

ONTOGÊNESE DAS BROTAÇÕES ADVENTÍCIAS DE *CITRUS SINENSIS* (LINN.) OSBECK CV. PÊRA, CULTIVADAS *IN VITRO* SEGUNDO OS TIPOS UTILIZADOS DE EXPLANTES¹

MARIA OLIVIA M. SIMÕES², ELDO A.M. SILVA³ e SILVIO L. TEIXEIRA⁴

RESUMO - Cinco tipos de explante foram isolados de segmentos internodais de ramos de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra, e cultivadas *in vitro*, com a finalidade de observar a origem do calejamento e das gemas formadas. Os cinco tipos de explante isolados foram: a) "internódio completo", b) "lâmina epidérmica" (epiderme com algumas camadas de células corticais), c) "casca" (epiderme, córtex, floema e parte da faixa cambial, d) "cilindro central" (parte da faixa cambial, xilema e medula), e) "rejunção da "casca" com o "cilindro central". O "internódio completo", a "casca" e a "rejunção" iniciaram o calejamento a partir da faixa cambial. Na "lâmina epidérmica" e no cilindro central", o desenvolvimento do calo deu-se por desdiferenciação de tecidos maduros, respectivamente das células do córtex e dos raios xilemáticos. A análise citológica revelou grande acúmulo de grãos de amido anteriormente à formação dos primórdios no calo. A "casca" foi a região que apresentou menor contaminação, calejamento mais rápido e maior número de gemas e brotações.

Termos para indexação: cultura de tecido, casca, lâmina epidérmica, cilindro central, segmento internodal, regiões isoladas.

ONTOGENY OF ADVENTITIOUS SHOOTS OF *CITRUS SINENSIS* (LINN.) OSBECK CV. PÊRA CULTIVATED *IN VITRO* ACCORDING TO THE TYPE OF EXPLANT USED

ABSTRACT - Five regions were isolated from *Citrus sinensis* (Linn) Osbeck cv. Pêra branch internode segments and cultivated *in vitro*, to study the origin and development of callus and stem primordium. The isolated explants were: a) "complete internode"; b) "epidermal layer (epidermis and a few cortical cells); c) "bark" (epidermis, cortex, phloem and external cambial zone layers); d) "central cylinder" (internal cambial layers, xylem and pith); and e) "rejoining" (rejoining of bark with central cylinder). "Complete internode", "bark" and "rejoining" initiated callus formation from the cambial zone. In the "epidermal layer" and "central cylinder" the callus development occurred by the reversal of differentiation of mature tissues, respectively from the cortical cells and xylem ray cells. Cytological observations showed much starch storage before primordium formation in the callus. "Bark" was the region that showed lesser contamination, faster callus formation and a greater number of primordia and shoots than the other isolated regions.

Index terms: tissue culture, bark, epidermal layer, central cylinder, internodal segments, isolated regions.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vem despontando como método altamente vantajoso para a propa-

gação de plantas e tem sido potente ferramenta para a pesquisa. A cultura de tecido permite a demonstração da potencialidade total das células vegetais, possibilita investigar processos morfológicos, a influência de tecidos isolados sobre o desenvolvimento de órgãos, e diversos estudos dos efeitos reguladores de crescimento e estudos citogenéticos. No entanto, o mais relevante vem sendo o aumento e sua utilidade econômica nas práticas agrícolas.

¹ Aceito para publicação em 16 de novembro de 1990.

² Bióloga, Dep. de Biol. Vegetal, Univ. Fed. de Viçosa (UFV), CEP 36570 Viçosa, MG.

³ Biólogo, Dep. de Biol. Vegetal, UFV.

⁴ Eng. - Agr., Dep. de Fitotecnia, UFV.

Na citricultura, a cultura de tecidos vem desempenhando um papel importante. O estudo das inter-relações planta/patógeno está sendo altamente facilitado pela cultura de meristemas apicais, que, devido a ausência de vascularização, possibilita a obtenção de plantas ausentes de colonização virótica.

Segmentos internodais de ramos de diversas espécies de plantas vêm sendo largamente utilizadas em estudos de controle hormonal da regeneração de órgãos e, conseqüentemente, como forma de propagação vegetativa *in vitro* (Skoog & Tsui 1948, Miller & Skoog 1953).

