

Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco¹

In vitro multiplication and rooting of guaco

Josefa Diva Nogueira Diniz², Janaína Rabelo Magalhães³, Renato Innecco⁴, Jacqueline Leite Almeida⁵ e João Licínio Nunes de Pinho⁶

Resumo - Gemas laterais foram retiradas de plantas no campo, estabelecidas *in vitro*, multiplicadas e utilizadas nos experimentos, com o objetivo de determinar um protocolo para a micropropagação do guaco (*Mikania glomerata* Spreng). Para multiplicação, segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de tamanho, retirados das plantas mantidas *in vitro*, foram inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,0 e 1,0 mg.L⁻¹ de AIA (ácido indolacético). Aos 60 dias, 100% dos explantes haviam emitido novas gemas e o maior número médio de gemas emitidas por explante foi verificado nos tratamentos com 1,0 a 4,0 mg.L⁻¹ de BAP. Na presença de AIA houve uma redução significativa no número médio de gemas emitidas por explante. Para o enraizamento foram utilizados segmentos caulinares com 2 a 3 gemas e aproximadamente 3 cm de comprimento, que foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações dos macronutrientes (25, 50 e 100%) em combinação com diferentes doses de AIA (0,00; 0,25; 0,50 e 1,00 mg.L⁻¹). Após 60 dias, 100% dos explantes haviam emitido raízes. O número médio de raízes por explante foi significativamente maior na presença de AIA, não havendo diferença estatística entre as concentrações utilizadas. Em relação às concentrações dos macronutrientes do meio MS, não houve diferença no número médio de raízes emitidas por explante. Já o número médio de gemas emitidas por explante foi maior no meio com 50% da concentração dos macronutrientes do meio MS, na ausência de AIA.

Termos para indexação: *Mikania glomerata*, 6-benzilaminopurina, explante, micropropagação.

Abstract - Aiming at determining a protocol for the micropropagation of the guaco, *Mikania glomerata* Spreng, lateral buds were removed from wild plants, established *in vitro*, multiplied and utilized in experiments. For the multiplication, nodal segments removed from plants kept *in vitro* were inoculated in MS medium (Murashige and Skoog, 1962), with 0.0; 1.0; 2.0; 4.0, and 8.0 mg.L⁻¹ of BAP (6-benzylaminopurine) and 0.0 and 1.0 mg.L⁻¹ of IAA (indolacetic acid). For the rooting, stem segments with 2 to 3 buds and approximately 3 cm long were inoculated in MS medium with different concentrations of macro salts (25, 50 and 100%) combined with different concentrations of IAA (0.00; 0.25; 0.50, and 1.00 mg.L⁻¹). Within 60 days, 100% of the explants had emitted new buds and the highest average number of buds emitted per explant was verified in treatments with 1.0 to 4.0 mg.L⁻¹ of BAP. There was a significant reduction in the average number of buds emitted per explant in the presence of IAA. For the rooting experiment, 100% of the explants emitted roots in 60 days. The average number of roots per explant was significantly higher in the presence of IAA, demonstrating no statistical difference between the different concentrations used. In the different concentrations of MS medium, the average number of roots emitted per explant showed no difference. Concerning the burgeoning emission, in this experiment, the average number of buds emitted per explant was higher in the medium with 50% of concentration of MS salts and absence of IAA.

Index terms: *Mikania glomerata*, 6-benzylaminopurine, explant, micropropagation.

¹ Recebido para publicação em 16/04/2005; aprovado em 30/08/2005.

² Eng. Agrônoma, D. Sc., pesquisadora do Dep. de Fitotecnia, CCA/UFC, Caixa Postal 12168, CEP 60356-001, Fortaleza, Ceará, dndiniz@ufc.br

