

## Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker

VICENTE, M.A.A.\*; ALMEIDA, W.A.B.; CARVALHO, Z.S.

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Caixa Postal 81, 44380-000-Cruz das Almas - BA,  
\*aliceargolo@yahoo.com.br

**RESUMO:** A espécie medicinal *Vernonia condensata*, vulgarmente conhecida por alumã, pertencente à família Asteraceae, possui propriedades analgésicas e de proteção gástrica. A crescente utilização dessa planta no Nordeste, pelas propriedades terapêuticas, justifica a necessidade de medidas que minimizem o impacto de sua exploração nas reservas naturais. O objetivo desse trabalho foi multiplicar *in vitro* plantas de alumã sob diferentes concentrações de BAP e aclimatá-las. Gemas axilares foram desinfestadas em solução de álcool etílico 70%, durante 2 minutos e em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) na concentração de 3:1, durante 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada estéril. Os tratamentos para multiplicação consistiram em doses de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) em meio MS semi-sólido. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições, contendo 10 gemas por repetição. Após 30 dias de cultivo observou-se maior taxa de explantes responsivos, 84% na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, com produção de 4,0 brotos/explante. Nos tratamentos 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> ocorreu hiperhidricidade nas folhas. As microplantas de alumã provenientes da metodologia utilizada neste trabalho alcançaram 100% de sobrevivência na aclimação.

**Palavras-chave:** biotecnologia, plantas medicinais, cultura de tecidos

**ABSTRACT:** *In vitro* multiplication and acclimation of *Vernonia condensata* Baker. The medicinal species *Vernonia condensata*, commonly known as "alumã", belongs to the family Asteraceae and has analgesic and gastric protective properties. The increasing use of this plant in the Northeast of Brazil due to its therapeutic properties justifies the need of measures to minimize the impact of its exploitation in natural reserves. The aim of this study was to multiply, *in vitro*, "alumã" plants under different BAP levels, acclimating them. Axillary buds were sterilized in 70% (v/v) alcohol solution for 2 minutes and in 75% sodium hypochlorite solution (2% active chlorine) at 3:1 concentration for 15 minutes, followed by three washings in sterile distilled water. Multiplication treatments consisted of different BAP levels (0.0; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 and 5.0 mg L<sup>-1</sup>) in semi-solid MS medium. The experimental design was completely randomized, with 5 replicates and 10 buds per replicate. After 30 days of cultivation, the highest rate of responsive explants was obtained: 84% at 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP, producing 4.0 sprouts/explant. In the treatments 3.0, 4.0 and 5.0 mg L<sup>-1</sup>, there were vitrified leaves. The "alumã" microplants used in this study had 100% survival in acclimation.

**Key words:** biotechnology, medicinal plants, tissue culture

### INTRODUÇÃO

A espécie *Vernonia condensata* Baker, vulgarmente conhecida por alumã, pertencente à família Asteraceae, nativa possivelmente da África tropical, foi trazida ao Brasil nos tempos coloniais pelos escravos (Lorenzi & Matos, 2002), que faziam uso da mesma por possuir propriedades analgésicas

e de proteção gástrica (Boorhem, 1999).

A crescente utilização dessa planta medicinal no Nordeste, pelas propriedades terapêuticas, justifica a necessidade de medidas que minimizem o impacto de sua exploração nas reservas naturais. Portanto, a micropropagação parece ser uma alternativa viável,

pois permite a obtenção de um grande número de plantas com autenticidade varietal em qualquer época do ano (Nicoloso et al., 2001).

Quando se pretende explorar economicamente uma determinada espécie vegetal, o ponto de partida deve ser o estudo das formas de propagação e se elas apresentam viabilidade para o estabelecimento de um sistema produtivo (Scheffer, 1992).