Vários trabalhos, com diferentes espécies de citros, foram desenvolvidos com segmentos internodais (Chaturvedi & Mitra 1974, Chaturvedi et al. 1974, Grimblat 1972), buscando a obtenção de calo e gemas em diferentes meios de cultura (Bhansali & Arya 1979, Edriss & Burger 1984, Moore 1986). A totipotencialidade é, provavelmente, característica de todas as células vegetais, mas a sua expressão está limitada a células com características meristemáticas. O sucesso de desenvolvimento *in vitro* depende da escolha apropriada do explante (tipo, tamanho, idade, época do ano, condições gerais da planta e posição) (Cheng 1975, Murashige 1978). Assim, por exemplo, é comum ser observado, ao longo de um ramo, do qual são retirados explantes para cultivo *in vitro*, um gradiente na capacidade regenerativa, devido a diferenças anatômicas e ao acúmulo de promotores e inibidores (Burger & Hackett 1986, Zieslin et al. 1976).

Técnicas de cultura de camada fina, composta de epiderme e algumas poucas camadas de células subepidérmicas, foram desenvolvidas para minimizar os efeitos correlativos dos tecidos adjacentes (Tran Thanh Van & Chlyah 1976, Tran Thanh Van & Dien 1975, Tran Thanh Van & Trinh 1978). Tais técnicas permitem também a regeneração de órgãos a partir de explantes que, como um todo, são incapazes de fazê-lo (Belkey & Cocking 1981, Tran Thanh Van 1973a). O propósito desse experimento foi acompanhar o desenvolvimento de gemas adventícias sobre tecidos

isolados de internódios de ramos juvenis de laranja-pêra *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes utilizados foram retirados de plantas de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra, obtidas de sementes. As plantas com um ano de idade, até então mantidas em estufim no viveiro, sofreram poda drástica, permanecendo apenas o caule principal com 20 centímetros de altura e 5 mm de diâmetro. Para forçar o desenvolvimento rápido das brotações, as plantas foram adubadas com o dobro da concentração normal de nitrogênio e regadas diariamente, molhando-se apenas o substrato. A primeira coleta de ramos para obtenção de explantes foi feita após um período de cinco semanas, quando esses apresentaram comprimento variando de 15 a 30 cm e diâmetro entre 3 e 5 mm, com 20 internódios, em média, de 0,5 a 4,0 cm de comprimento. Foram cortados na base, desfolhados e limpos com álcool etílico 70% e mantidos em água desionizada, para evitar a desidratação dos tecidos.

Com o intuito de acompanhar o desenvolvimento de gemas adventícias sobre tecidos isolados de internódios de ramos juvenis de laranja-pêra *in vitro*, cinco explantes diferentes foram estudados: a) "internódio completo", composto de um segmento internodal de 1,0 cm, apenas dividido longitudinalmente; b) "lâmina epidérmica", composta da epiderme e aproximadamente dez camadas de células corticais; c) "casca", composta da epiderme, córtex, floema e parte do câmbio; d) "cilindro central", composto de parte do câmbio, xilema e medula; e e) "rejunção", obtido da rejunção da "casca" e "cilindro central". Foram utilizados o quarto, quinto e sexto internódios, contando-se a partir do ápice. Como primeiro internódio foi considerado aquele facilmente distinguível a olho nu, abaixo da região apical. Os internódios foram cortados em segmentos de 1 cm, ficando imersos em água desionizada durante o período de preparação.

Os internódios sofreram desinfestação por imersão em álcool etílico 70% por 5 min., seguido de lavagem com água desionizada e autoclavada, imersão em hipoclorito de sódio a 2% com Tween 20 (duas gotas em 100 ml), por 15 min. e submetidos a três lavagens com água desionizada e autoclavada. As operações de inoculação foram feitas em câmara de fluxo laminar.

Com explantes de cada tipo foram inoculados, com o corte voltado para cima, em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, cobertos com tampas de polipropileno, contendo 20 ml de meio de cultura e mantidos durante quatro semanas no escuro e quatro sob regime luminoso de dezesseis horas de luz e oito horas de escuro, sob intensidade luminosa de 1.000 Lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes, e temperatura média de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A partir do primeiro dia de cultivo foram coletados dois explantes de cada tecido, de dois em dois dias, e fixados em solução FAA 50%, desidratados em uma série alcoólica progressiva e emblocados em parafina, seccionados, com 10 μm de espessura, em micrótomo rotativo. Os cortes foram coloridos com hematoxilina para regiões sem xilema e safranina e verde rápido para regiões com tecidos xilemáticos, montados em bálsamo do Canadá (Johansen 1940), observados e fotografados em fotomicroscópio de luz polarizada.