³ Aluna do curso de Agronomia, CCA/UFC, CE

⁴ Eng. Agrônomo, D. Sc., Prof. do Dep. de Fitotecnia, CCA/UFC, innecco@ufc.br

⁵ Eng. Agrônoma, M. Sc., Técnica do Dep. Fitotecnia, CCA/UFC, jalac@bol.com.br

⁶ Eng. Agrônomo, D. Sc., Prof. do Dep. de Fitotecnia, CCA/UFC, licinio@ufc.br

Introdução

O consumo de medicamentos de origem vegetal vem crescendo nos últimos anos e uma das principais razões é o fato de um grande número de preparações farmacêuticas ter demonstrado, através de estudos, a mesma aplicabilidade no padrão científico das drogas sintéticas (Hamburger & Hosttemann, 1991). A partir da constatação de que a sabedoria popular de fato tem fundamento, alguns pesquisadores deixaram o preconceito de lado e partiram para estudos mais aprofundados sobre o poder das plantas medicinais. Ao mesmo tempo que a ciência intensifica os estudos sobre os efeitos das ervas, o cultivo das plantas medicinais também requer o desenvolvimento e o armazenamento de informações técnicas para a multiplicação e conservação dessas espécies. Existe ainda um mercado informal de plantas cultivadas fora dos padrões exigidos, onde os fitoterápicos estão atraindo consumidores, aumentando a procura por mudas de plantas medicinais e, portanto, necessitando de um maior rigor científico na sua produção e comercialização (Gullo & Pereira, 1998).

Dentre as plantas medicinais usadas no país encontra-se o guaco (*Mikania glomerata* Spreng), que é uma planta arbustiva da família Compositae, originária da América do Sul (Silva Junior et al., 1994). Suas folhas contêm cumarina, cuja ação broncodilatadora e antiinflamatória são eficientes no tratamento de crise de asma, tosse e bronquite, além de ter efeito febrífugo, sudorífico, anti-reumático e cicatrizante (Matos, 2000). Muito comum no Sul do país, é cultivada no Nordeste, onde desenvolve-se muito, mas não produz flores. Sua multiplicação é feita por estaquia, havendo, no entanto, a necessidade de utilização de métodos mais eficientes de propagação vegetativa.

O cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui uma alternativa para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal. Técnicas como micropropagação, culturas de calos, raízes e suspensão celular de plantas medicinais, aromáticas e inseticidas podem ser aplicadas, visando não só a propagação em larga escala de genótipos superiores como a produção de metabólitos secundários (Conceição, 2000). Além disso, podem ser consideradas como ferramentas promissoras para a preservação de recursos genéticos vegetais, bem como para a propagação comercial de plantas medicinais (Abreu, 1998).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis, as quais, mediante investigações experimentais, conduzem à determinação de protocolos ideais de micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1990). Dentre estas variáveis, as mais efetivas para o êxito da regeneração *in vitro* são: a idade e o tipo de explante, o genótipo do mesmo e a com-

posição do meio de cultura além de fatores ambientais como o requerimento de luz e ainda o tempo de transferência para outro meio (Sabá, 2000).

As diversas aplicações da cultura de tecidos utilizam como meio básico o MS (Murashige & Skoog, 1962), sendo o mais comumente utilizado para propagação de várias espécies. Entretanto, a concentração de seus nutrientes tem sido identificada como elevada (Pierik, 1987). Altas concentrações de sais, mesmo na presença de auxinas, podem inibir as fases de enraizamento, mais particularmente a de crescimento de raízes (Grattapaglia & Machado, 1990). Embora as variações sejam inúmeras, conforme a espécie e os sistemas de enraizamento, diluições na concentração dos sais do meio MS são frequentes nessa fase (Zimmermann & Broome, 1979; Ferreira et al., 1996).

Além do meio de cultura, torna-se indispensável para o sucesso do cultivo *in vitro* a manipulação de reguladores de crescimento, tais como auxinas e citocininas, isolados ou em combinações, para determinar um rápido crescimento de células, acompanhado do desenvolvimento organizado de raízes e parte aérea. De acordo com Yui (1990), é bastante comum a utilização do balanceamento de auxinas e citocininas no processo de diferenciação e acúmulo de metabólitos nos tecidos de plantas, inclusive nas medicinais cultivadas *in vitro*. Diante da escassez de estudos de fisiologia de plantas medicinais no Brasil, e especialmente sobre métodos de multiplicação, o trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para a multiplicação em larga escala do guaco, utilizando diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e de AIA (ácido indolacético) para a multiplicação de gemas e diferentes níveis de AIA e dos macronutrientes do meio MS para o enraizamento de plantas *in vitro*.

Material e Métodos

Multiplicação do Guaco

Como fonte de explantes, foram utilizados segmentos nodais de guaco (*Mikania glomerata* Spreng) coletados de plantas mantidas *in vitro*. Estas plantas foram estabelecidas *in vitro*, a partir de gemas laterais coletadas de plantas no campo, em meio MS, e posteriormente multiplicadas sucessivamente no mesmo meio MS com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP. Os segmentos nodais, com parte de caule adjacente e tamanho aproximado de 1 cm, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MS suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹) em combinação com AIA (0,0 e 1,0 mg.L⁻¹), 3% de sacarose, pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e solidificado com 0,4% de ágar; todos os meios foram autoclavados a 121°C, por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, a uma

temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa em torno de 2.000 lux.