Atualmente, muitas plantas medicinais já são multiplicadas *in vitro*. Entre elas: *Pfaffia glomerata* (Maldaner et al., 2006), *Lychnophora pinaster* (Souza et al., 2003), *Jatropha elliptica* (Campos et al., 2007), *Aloe vera* (Araújo et al., 2002), etc. Por meio da biotecnologia, é possível aumentar a produção e diminuir o preço dos princípios ativos fitoquímicos (Bajaj et al., 1988). A proliferação *in vitro* de plantas medicinais, a partir da cultura de gemas e meristemas, é basicamente uma extensão da propagação vegetativa feita em muitas espécies. Entretanto, este método pode ser usado não só para a produção de mudas sadias e de boa qualidade, mas também quando há escassez de material para o plantio (Cunha et al., 1999).

A cultura de tecidos de plantas é um método biotecnológico já consagrado pelos resultados alcançados em várias culturas, as quais foram beneficiadas pela produção de plantas uniformes e sadias, pela velocidade superior de crescimento em relação aos métodos convencionais de propagação, pela maior produção em menor tempo e espaço físico e, ainda pela obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos através da cultura de meristemas (Crócomo, 1986).

A indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por uma concentração adequada e balanceada de reguladores vegetais adicionada ao meio, como a citocinina que é muito favorável na fase de multiplicação *in vitro*. A 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (Grattapaglia & Machado, 1998).

Outro regulador vegetal utilizado no cultivo *in vitro* é o ácido giberélico ( $GA_3$ ). O efeito mais conhecido das giberelinas *in vitro* é no alongamento das partes aéreas quando essas não estão em condições de serem individualizadas para o enraizamento, devido ao seu pequeno tamanho (Grattapaglia & Machado, 1998).

As exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições *in vitro* variam de espécie para espécie, de variedade para variedade e até mesmo dentro da própria planta, necessitando-se, assim, otimizar os meios de cultura (Nagao et al., 1994).

Uma etapa importante da micropropagação que inspira cuidado é a aclimação. Um número

expressivo de espécies vegetais cultivadas *in vitro* não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para ambiente de casa de vegetação ou campo (Hararika, 2003). O sucesso da transferência de plantas em condições *in vitro* para a casa de vegetação é essencial para um sistema de micropropagação bem sucedido (Hoffmann, 2002).

Devido à importância desta planta para obtenção dos princípios ativos e outros múltiplos propósitos, objetivou-se induzir a multiplicação de brotos de alumã *in vitro*, através da adição dos reguladores vegetais BAP e  $GA_3$  ao meio de cultura, bem como aclimatá-los.

## MATERIAL E MÉTODO

Plantas de alumã oriundas do campo foram utilizadas nesse trabalho. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade Maria Milza (FAMAM).

**Desinfestação do material:** Gemas axilares foram lavadas em água corrente e desinfestadas em solução de álcool etílico 70%, durante 2 minutos. Em seguida foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e água na proporção de 3:1, durante 15 minutos em agitador magnético. O material vegetal foi lavado 3 vezes em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada.

**Estabelecimento *in vitro*:** Após o processo de desinfestação, as gemas foram inoculadas em placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com ágar (0,8%). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8, anteriormente à autoclavagem (121°C por 20 minutos). O experimento foi conduzido em B.O.D, com temperatura de 27 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa. Após 15 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se a porcentagem de explantes responsivos (aqueles que formaram gemas e/ou brotos) nas placas e porcentagem de contaminação e oxidação.

**Multiplicação *in vitro*:** Os brotos obtidos nas placas foram transferidos para frascos contendo meio MS nas mesmas concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) com o intuito de aumentar a taxa de multiplicação. Após 30 dias fez-se a contagem dos brotos, os quais foram individualizados e colocados em novo meio de cultura MS, acrescido de 1 mg L<sup>-1</sup>  $GA_3$  e 1% de carvão ativado

com o intuito de alongar e induzir a formação de raízes nas brotações. Ao final de 75 dias, avaliaram-se o número de folhas, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e porcentagem de sobrevivência.