O meio utilizado para cultivo dos internódios compunha-se de sais de MS (Murashige & Skoog 1962), das vitaminas: 0,5 mg/l de piridoxina, 0,4 mg/l de tiamina-HCL e 0,5 mg/l de ácido nicotínico, de 2,0 mg/l de glicina, de 100 mg/l de i-inositol, de 30 g/l de sacarose, de 500 mg/l de extrato de malte, de 0,3 mg/l de 6-benzilamino purina (BAP) e de 5 g/l de ágar Merck. O pH foi corrigido para $5,7 \pm 0,1$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No corte transversal do "internódio completo", no primeiro dia (Fig. 1A), antes de sofrer qualquer desenvolvimento, observou-se, externamente, a epiderme composta de uma camada de células isodiamétricas, com paredes externas mais espessas e cutinizadas, tricomas simples e longos, unisseriados e estômatos ocasionais. Internamente à epiderme, observou-se o córtex composto de faixas de células de dois tamanhos diferentes. A faixa mais externa era formada por cinco a seis camadas ricas em cloroplastídios. Algumas células apresentavam cristais de oxalato de cálcio, tipo drusa. Nas camadas mais internas dessa faixa de células, estavam presentes bolsas secretoras de óleo. As bolsas eram compostas de células epiteliais de maior tamanho, dispostas radialmente ao centro da cavidade. A faixa mais in-

terna do córtex, formada por cinco a seis camadas de células maiores, apresentava menor quantidade de cloroplastídios.

Pequenos espaços intercelulares foram observados entre as células do córtex. Neste estágio de desenvolvimento, o caule apresentou início do crescimento secundário, caracterizado pela disposição circular do floema e xilema secundários. A primeira camada do cilindro central era formada por células do floema primário, que exibia externamente fibras floemáticas. Internamente, situava-se o floema secundário recém-diferenciado.

A faixa cambial estava situada entre a margem interna do floema e a externa do xilema. O xilema secundário, diferenciado internamente ao câmbio, era composto de vasos com paredes lignificadas, de grande diâmetro e células parenquimáticas. Internamente às células recém-diferenciadas do xilema secundário estavam as células do xilema primário, situadas mais internamente, próximas à medula, e as do metaxilema, situadas mais externamente, próximo ao xilema secundário. O xilema envolvia uma região medular, composta de células parenquimáticas grandes e de paredes primárias delgadas com espaços intercelulares entre si.

No quinto dia (Fig. 1B), pôde-se observar o início do desenvolvimento do calo, a partir da região cambial. As células cambiais e derivativas imediatas, pouco diferenciadas e com alta capacidade de divisão, aumentaram em tamanho e número, desenvolvendo-se uma faixa de células, regularmente dispostas uma ao lado da outra em camadas sucessivas, entre o floema e o xilema. As células das bolsas secretoras de óleo aumentaram em número, por divisões periclinais, formando duas e três camadas concêntricas. No vigésimo quarto dia, (Fig. 1C), observaram-se primórdios na periferia do calo.

A "lâmina epidérmica", sem qualquer desenvolvimento (Fig. 1D), compunha-se da epiderme e da parte mais externa do córtex, constituída de todas as células menores, mais clorofiladas, e de algumas células mais internas, que são maiores e menos clorofiladas.

