro*, em três experimentos.

Experimento 1

Para estabelecer as condições favoráveis de cultivo mínimo, realizou-se um experimento combinando a tempera-

tura de 15°C e 25°C e o uso dos açúcares manitol, sorbitol e sacarose como fontes de carbono e reguladores osmóticos. Todos os tratamentos tiveram a mesma concentração osmótica inicial e consistiram de: 15°C com 20 g/L de sacarose; 15°C com 10 g/L de sacarose + 5 g/L de manitol; 15°C com 10 g/L de sacarose + 5 g/L de sorbitol; 25°C com 20 g/L de sacarose; 25°C com 10 g/L de sacarose + 5 g/L de manitol e 25°C com 10 g/L de sacarose + 5 g/L de sorbitol.

Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS, líquido e suplementado com AIB (0,002 mg/L), BAP (0,2 mg/L) e ácido cítrico (150 mg/L). O delineamento usado foi o inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento, sendo cada parcela representada por um frasco com dois brotos de cana-de-açúcar. Após três meses de inoculação, quantificou-se a viabilidade dos explantes a partir da seguinte escala de notas: 1: folhas totalmente verdes; 2: início do secamento e morte das folhas; 3: entre 30 e 50% das folhas e brotos mortos; 4: mais de 50% das folhas mortas e mais de dois brotos vivos; 5: folhas e brotos totalmente mortos. Para a análise estatística os dados das notas foram transformados em $x^{0.5}$ e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Experimento 2

Mediante os resultados obtidos no experimento descrito acima, realizou-se um segundo experimento para ajuste de temperatura e concentração de sacarose. Avaliou-se o efeito da combinação de três temperaturas (12°C, 15°C e 25°C) com três concentrações de sacarose (10, 20 e 40 g/L).

Os explantes foram cultivados no mesmo meio de cultura do experimento descrito acima. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, e 60 repetições por tratamento. Seis meses após o início do cultivo, foram atribuídas notas às plantas de acordo com a escala utilizada no experimento anterior. Para a análise estatística, os dados das notas foram transformados em $x^{0.5}$, e as médias dos tratamentos, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Experimento 3

Com base nos resultados dos dois experimentos anteriores, foram estabelecidas algumas condições necessárias para crescimento lento dos explantes. A temperatura de 15°C combinada com 20 g/L de sacarose favoreceu a viabilidade das plântulas por seis meses. Estas condições foram utilizadas neste experimento como controle na comparação com os resultados obtidos nos demais tratamentos descritos a seguir: controle + 0,5 mg/L de ácido abscísico;

controle + 1,0 mg/L de ácido abscísico; controle + 2,0 mg/L de ácido abscísico e controle + 4,0 mg/L de ácido abscísico.

Os explantes foram cultivados no mesmo meio de cultura do experimento descrito acima. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento. Doze meses após o início do cultivo, avaliou-se a viabilidade dos explantes, de acordo com a escala de notas utilizada nos experimentos anteriores. Para a análise estatística, os dados das notas foram transformados em $x^{0.5}$, e as médias dos tratamentos foram comparadas com o controle através do teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Os açúcares utilizados como reguladores osmóticos e fonte de carbono tiveram influência significativa na viabilidade dos explantes (Tabela 1). O tratamento com sacarose (20 g/L) resultou em notas mais baixas do que aqueles que utilizaram sacarose combinada com manitol ou sorbitol como fontes de carbono. Notas mais baixas significam a

Tabela 1. Efeito de sacarose e reguladores osmóticos sorbitol e manitol, temperatura, concentração de sacarose e de ácido abscísico na viabilidade das plântulas de cana-de-açúcar após diferentes períodos sob conservação *in vitro*. Média de 15 repetições.