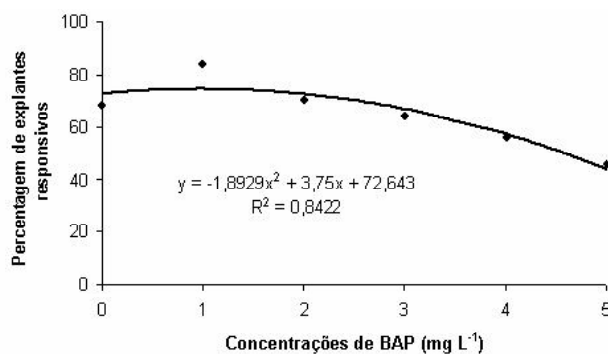
**Delineamento experimental:** Para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições, contendo 10 gemas em cada repetição. Os dados obtidos na multiplicação foram analisados estatisticamente e submetidos à regressão e teste de Tukey.

**Aclimação:** Foram selecionadas 100 microplantas, retiradas dos frascos e lavadas com água corrente com o objetivo de remover o excesso do meio de cultura. As microplantas foram acondicionadas em garrafas plásticas transparentes de refrigerante, de dois litros, com quatro pequenos furos na base para drenagem do excesso de água. As garrafas foram cortadas na metade de sua altura para facilitar a adição do substrato (terra vegetal autoclavada) e transplante da muda, após o que foram novamente fechadas por sobreposição das metades. No primeiro dia, no período matutino, retirou-se a cápsula (tampinha) da garrafa por 10 minutos, no segundo dia por 20 minutos e foi-se aumentando o tempo gradativamente até a retirada permanente da tampinha, quando as mudas já estavam adaptadas ao meio ambiente. Após trinta dias as mudas encontravam-se totalmente aclimatadas. Durante o período de aclimação, as garrafas com as microplantas foram mantidas em telado com 30% de sombreamento e irrigadas com auxílio de um borrifador, de forma a manter a umidade relativa do ar elevada. Esta exposição progressiva das microplantas às condições ambientais teve o objetivo de reduzir o estresse. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada ao final da aclimação.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Observou-se que a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi aquela que promoveu o maior percentual de explantes responsivos (84 %). Essa porcentagem de resposta diminuiu em concentrações maiores devido possivelmente ao efeito fitotóxico da citocinina (Figura 1).

Além da provável toxidez causada pela citocinina, as perdas obtidas durante a inoculação dos explantes de alumã no meio de cultura foram de 4 a 38%, por contaminação com fungos e bactérias (Tabela 1). Segundo a análise estatística, aumentando-se as concentrações de BAP, aumentou-se também a contaminação por bactérias nas gemas axilares de *Vernonia condensata*, interferindo na resposta morfo genética. É possível que as maiores



**FIGURA 1.** Porcentual de explantes responsivos de alumã em função de concentrações de BAP, após 15 dias de cultivo.

concentrações do regulador vegetal (BAP) tenham contribuído para aumentar a multiplicação de bactérias. Neste caso, necessita-se de estudos mais aprofundados para melhor avaliação dos efeitos do BAP no crescimento de bactérias, visto que não foram encontrados relatos na literatura da existência desta correlação. Entretanto, sabe-se que a contaminação é muito dependente do material vegetal utilizado para isolamento *in vitro*, que pode ser de casa de vegetação ou do campo. No caso da espécie *Vernonia condensata*, o material vegetal utilizado foi retirado de plantas do campo contendo elevada concentração de microrganismos. Segundo Tavares et al. (1992), uma maior destreza no isolamento dos explantes e a adoção de uma assepsia superficial mais efetiva, com emprego de uma maior concentração do agente esterilizante, maior período de tratamento ou utilização de outro composto desinfestante podem reduzir para níveis mais baixos as perdas aqui ocorridas.