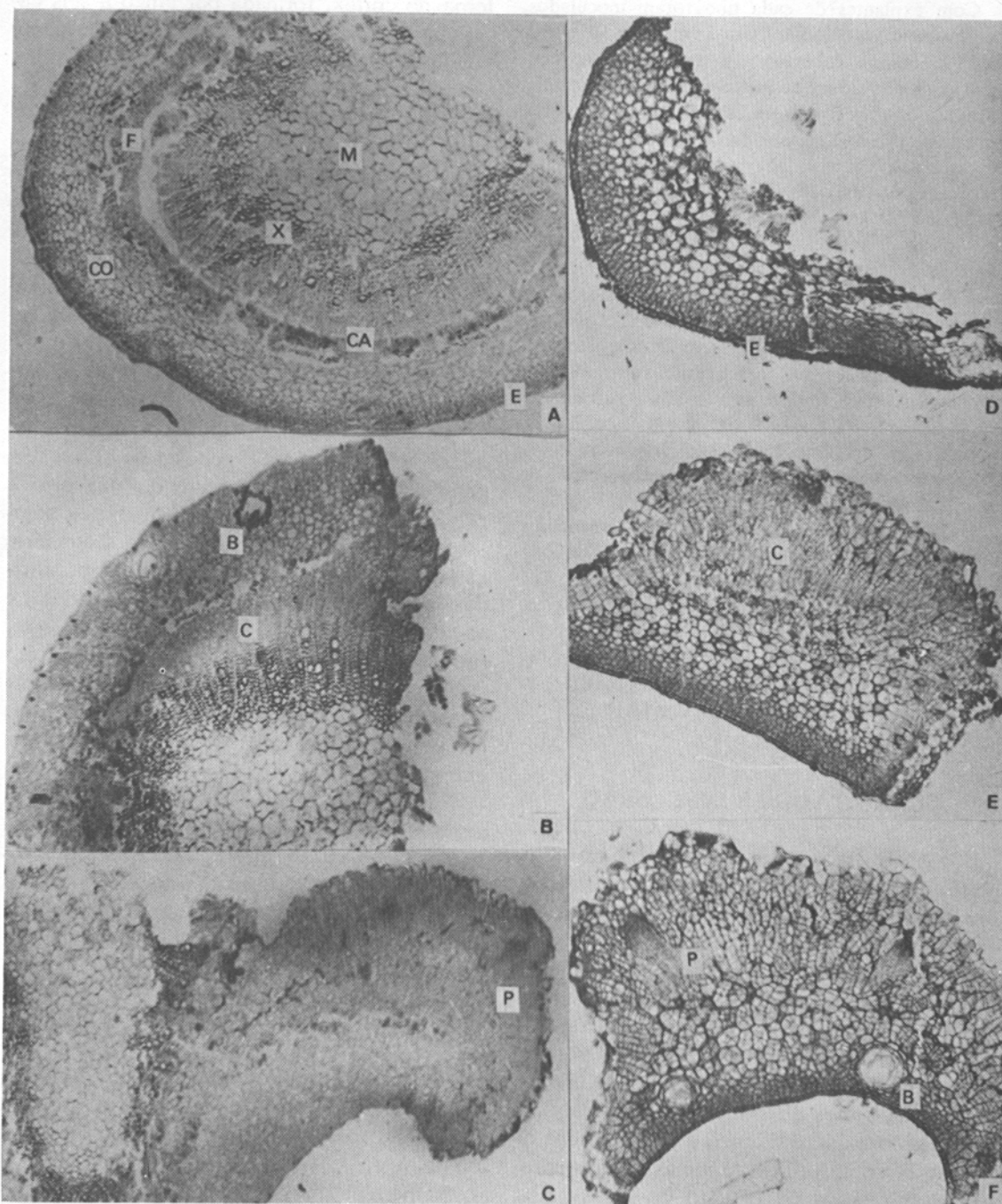


FIG. 1. Cortes transversais da região "internódio completo"; A. sem nenhum desenvolvimento (200X); B. início do calejamento a partir das células cambiais (190X); C. primórdio de gema desenvolvido no calo (170X), - Cortes transversais da região da "lâmina epidérmica"; D. sem nenhum calejamento (482X); E. início do calejamento (328X); F. primórdios desenvolvidos no calo (318X); B = bolsa de óleo, C = calo, CA = região cambial, CO = córtex, E = epiderme, F = floema, M = medula, X = xilema, P = primórdio.