Os tratamentos foram distribuídos segundo um delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se um fatorial 5 x 2 (cinco concentrações de BAP x duas doses de AIA), num total de 10 tratamentos e com 20 explantes por tratamento. As avaliações foram feitas aos 60 dias, observando-se o número médio de gemas emitidas por explante, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Enraizamento de explantes de guaco

Segmentos caulinares com 2 a 3 gemas, com aproximadamente 3 cm de comprimento, foram coletados de plantas estabelecidas *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS com diferentes concentrações dos macronutrientes (25; 50 e 100%) em combinação com diferentes níveis de AIA (0,0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹). O preparo do meio de cultivo seguiu a mesma metodologia do experimento anterior quanto à concentração de sacarose, pH, solidificação e esterilização. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições ambientais do experimento anterior. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado em disposição fatorial 4 x 3 (quatro níveis de AIA x três concentrações de macronutrientes), num total de 12 tratamentos e 20 explantes por tratamento. As avaliações do número de explantes com raízes, número médio de raízes por explante e o número médio de gemas por explante foram feitas aos 60 dias e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Resultados e Discussão

Experimento 1 – Multiplificação do guaco

A análise de variância (Tabela 1) mostra que houve diferença significativa no número médio de gemas emitidas por explante tanto no meio com diferentes concentrações de BAP como de AIA, porém, não houve diferença para a interação entre estes dois fatores.

O aumento no número médio de gemas emitidas por explante foi observado quando se acrescentou o BAP até a concentração de 4,0 mg.L⁻¹, havendo uma redução a partir desse nível (Figura 1). Resultados similares foram observados por Barna & Wakhlu (1995). Estes autores verificaram um aumento no número de propágulos na micropropagação de grão-de-bico, ao utilizarem BAP em concentrações mais baixas, havendo um efeito inibidor quando a concentração foi aumentada. Conforme Lameira et al. (1993), no cultivo *in vitro* de *Caphaelis ipecacuanha*, a redução no número de gemas emitidas em concentrações

elevadas de BAP expressa o efeito inibidor das citocininas quando são utilizadas em concentrações mais altas. Em explantes de singônio, Schwertner & Zaffari (2003) verificaram um aumento no número de brotações com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, havendo uma redução quando utilizaram as concentrações de 2,5 e 4,0 mg.L⁻¹. Segundo Grattapaglia & Machado (1990), os sintomas de toxidez pelo uso excessivo de citocinina são o grande intumescimento e falta de alongamento das culturas, redução do tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e vitrificação generalizada da cultura, além da redução do número de brotos induzidos.

Tabela 1 - Análise de variância para o número médio de gemas emitidas por explante de guaco (*Mikania glomerata* Spreng), em meio MS com diferentes concentrações de BAP e de AIA (Experimento 1), e para o número médio de novas gemas e de raízes emitidas por explante em diferentes concentrações do meio MS e de AIA (Experimento 2), aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Experimento 1			
Fonte de variação	GL	QM	
		\bar{G} /explante	
AIA	1	01,45**	
BAP	4	00,20**	
BAP x AIA	4	00,03 ^{ns}	
Resíduo	30	00,04	
C.V.(%)	-	12,00	
Experimento 2			
-	-	\bar{G} /explante	\bar{R} /explante
Meio	2	0,031 ^{ns}	00,098 ^{ns}
AIA	3	0,217**	02,24**
Meio x AIA	6	0,049*	00,16 ^{ns}
Resíduo	36	0,020	00,18
CV (%)	-	19,00	22,23

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; ns não significativo; \bar{G} número médio de gemas; \bar{R} número médio de raízes.