Outro problema comum em cultura de tecidos é a oxidação de explantes, apesar do valor pequeno encontrado no presente trabalho (2 a 14%), a qual interferiu também na resposta morfo genética dos explantes (Tabela 1). A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*. Esses compostos fenólicos são oxidados, produzindo substâncias tóxicas que inibem o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (Grattapaglia & Machado, 1998).

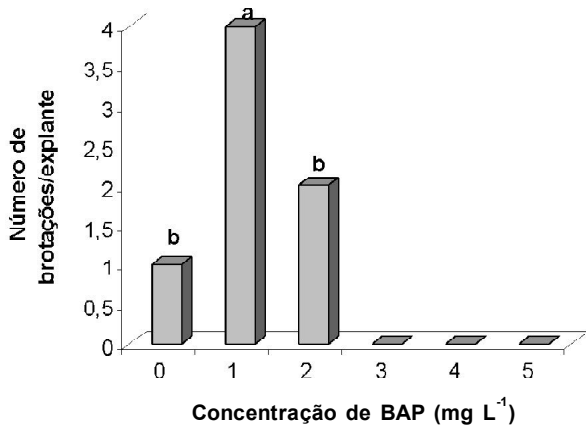
Com relação ao número de brotações por explantes, a concentração 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi aquela de melhor resposta, com 4,0 brotações/explante, diferindo significativamente das demais concentrações (Figura 2). Resultado semelhante foi encontrado por Pasqual & Ando (1989), no cultivo *in vitro* de gemas axilares de plântulas de *Poncirus trifoliata*, onde elevadas concentrações de BAP promoveram redução no percentual de explantes com brotações, sendo que a concentração ótima foi de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

**TABELA 1.** Porcentagem de perdas de explantes por contaminação e oxidação, após 15 dias de cultivo.

Concentração de BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Contaminação por fungos (%)	Contaminação por bactérias (%)	Oxidação de explantes (%)
0,0	10a	8a	14a
1,0	8a	4a	4a
2,0	14a	10ab	6a
3,0	14a	16ab	8a
4,0	8a	28bc	8a
5,0	14a	38c	2a

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0,05).

Com relação à altura (comprimento da parte aérea) das brotações de alumã, não foi observado diferenças significativas entre as concentrações de BAP, embora a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> tenha promovido a maior altura (8,38 cm), conforme Tabela 2. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas das brotações até uma determinada concentração, a partir da qual ocorre diminuição da altura em virtude de um possível efeito fitotóxico da citocinina.

**FIGURA 2.** Número de brotações por explantes em função de diferentes concentrações de BAP, após 45 dias de cultivo.

A toxidez causada pelo excesso de reguladores vegetais no meio de cultura, ou pelo prolongado período de tempo em que a cultura permanece exposta a eles, pode provocar alterações

genéticas, fisiológicas e morfológicas, resultando na redução da taxa de multiplicação e no encurtamento dos caules, o que dificulta a individualização das plantas e o processo de enraizamento (Narayanaswamy, 1977).

Segundo Cantagallo et al. (2005), brotações provenientes de meio de cultura com concentrações menores de reguladores apresentaram desenvolvimento vegetativo superior. No presente trabalho não houve diferenças significativas entre as concentrações de BAP, com relação ao número de folhas das brotações (Tabela 2). Entretanto, a ausência desse regulador vegetal e a concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> resultaram em baixa produção de brotos em alumã (Figura 2). Da mesma forma, Andrade et al. (2006) verificaram que o aumento no número de brotações de *Eucalyptus grandis* foi inversamente proporcional ao aumento da dosagem e do tempo de exposição ao BAP.

O efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações pode ser relacionado com a influência desse regulador na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical (Brum et al., 2002). O mesmo foi observado com o alumã (Figura 3).