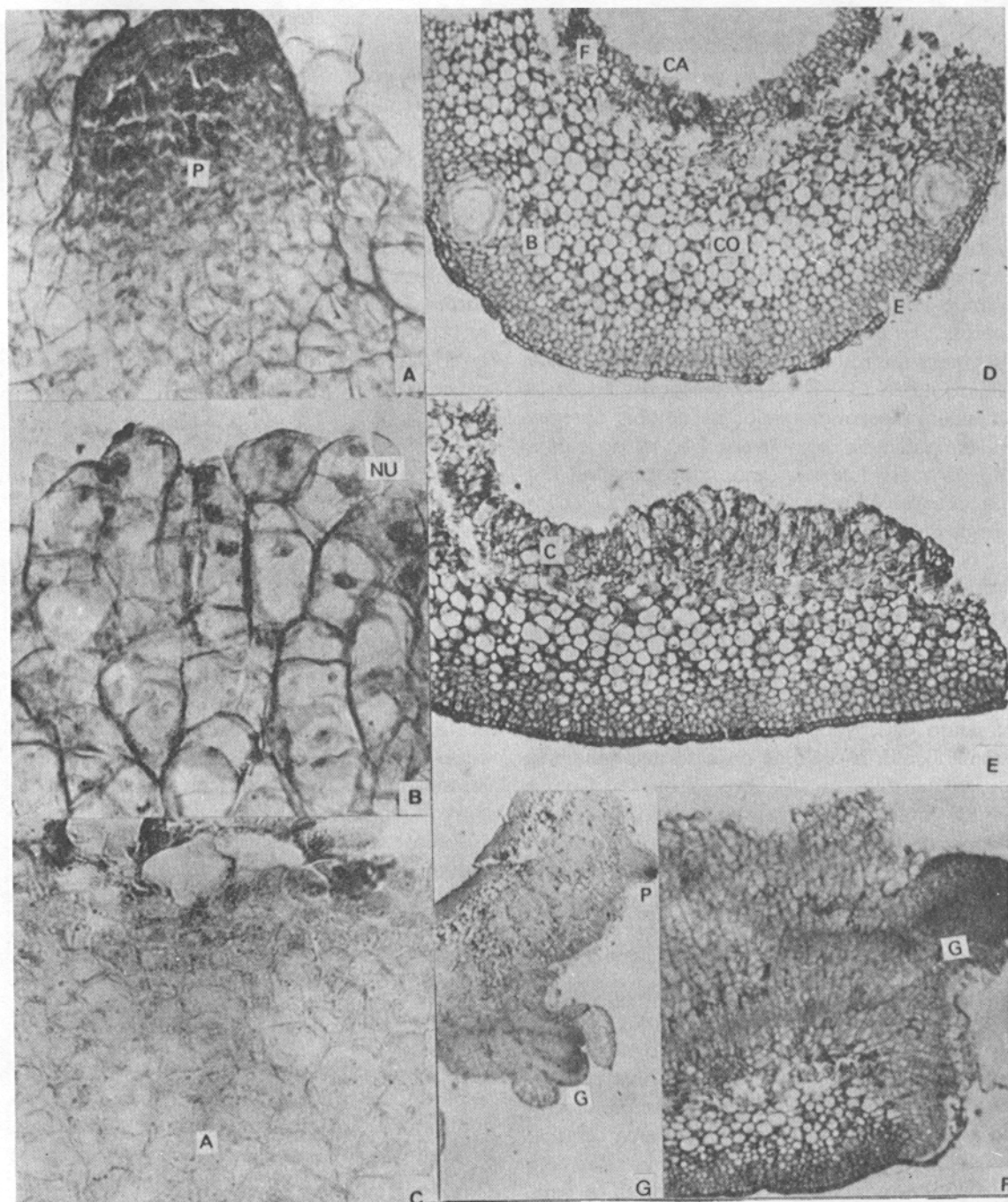


FIG. 2. Aspectos citológicos da região periférica do calejamento da "lâmina epidérmica"; A. primórdio em desenvolvimento (887X); B(1700X) e C(1050X). - Cortes transversais da região da casca; D. sem início de desenvolvimento (414X); E. início do calejamento (450X); F. gemma desenvolvida no calo (296X); G. primórdio desenvolvido no calo (150X); P = primórdio; NU = células da periferia do calo em divisão; B = bolsa de óleo, CA = região cambial, E = epiderme.

Não estavam presentes células do floema ou células cambiais.

O desenvolvimento do calo deu-se por rediferenciação de células do córtex, ao contrário do "internódio completo", cujo calo originou-se das células indiferenciadas da região cambial. O calejamento, que se iniciou em torno do quarto dia (Fig. 1E), era constituído de várias camadas de células de formato achatado, sobrepostas. A seguir, desenvolveu-se um calejamento desorganizado, com as células dispondo-se aleatoriamente umas em relação às outras. Ao décimo quinto dia, foi possível observar primórdios partindo da periferia do calejamento (Fig. 1F e 2A). Nesta região de calejamento desorganizado, as células apresentavam tamanho bem maior que as do calejamento mais interno, tendo sido possível evidenciar-se núcleos em divisão (Fig. 2B) e grãos de amido (Fig. 2C).

A "casca" era constituída da epiderme, córtex, fibras floemáticas, floema e células cambiais (Fig. 2D).

O calejamento iniciou-se em torno do terceiro dia, a partir das células cambiais (Fig. 2E), seguindo o mesmo padrão de desenvolvimento observado nos explantes anteriores. Inicialmente, as células do calo dispunham-se ordenadamente umas sobre as outras. Com a rápida multiplicação celular, o calo foi se tornando desorganizado, com as células maiores e menos unidas umas às outras, dando aspecto exterior friável ao calo, o que também foi observado por Chaturvedi et al. (1974) em internódios de calamondin (*Citrus* sp.).

No quinto dia, com o auxílio de microscópio de luz polarizada, foram vistos elementos do xilema em diferenciação logo abaixo do grupo de células, que viriam a formar primórdios. Alguns elementos de vaso posicionavam-se paralelamente à direção do xilema original do internódio. Outros elementos já assumiam posição transversal ao xilema original, ou seja, desenvolvendo-se na mesma direção de crescimento do primórdio.

Primórdios desenvolvidos puderam ser observados ao sétimo dia, nas bordas do caleja-

mento (Fig. 2F e 2G), com vascularização evidente já caracterizando um feixe vascular.