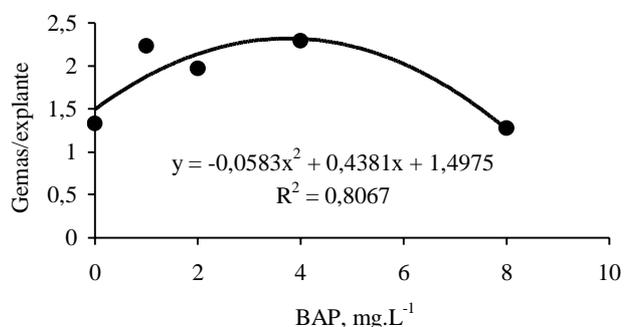


Figura 1 - Número médio de gemas emitidas por explantes de guaco (*Mikania glomerata* Spreng), aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes concentrações de BAP.

No meio com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP ocorreu o maior número médio de brotações por explante (2,29), não havendo diferença significativa do número de gemas emitidas nos tratamentos com 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP (2,23 e 1,97, respectivamente) (Figura 1). Dessa forma, o tratamento com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP pode ser indicado como o mais adequado para a multiplicação das gemas de guaco nas condições deste experimento, tornando o protocolo mais econômico ao reduzir o custo do meio e consequentemente das plantas produzidas *in vitro*.

Na Figura 2, verifica-se que houve diferença significativa para o efeito do AIA na indução de gemas, sendo que na ausência deste regulador o número de gemas emitidas foi estatisticamente superior. Houve, portanto, influência negativa do AIA, conforme observado também por Guamantica (1998) em diferentes espécies de helicônia. Porém, para a emissão de gemas em pimentão, Innecco (1993) conseguiu os melhores resultados com AIA na concentração de 1,0 mg.L⁻¹.

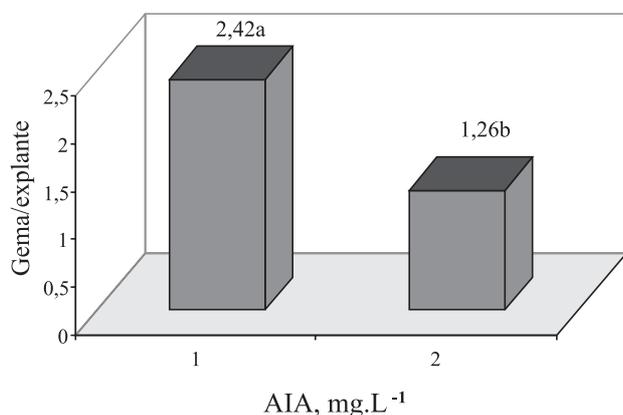


Figura 2 - Número médio de gemas emitidas por explantes de guaco (*Mikania glomerata* Spreng), aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes concentrações de AIA.

Experimento 2 - Enraizamento de explantes de guaco

Para o número médio de raízes emitidas por explante só houve diferença significativa nas diferentes concentrações de AIA, enquanto que para o número médio de gemas por explante, além dos níveis de AIA, também verificou-se diferença significativa para a interação concentrações do meio MS x doses de AIA (Tabela 1).

Aos 60 dias, 100% dos explantes haviam emitido raízes em todos os tratamentos. Em plantas de duas cultivares de gérbera, Laliberte et al. (1985) também obtiveram 100% de enraizamento utilizando diferentes concentrações de AIA (0,00; 0,05; 0,10; 0,30; 0,50 e 1,00 mg.L⁻¹). Diferentemente, Murashige (1974) obteve 90% e 100% de plantas de gérbera enraizadas em níveis mais elevados de AIA (3,0 e 10,0 mg.L⁻¹, respectivamente).

O número médio de raízes por explante foi significativamente maior na presença de AIA, não havendo diferença estatística entre as diferentes concentrações utilizadas (Figura 3). O número de raízes por explante e a qualidade destas raízes, que resultam em um sistema radicular bem desenvolvido, são características que certamente irão facilitar o desenvolvimento das plantas durante o processo de aclimatização.

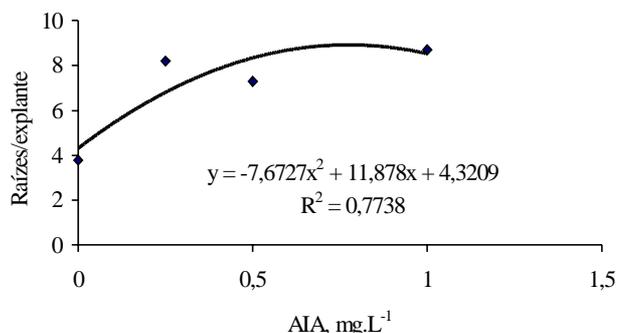


Figura 3 - Número médio de raízes emitidas por explantes de guaco (*Mikania glomerata* Spreng), aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes concentrações de AIA.