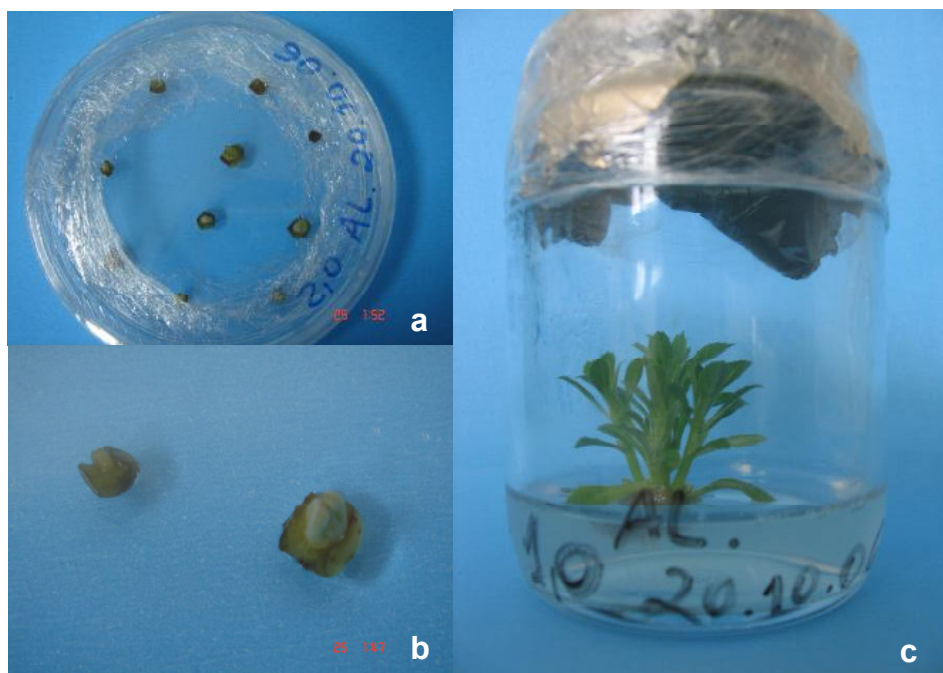
Durante o desenvolvimento das brotações de alumã mantidas em meio de cultura contendo BAP, observou-se a ocorrência de hiperhidricidade das folhas nos tratamentos com 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 4). Pinto et al. (1994), trabalhando com segmentos nodais de *Kielmeyera coriacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com concentrações acima de 8,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, também observaram a formação de brotações hiperhídricas.

A hiperhidricidade é um evento comum na

**TABELA 2.** Número de folhas, comprimento da parte aérea e comprimento da raiz de brotos de alumã em função de diferentes concentrações de BAP, após 75 dias de cultivo.

Concentração de BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Número de folhas (%)	Comprimento da parte aérea (cm)	Comprimento da raiz (cm)
0,0	8.25 a*	8.18 a	9.75 a
1,0	10.88 a	8.38 a	10.38 a
2,0	10.0 a	6.94 a	7.63 a

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0,05).