Na "casca" os primórdios desenvolveram-se mais cedo do que nos outros explantes e ocorreram em número bem maior. O "cilindro central" era constituído de células cambiais, xilema e medula (Fig. 3A).

O calejamento no "cilindro central" iniciou-se no quinto dia (Fig. 3B), a partir das células dos raios medulares, e depois recobriu todo o explante, assumindo desde o início forma desorganizada. No nono dia observou-se um primórdio na periferia do calejamento já bem desenvolvido (Fig. 3C), que seguiu os mesmos padrões descritos para os explantes anteriores.

O explante de "rejunção" compunha-se de todos os tecidos do internódio completo, com a particularidade de ter sido separada a "casca" do "cilindro central", e novamente reunida, apenas tocando-se em alguns pontos (Fig. 3D).

No quinto dia, o calejamento iniciou-se na região cambial, partindo tanto do interior do córtex quanto do exterior do xilema (Fig. 3E). Observou-se que o desenvolvimento foi mais acelerado em regiões onde ocorreu contato entre a "casca" e o "cilindro central". A Fig. 3F mostra um aspecto do calejamento bem desenvolvido. Os primórdios que surgiram no 17º dia seguiram o mesmo padrão de desenvolvimento dos outros explantes.

O desenvolvimento do calejamento nos explantes dos tipos "internódio completo", "casca" e "rejunção", que possuíam câmbio, iniciou-se a partir desse meristema, concordando com o que foi observado anteriormente por Grimblat (1972) em calamondin.

O "cilindro central" iniciou o calejamento a partir de células dos raios medulares, ao contrário do que foi observado por Nickerson & Hall (1976) em *Vaccinium angustifolium* Alt., onde as células do parênquima medular apresentaram centros de atividades meristemática.

O calejamento da "lâmina epidérmica" foi consequência da rediferenciação das células do parênquima cortical, o mesmo tendo ocor-

rido com *Bryophyllum draigemotianum* Berger (Bigot 1976), enquanto em *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) Dc. var. *TP_{ts}* (Trinh et al. 1981) e em fumo (Tran

Thanh Van 1973b) a regeneração de gemas adventícias ocorreu diretamente a partir da divisão das células sub-epidérmicas, sem formação prévia de calo.