Tratamento	Viabilidade (Notas de 1 a 5) ⁽¹⁾
Sacarose + reg. osmóticos (g/L)	Após 3 meses ⁽²⁾
Sacarose (20)	2,13a
Sacarose (10) + sorbitol (5)	2,23b
Sacarose (10) + manitol (5)	2,23b
Temperatura (°C)	Após 6 meses ⁽²⁾
12	2,16b
15	2,02a
25	2,12b
Sacarose (g/L)	Após 6 meses ⁽²⁾
10	2,03a
20	2,05a
40	2,23b
Ácido abscísico (mg/L)	Após 12 meses ⁽³⁾
0,0	2,13b
0,5	2,12b
1,0	1,89a
2,0	2,03b
4,0	2,03b

⁽¹⁾Dados transformados em $x^{0.5}$, onde x é a nota, variando de 1 (folhas totalmente verdes) a 5 (folhas e brotos totalmente mortos). ⁽²⁾Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ⁽³⁾Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

manutenção da viabilidade dos explantes em crescimento lento por mais tempo. Este fato pode ser explicado pela possibilidade da cana-de-açúcar não possuir mecanismos necessários para metabolizar os açúcares álcoois (sorbitol ou manitol), ao contrário de algumas espécies de Rosáceas (Coffin et al., 1976) e tenha utilizado toda a sacarose para produzir energia necessária ao seu desenvolvimento. Com isso, os explantes provenientes dos tratamentos com menos sacarose (10 g/L) combinada com manitol ou sorbitol consumiram as reservas do meio mais rapidamente, apresentando, assim, menor desenvolvimento e interferindo na sua viabilidade. Outra possibilidade seria o efeito tóxico do sorbitol e manitol no cultivo de cana-de-açúcar. Efeitos nocivos ou de crescimento nulo do manitol foram descritos por Lemos & Baker (1998) em internós de *Annona muricata* cultivados *in vitro*.

As combinações da temperatura com reguladores osmóticos/fontes de carbono influenciaram significativamente na manutenção da viabilidade dos explantes conservados *in vitro* por três meses (Tabela 2). Os explantes do tratamento com apenas sacarose (20 g/L), independentemente da temperatura, apresentaram maior viabilidade do que os explantes dos tratamentos onde se misturou sacarose (10 g/L) com sorbitol (5 g/L) ou manitol (5 g/L). Esses resultados sugeriram ser possível aumentar significativamente o tempo de conservação de plantas de cana-de-açúcar *in vitro*, ajustando-se a temperatura e os níveis de sacarose.

Os resultados do segundo experimento mostraram que uma leve redução na temperatura para 15°C foi de fundamental importância para a conservação e

viabilidade dos explantes (Tabela 1). Temperaturas mais baixas (12°C) ou mais altas (25°C) promoveram amarelecimento e morte dos explantes, parecendo serem inadequadas para manter a viabilidade dos explantes. A cana-de-açúcar é, reconhecidamente, uma planta tropical de metabolismo C4, que cresce bem em temperaturas acima de 25°C. Withers (1991) sugere a redução da temperatura entre 15 e 25°C para culturas de clima tropical quando o objetivo é diminuir o crescimento dos explantes cultivados *in vitro*.

O uso de temperaturas mais baixas no cultivo *in vitro* reduz a ação de enzimas e do metabolismo geral das plantas. Neste experimento, a redução da temperatura de 25°C para 15°C provocou crescimento mais lento dos explantes sem, contudo, provocar-lhes danos fisiológicos.

Withers (1985) sugere a redução da temperatura de crescimento como primeiro fator limitante a ser testado. Todavia, para cada espécie estudada existe um limite que reduz o crescimento sem provocar danos. No presente trabalho, a temperatura de 12°C reduziu o crescimento e a viabilidade dos explantes significativamente (Tabela 1).

Sandoval & Müller (1989) relataram que a temperatura de 5°C causou morte nos ápices de banana conservados *in vitro*. No entanto, quando a temperatura foi aumentada para 15°C, foi possível conservar os explantes durante 13 a 17 meses.

No presente trabalho, as concentrações mais baixas de sacarose (10 e 20 g/L) no meio de cultura limitaram o crescimento dos explantes, mas mantiveram as melhores viabilidades e as menores porcentagens de oxidação dos meios, proporcionando, assim, maior longevidade dos explantes (Tabela 1). Por outro lado, o tratamento com 40 g/L de sacarose apresentou alta porcentagem de oxidação do meio de cultura e a manutenção da viabilidade dos explantes foi significativamente reduzida.