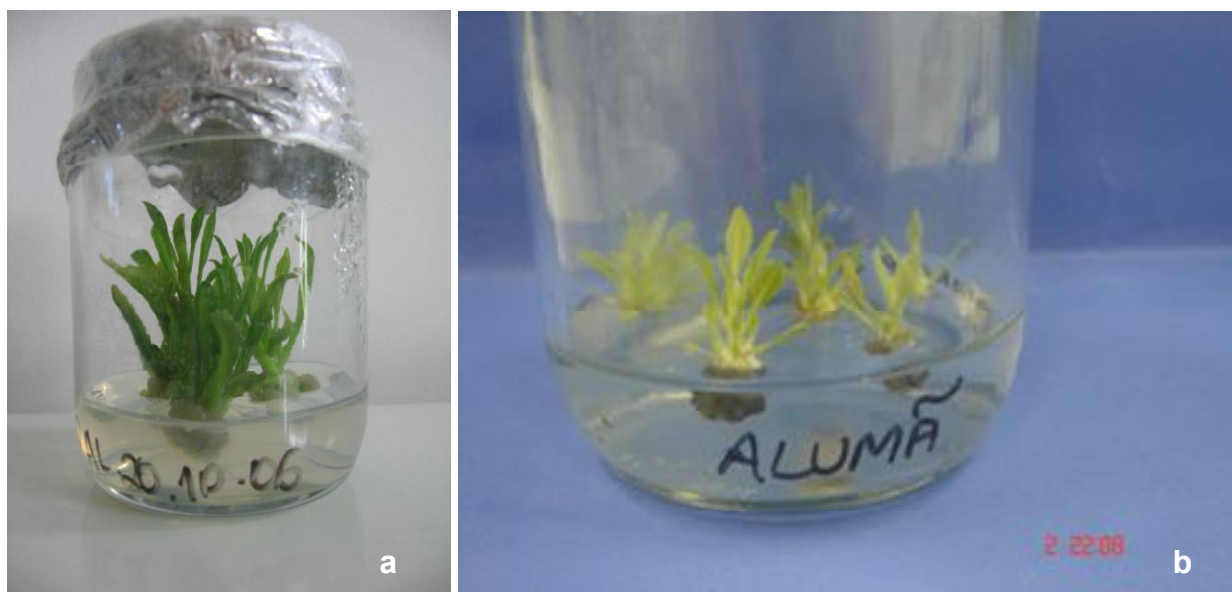
**FIGURA 3.** Multiplicação *in vitro* de *Vernonia condensata* Baker a partir de gemas axilares. a) Resposta das gemas após 15 dias de cultivo. b) Detalhe da gema. c) Brotações múltiplas provenientes da concentração 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

cultura de tecidos, gerando anormalidades fisiológicas e morfológicas no tecido vegetal, afetando os processos de fotossíntese e trocas gasosas da planta (Ziv, 1991). Um dos fatores que provoca essa anormalidade é o excesso de regulador vegetal. As plantas quando estão com hiperhidricidade não são aptas a serem aclimatadas (Abreu et al., 2003).

Em algumas culturas, como a do alumã, as

brotações obtidas na fase de multiplicação geralmente são pequenas e não se encontram em condições de serem individualizadas para o enraizamento, necessitando do uso de regulador vegetal que promova o alongamento da parte aérea dessas brotações.

A aplicação de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> no meio de cultura conferiu um aumento na altura média das brotações provenientes dos tratamentos 0,0; 1,0 e



**FIGURA 4.** Hiperhidricidade observada em brotações *in vitro* de alumã. a) Brotações de alumã apresentando aspecto de hiperhidricidade nas folhas em concentrações de 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. b) Hiperhidricidade na concentração de 3,0 mg L<sup>-1</sup>, onde o efeito foi menor.

2,0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 5), demonstrando o efeito benéfico promovido por este regulador no desenvolvimento *in vitro* de alumã. Os brotos com hiperhidricidade dos tratamentos 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> foram descartados. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o efeito mais conhecido das giberelinas *in vitro* é no alongamento das partes aéreas quando essas não estão em condições de serem individualizadas para o enraizamento, devido ao seu pequeno tamanho. Grosser & Gmitter Júnior (1990) também obtiveram alongamento satisfatório em plântulas de híbridos somáticos de citros, utilizando 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> no meio de cultura.

O aumento do tamanho da muda proveniente da cultura de tecidos é de interesse prático, pois em razão do seu porte restrito, o manuseio torna-se mais difícil e o tempo para a produção comercial da muda é prolongado (Hoffmann et al., 2001).

O enraizamento das brotações é fundamental para a obtenção de plantas aclimatadas e em condições de serem transferidas para campo. A utilização de 1% de carvão ativado no meio de cultura contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> resultou no enraizamento das brotações de alumã, não havendo necessidade da adição de auxina (Figura 5). Ribeiro et al. (2000) estimularam o crescimento do sistema radicular em citros com 0,5 a 2,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado em cultivo *in vitro*.