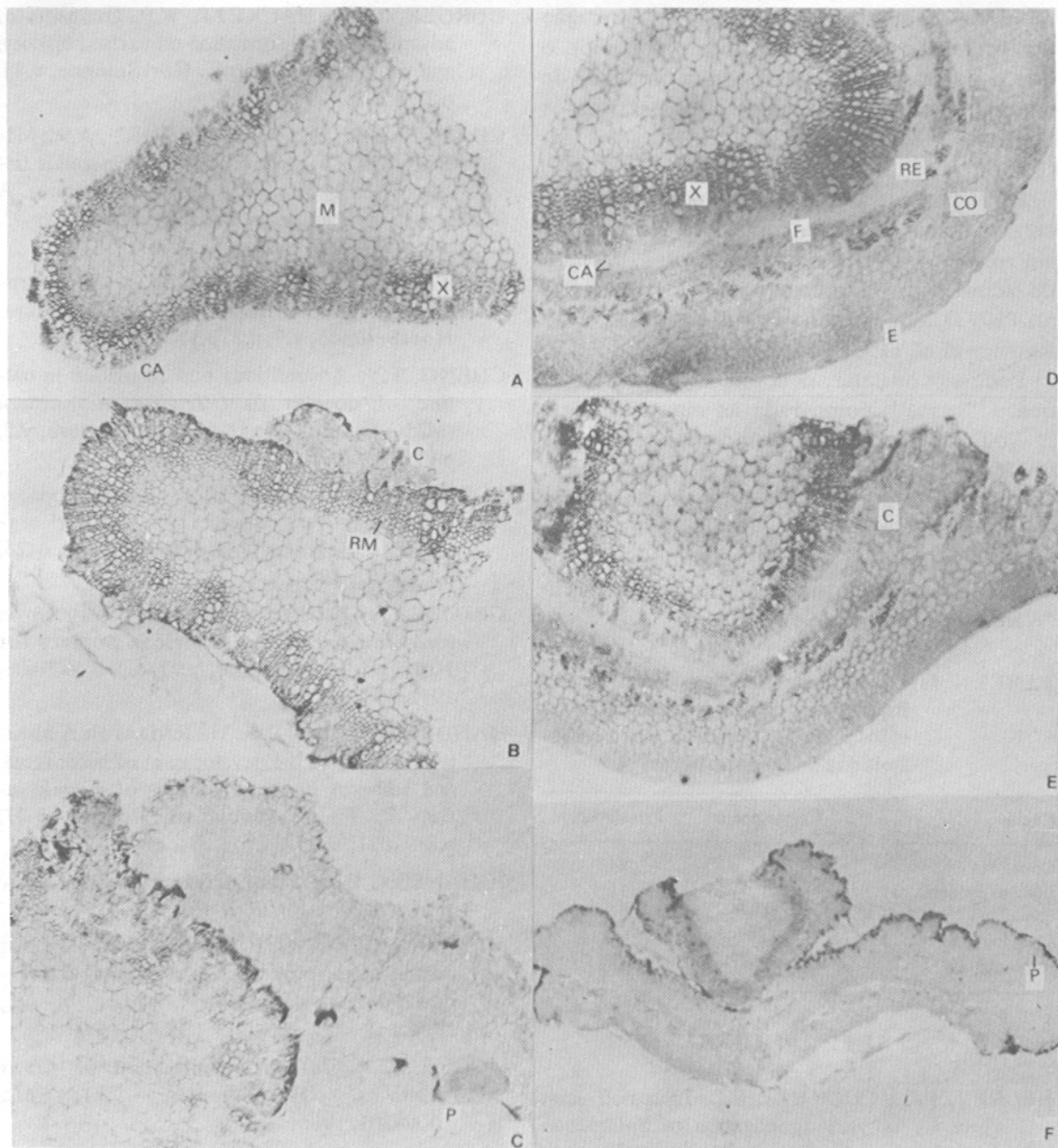


FIG. 3. Cortes transversais da região do “cilindro central”; A. sem nenhum desenvolvimento (180X); B. início do calejamento a partir dos raios medulares (230X); C. primórdios desenvolvidos no calo (290X); - Cortes transversais da região de “rejunção”; D. sem nenhum desenvolvimento (292X); E. início do calejamento a partir de células cambiais (230X); F. primórdio desenvolvido no calo (72X). CA = região cambial; C = calo; CO = córtex; E = epiderme; F = floema; M = medula; P = primórdio; RE = região de rejunção; X = xilema.

A análise citológica revelou, como em outros trabalhos (Thorpe & Murashige 1968, 1970, Thorpe & Meier 1972, Ross et al. 1973, Tran Thanh Van & Chlyah 1976), o acúmulo de grãos de amido no calo antes da formação dos primórdios, e desaparecimento posterior, o que pode estar relacionado com a produção de energia para desenvolvimento dos processos morfogênicos, como sugere Ross et al. (1973).

Observou-se, ainda, a diferenciação precoce de xilema de forma centrípeta e centrífuga em relação à posição dos primórdios, estando de acordo com as observações de Handro et al. (1973), em *Petunia inflata* R. Fries, e de Rumary et al. (1986) em *Picea* sp.

Pode-se constatar, pela análise da Tabela 1, que a "casca", comparada às outras regiões, iniciou primeiro o calejamento e a emissão dos primórdios. Essa região apresentava a faixa cambial livre de impedimentos mecânicos de tecidos adjacentes, podendo as células aumentar seu volume livremente, atingindo rapidamente o tamanho necessário para a divisão (Wareing & Phillips 1981).

TABELA 1. Quantidade de dias, a partir da inoculação, para surgimento de calo e de primórdios em regiões isoladas de laranja-pêra.

Região	Calejamento	Primórdios
Completo	5	24
Lâmina epidérmica	4	15
Casca	3	7
Cilindro central	5	9
Rejunção	5	17