Fossard et al. (1978) constataram que altas concentrações de sacarose induziram oxidação e problemas de excessivo potencial osmótico do meio, o que levou a uma deterioração das culturas.

Os tratamentos nos quais se combinou temperatura de 15°C com 10 g/L ou 20 g/L de sacarose resultaram em notas mais baixas que os demais (Tabela 3). Assim, os melhores resultados foram obtidos nas temperaturas mais baixas quando estas foram com-

Tabela 2. Efeito da combinação de sacarose e reguladores osmóticos com duas temperaturas na conservação *in vitro* de microplantas de cana-de-açúcar após três meses de cultivo. Média de 15 repetições⁽¹⁾.

Sacarose + reguladores osmóticos	Temperatura	
	15°C	25°C
Sacarose (20 g/L)	2,16a	2,11a
Sacarose (10 g/L) + sorbitol (5 g/L)	2,23b	2,23b
Sacarose (10 g/L) + manitol (5 g/L)	2,23b	2,23b

⁽¹⁾Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; dados transformados em $x^{0,5}$, onde x é a nota, variando de 1 (folhas totalmente verdes) a 5 (folhas e brotos totalmente mortos).

binadas com níveis mais baixos de sacarose. O aumento conjunto da temperatura e da concentração de sacarose prejudicou a sobrevivência dos explantes, o que demonstra que, sob temperatura mais alta (25°C), a sacarose foi rapidamente absorvida, traduzindo-se em rápido aumento da massa foliar e conseqüente senescência das microplantas.

Em condições-padrões de cultivo (25°C e 20 g/L de sacarose), os explantes sobrevivem por, no máximo, três meses, sem a necessidade de subcultivo. Os resultados mostraram que foi possível prolongar este prazo para seis meses, utilizando o tratamento no qual se combinou 15°C com 20 g/L de sacarose, mantendo a viabilidade das microplantas para a retomada do crescimento e início de um novo ciclo de micropropagação.

No terceiro experimento, as concentrações de ácido abscísico (AAb) inferiores ou superiores a 1 mg/L favoreceram o crescimento dos explantes de cana-de-açúcar, apresentando as maiores notas e os mesmos resultados que a testemunha (Tabela 1). A suplementação de 1 mg/L de AAb ao meio de cultivo proporcionou a maior longevidade observada dos explantes, apresentando a menor nota. O AAb na concentração de 1 mg/L inibiu o crescimento dos explantes sem reduzir-lhes a viabilidade. Nesta condição foi possível cultivar os explantes de cana sem subcultivá-los por 12 meses, e manter a capacidade de recuperação dos explantes após serem subcultivados. Este efeito não foi observado nas concentrações de AAb mais baixas (0,0 e 0,5 mg/L) ou mais altas (2,0 e 4,0 mg/L). Ao contrário, todos estes tratamentos produziram notas mais elevadas (menor

viabilidade) levando os explantes mais rapidamente à senescência.

Dependendo dos fatores que interferem na atuação do ácido abscísico esse regulador do crescimento pode estimular ou inibir o crescimento vegetal. Em *Ipomoea*, o AAb na concentração de 1 mg/L resultou em efeito inibidor no crescimento de calos (Davies, 1990).

As respostas obtidas com a adição do AAb ao meio de cultura são as mais diversas e dependem da espécie em questão, da sua concentração e da relação entre os diferentes reguladores de crescimento aplicados (Fosket, 1994).

Neste experimento, observou-se uma redução no metabolismo normal das plantas cultivadas *in vitro*, a qual foi medida pela paralisação do crescimento e morte dos explantes. Em condições padrões de cultivo as plantas crescem rapidamente e consomem a maior parte dos nutrientes do meio em cerca de quatro semanas, e é necessário uma repicagem dos explantes com a renovação do meio. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o período de conservação foi ampliado para 12 meses. Após este período os explantes se apresentaram viáveis e disponíveis para retornar às condições normais de multiplicação *in vitro* ou ser aclimatados *in vivo*.