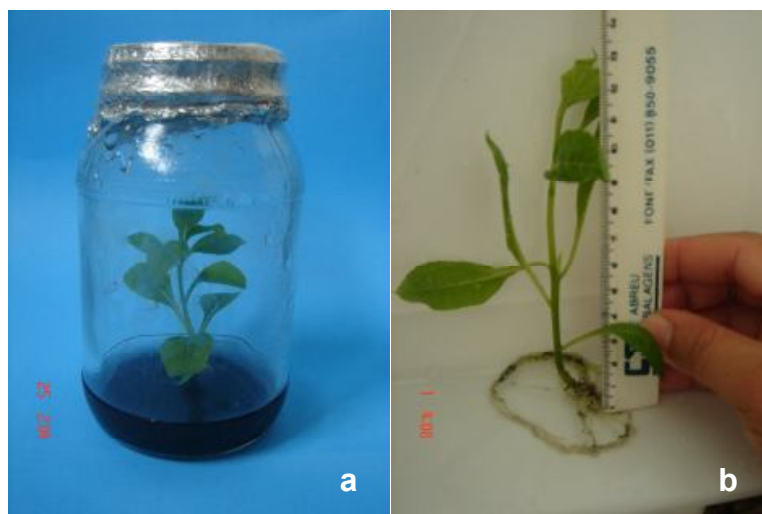
Segundo Pasqual et al. (2001), o carvão ativado em concentrações de 0,2 a 3% pode ser utilizado para o enraizamento de diversas culturas. Fisicamente, ele simula a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor. Quimicamente, retém substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes e promove o crescimento de raízes.

Dois fatores podem ter contribuído ao bom enraizamento do alumã *in vitro* sem o emprego de

regulador vegetal. O primeiro devido possivelmente à produção endógena de auxina pela planta. Segundo Coll et al. (1988), as partes aéreas são fontes de intensa produção de auxina que, ao ser translocada para a base, estimularia a rizogênese. Outro fator a ser considerado é o tamanho das raízes. Brotos pequenos em geral não enraízam bem necessitando, portanto, de uma fase intermediária adicional de alongamento com o uso do GA<sub>3</sub>. Deste modo, baseado no excelente enraizamento (100%) obtido neste trabalho sem o uso de auxina, o tamanho dos explantes (8 a 13 cm) utilizados neste experimento revelaram competência na formação de raiz (Figura 5b).

As microplântulas de alumã apresentaram 100% de sobrevivência e bom desenvolvimento durante o processo de aclimação (Figura 6), independente da concentração de BAP utilizada. Já Silva et al. (2003) concluíram em seu trabalho que plantas de gloxínia apresentaram maior número de plantas sobreviventes durante o processo de aclimação, quando provenientes de cultivo *in vitro* com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Da mesma forma, Ribas et al. (2002) trabalharam com plantas de maracujazeiro provenientes de cultivo *in vitro* e verificaram que as concentrações de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP foram fundamentais para a aclimação onde obtiveram taxa de sobrevivência em torno de 100%, independente do meio de cultura utilizado.

Araújo et al. (2002) relataram que mudas de *Aloe vera* enraizadas *in vitro* apresentam 80 a 95% de sobrevivência na aclimação, enquanto que naquelas desprovidas de sistema radicular a taxa de sobrevivência cai para 30%. A obtenção de microplanta com sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento em novas condições ambientais, como as proporcionadas na aclimação (Pio et al., 2002).



**FIGURA 5.** Alongamento e enraizamento de broto de alumã. **a)** MS contendo GA<sub>3</sub> e carvão ativado, **b)** Avaliação dos parâmetros antes da aclimação.



**FIGURA 6.** Acclimação de microplantas de alumã: **a)** microplantas de alumã em garrafa PET; **b)** irrigadas com auxílio de borrifador; **c)** plantas totalmente aclimatadas.