REFERÊNCIAS

- BELKEY, P.C.; COCKING, E.C. Increased plant vigor by *in vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. from sub-epidermal tissue. *HortScience*, v.16, n.5, p.634-644, 1981.
- BHANSALI, R.R.; ARYA, H.C. Organogenesis in *Citrus limettoides* (Sweet lime) callus culture. *Phytomorphology*, v.29, n.2, p.97-100, 1979.
- BIGOT, C. Bourgeonnement *in vitro* à partir d'épiderme séparé de feuille de *Bryophyllum draigemontianum* (crassulacées). *Canadian Journal of Botany*, v.54, p.852-867, 1976.
- BURGER, D.W.; HACKETT, W.P. Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root section of citrus. *HortScience*, v.43, p.229-232, 1986.
- CHATURVEDI, H.C.; CHOWDHURY, A.R.; MITRA, G.C. Morphogenesis in stem-callus tissue of *Citrus grandis* in long-term cultures. A biochemical analysis. *Current Science*, v.43, n.5, p.139-142, 1974.
- CHATURVEDI, H.C.; MITRA, G.C. Clonal propagation of citrus from somatic callus cultures. *HortScience*, v.9, n.2, p.118-120, 1974.
- CHENG, T.Y. Adventitious bud formation in culture of douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Plant Science Letters*, v.5, p.97-102, 1975.
- EDRISS, M.H.; BURGER, O.W. *In vitro* propagation of 'Troyer' citrange from epicotyl segments. *Scientia Horticulture*, v.23, p.159-162, 1984.
- GRIMBLAT, U. Differentiation of citrus stem *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.97, n.5, p.599-603, 1972.
- HANDRO, W.; RAO, P.S.; HARADA, H. A histological study of the development of buds, roots, and embryos in organ cultures of *Petunia inflata* R. Fries. *Annals of Botany*, v.37, p.817-821, 1973.
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York: MacGraw-Hill, 1940. 523p.
- MILLER, C.; SKOOG, F. Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *American Journal of Botany*, v.40, p.768-773, 1953.
- MOORE, G.A. *In vitro* propagation of *Citrus* rootstocks. *HortScience*, v.21, n.2, p.300-301, 1986.
- MURASHIGE, T. Principles of rapid propagation. In: HUGHES, K.W.; HENKE, R.; CONSTANTIN, M. (Ed.). *Propagation of higher plants through tissue culture; a bridge between research and application*. Springfield: U.S. Dep. Energy, 1978. p.14-24.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- NICKERSON, N.L.; HALL, L.V. Callus formation in stem internode sections of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) cultured on a medium containing plant growth regulators. *Horticultural Research*, v.16, p.29-35, 1976.
- ROSS, K.; THORPE, T.A.; CONSTERTON, J.W. Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. *American Journal of Botany*, v.60, n.8, p.788-795, 1973.
- RUMARY, C.; PATEL, K.R.; THORPE, T.A. Plantlet formation in black and white spruce. II. Histological analysis of adventitious shoot formation *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*, v.64, p.997-1002, 1986.
- SKOOG, F.; TSUI, C. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *American Journal of Botany*, v.35, p.782-787, 1948.
- THORPE, T.A.; MEIER, D.D. Starch metabolism, respiration, and shoot formation in tobacco callus cultures. *Physiologia Plantarum*, v.27, p.365-369, 1972.
- THORPE, T.A.; MURASHIGE, T. Some histological changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Canadian Journal of Botany*, v.48, p.277-285, 1970.
- THORPE, T.A.; MURASHIGE, T. Starch accumulation in shoot-forming tobacco callus cultures. *Science*, v.160, p.421-422, 1968.
- TRAN THANH VAN, M. Direct flower neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, v.115, p.82-87, 1973a.
- TRAN THANH VAN, M. *In vitro* control of "de novo" flower, bud, root, and callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature*, v.246, p.44-45, 1973b.
- TRAN THANH VAN, M.; CHLYAH, A. Différenciation de boutons floraux, de bourgeons végétatifs, de racines et de cal à partir de l'excision sous-épidermique des ramifications florales de *Nicotiana tabacum* Wisc. 38; étude infrastructurale. *Canadian Journal of Botany*, v.54, p.1979-1996, 1976.
- TRAN THANH VAN, M.; DIEN, N.T. Étude au niveau cellulaire de la différenciation *in vitro* et "de novo" de bourgeons végétatifs, de racines, ou de cal a partir de couches minces de cellules de type épidermique de *Nicotiana tabacum* Wisc. 38. *Canadian Journal of Botany*, v.53, p.553-559, 1975.
- TRAN THANH VAN, K.; TRINH, H. Plant propagation: non-identical and identical copies. In: HUGHES, K.W.; HENKE, R.; CONSTANTIN, M. (Ed.). *Propagation of higher plants through tissue culture; a bridge between research and application*. Springfield: U.S. Dep. Energy, 1978. p.134-158.
- TRINH, T. MANH; LIE-SCHRICKE, H.; TRAN THANH VAN, K. Formation direct de bourgeon à partir des fragments et des couches cellulaires minces de différents organes chez le *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) Dc. *Z. Pflanzenphysiol.*, v.102, p.127-139, 1981.
- WAREING, P.F.; PHILLIPS, LD.J. *Growth and differentiation in plants*. 3.ed. Oxford: Pergamon Press, 1981. 343p.
- ZIESLIN, N.; HAAZE, H.; HALEVY, A.H. Components of axillary bud inhibition in rose plants. II. The effect of bud position on degree of inhibition. *Botanical Gazette*, v.137, n.4, p.297-300, 1976.