Conclusões

1. É possível conservar sob crescimento lento por 12 meses microplantas de cana-de-açúcar em meio de cultura MS enriquecido com 1 mg/L de ácido abscísico e mantidas sob temperatura de 15°C.

2. A retomada do crescimento das microplantas após 12 meses sob crescimento lento é viabilizada quando se estabelece novamente as condições normais de cultivo.

Referências

COFFIN, R.; TAPER, C. D.; CHONG, C. Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 547-551, 1976.

DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1990. 681 p.

Tabela 3. Efeito da combinação de concentrações de sacarose com três temperaturas na conservação *in vitro* de microplantas de cana-de-açúcar após seis meses de cultivo. Média de 60 repetições⁽¹⁾.

Sacarose (g/L)	Temperatura		
	12°C	15°C	25°C
10	2,04c	1,93a	2,13d
20	2,23e	1,94ab	2,00bc
40	2,23e	2,23e	2,22e

⁽¹⁾Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; dados transformados em $x^{0,5}$, onde x é a nota, variando de 1 (folhas totalmente verdes) a 5 (folhas e brotos totalmente mortos).

- DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2. ed. Cambridge, Estados Unidos: Cambridge University Press, 1993. p. 172-179.
- FOSKET, D. E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic, 1994. 580 p.
- FOSSARD, R. A. de; BENNETT, M. T.; GORST, J. R.; BOURNE, R. A. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. **Combined Proceedings of Annual Meetings of the International Plant Propagators' Society**, Seattle, v. 28, p. 427-435, 1978.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. London: Exegetics, 1993. v. 1.
- KARTHA, K. K. Advances in the cryopreservation technology of plant cells and organs. In: ALLEN, N. S. (Ed.). **Plant biology**. New York: Alan R. Liss, 1987. v. 3, p. 447-458.
- KUBOTA, C.; RAJAPAKSE, N. C.; YOUNG, R. E. Low-temperature storage of micropropagated plantlets under selected light environments. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 3, p. 449-452, 1996.
- LEMONS, E. E. P.; BAKER, D. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Ammonia muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 25, p. 105-112, 1998.
- MALAUURIE, B.; TROUSLOT, M. F.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; DUBERN, J. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, Chile, v. 1, n. 3. Disponível em: <http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/3/index.html>. Acesso em: 15 dez. 1998.
- MONETTE, P. L. Cold storage kiwifruit shoot tips *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1203-1205, 1986.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 437-497, 1962.
- PRIMROSE, S. B. **Modern biotechnology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. 176 p.
- ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697-712.
- SANDOVAL, J.; MÜLLER, L. Consideraciones sobre la conservación *in vitro* de musaceas: posibilidades y limitaciones. **Asbana**, Turrialba, v. 13, n. 31, p. 21-24, 1989.
- SILVA, S. O.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; SOUZA, A. S.; CARNEIRO, M. S. Germoplasma. In: ALVES, E. J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa-CNPMP, 1997. p. 61-84.
- SOUZA, E. L. S. Conservação de germoplasma *in vitro*. In: ARAÚJO, S. M. C.; OSUNA, J. A. (Ed.). In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Unesp, 1988. p. 96-101.
- WILKINS, C. P.; NEWBURY, H. J.; DODDS, J. H. Tissue culture conservation of fruit trees. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 1, n. 73/74, p. 9-20, 1988.
- WITHERS, L. A. Cryopreservation and storage of germplasm. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: Irl Press, 1985. p. 169-191.
- WITHERS, L. A. *In vitro* conservation. In: HAWKES, J. G. (Ed.). **Genetic conservation of world crop plants**. San Diego: Academic, 1991. p. 31-42.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p. 297-330.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Germplasm conservation *in vitro* and cryopreservation. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1990. p. 267-286.
- ZEE, F. T.; MUNEKATA, M. *In vitro* storage of pineapple (*Ananas* spp.) germplasm. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 1, p. 57-58, 1992.