A metodologia utilizada neste trabalho para a aclimação das microplantas de alumã mostrou-se eficiente e pode ser recomendada para a micropropagação desta espécie medicinal. Além disso, constitui-se numa alternativa de reciclagem para garrafas de refrigerante tipo PET, contribuindo para a sustentabilidade ambiental.

## CONCLUSÃO

·A multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *Vernonia condensata* Baker constitui-se em um processo possível e viável nas condições avaliadas.

·É possível micropropagar plantas de alumã, nas condições utilizadas neste trabalho, adicionando-se a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultura MS, na fase de multiplicação e acrescentar, no mesmo meio de cultura, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> e 1,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado para alongar e enraizar as brotações, bem como obter 100% de plantas aclimatadas.

## REFERÊNCIA

- ABREU, I.N. et al. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissampelos sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, v.33, n.1, p.1-7, 2003.
- ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1715-9, 2006.
- ARAUJO, P.S. et al. Micropropagação de babosa *Aloe vera* L. **Biociência**, v.5, n.25, p.54-7, 2002.
- BAJAJ, Y.P.S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSK, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. **Biotechnology in agriculture and forestry**, v.4, p. 60-103, 1988.
- BOORHEM, R.L. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil Ltda., 1999. 416p.
- BRUM, G.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência Agrotécnica**, v.26, n.2, ed.esp., p.1403-9, 2002.
- CAMPOS, R.A.S. et al. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.3, p.30-6, 2007.
- CANTAGALLO, F.S. et al. Micropropagação de citrumelo 'Swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.1, p.136-8, 2005.
- COLL, J.B. et al. **Fisiologia vegetal**. 6.ed. Madri: Pirâmide, 1988. 702p.
- CRÓCOMO, O.J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brazil. In: SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DE SÃO PAULO, 11., 1986, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1986. p.53-71.
- CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 480p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCPT/Embrapa-CNPq, 1998. p.402-38.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JÚNIOR, F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, v.8, p.339-74, 1990.
- HARARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v.85, n.12, p.1704-12, 2003.

- HOFFMANN, A.; CHALFUN, N.N.J.; PASQUAL, M. Efeito do ácido giberélico e do frio na sobrevivência e crescimento inicial de plântulas micropropagadas de macieira 'Marubakaido', durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.31-7, 2001.
- HOFFMANN, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, v.23, n.216, p.21-4, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum**, v.13, p.382-3, 2002.
- MALDANER, J. et al. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1201-6, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-97, 1962.
- NAGAO, E.O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, v.53, n.1, p.25-31, 1994.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p.179-248.
- NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.2, p.11-8, 2001.
- PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação de 'Trifoliata' através da cultura de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n.2, p.217-20, 1989.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; DUTRA, L.F. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. 2001. 79p. Monografia (Especialização em Cultura de Tecidos Vegetais: tecnologia e aplicações) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de *Kielmeyra coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.6, p.867-73, 1994.
- PIO, R. et al. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta enxerto de citros Tangerina sunki x Trifoliata English 63-256 com o uso de sacarose e ácido indol-butírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.1, p.66-70, 2002.
- RIBAS, A.F. et al. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.). **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.237-41, 2002.
- RIBEIRO, V.G. et al. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.27-30, 2000.
- SCHEFFER, M.C. Roteiro para estudos de aspectos agrônômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUSPR/ CEMEPR. **Sob Informa**, v.10, n.2, p.29-31, 1992.
- SILVA, A.B. et al. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência Agrotécnica**, v.27, n.2, p.255-60, 2003.
- SOUZA, A.V. et al. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* mart. **Ciência Agrotécnica**, v.27, n.2, ed. esp., p.1532-8, 2003.
- TAVARES, A.R.; CASTRO, C.E.F.; COSTA, A.M.M. Propagação *in vitro* de *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 8., Campinas, 1990. **Anais...** São Paulo: SBSP, 1992. p.67-9.
- ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.) **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.45-69.