Não foram observadas diferenças significativas no número médio de raízes emitidas por explante nas diferentes concentrações do meio MS. Resultados semelhantes foram obtidos por Pierik & Segers (1989) em explantes de gérbera. Contudo, Pereira et al. (2000), investigando a micropropagação de *Salix humboldtiana* Hild, uma planta medicinal, observou um aumento no enraizamento das gemas com a metade da concentração dos sais do meio MS. Em explantes de porta-enxerto de videira, Dzazio et al. (2002) obtiveram 80% de enraizamento utilizando o meio MS na concentração de 50% dos sais. Bertolucci et al. (2000) verificaram que segmentos nodais de *Tournefortia cf paniculata* Cham foram afetados não só pelos reguladores de crescimento para a indução e crescimento das raízes, mas também pela concentração dos sais.

Verificou-se um efeito significativo sobre o número médio de gemas emitidas pelos explantes de guaco em relação às concentrações de AIA, sendo que a ausência deste proporcionou o maior número médio de gemas (3,19), diferindo dos demais tratamentos (Figura 4). Resultados similares foram obtidos por Erig & Fortes (2002) com gemas de duas cultivares de pereira submetidas a meios com várias concentrações de BAP e ANA combinadas entre si, apresentando diferenças significativas na sobrevivência e desenvolvimento das gemas, e essa resposta deveu-se à formação de calo, seguida de escurecimento, provocado, possivelmente, pela quantidade de auxina no meio. Smith & Murashige (1970) sugerem que as zonas produtoras de auxinas não são propriamente os meristemas e sim os

primórdios foliares e as folhas em expansão, o que poderia explicar a razão pelo qual a auxina não é tão necessária quando as gemas são utilizadas para cultivo. Ribas & Zanette (1992) citam que para a multiplicação e o alongamento *in vitro* de explantes de macieira é suficiente apenas a presença de citocinina.

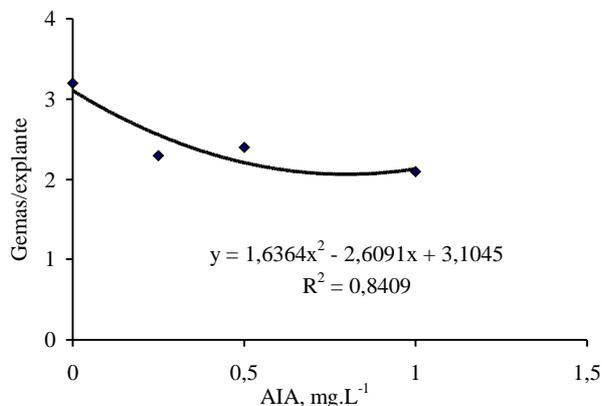


Figura 4 - Número médio de gemas emitidas por explantes de guaco (*Mikania glomerata* Spreng), aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio com diferentes concentrações de AIA.

O maior número médio de gemas por explante foi observado na ausência de AIA com 50% do meio MS (3,3), embora não tenha havido diferença significativa das concentrações de 25 (3,0) e 100% (2,8) dos macronutrientes (Figura 5). Esse maior número de gemas por explante em meio com concentrações mais baixas dos sais do meio MS, na ausência de AIA, estão de acordo com os resultados obtidos por Dzazio et al. (2002) em explantes de porta-enxerto de videira, quando observaram que na fase de alongamento e multiplicação são requeridas menores concentrações dos sais. Nas diferentes concentrações dos sais do meio MS, quando se acrescentou o AIA, houve uma redução no número médio de gemas emitidas por explante, que foi proporcional ao aumento da concentração do AIA.

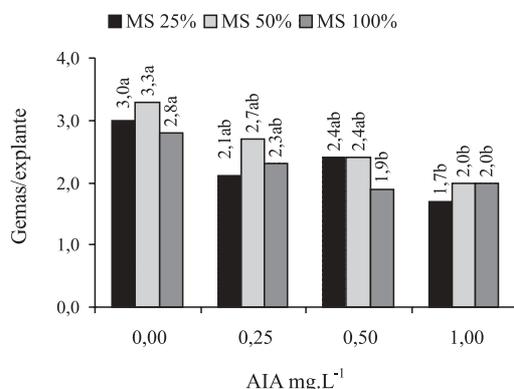


Figura 5 - Número médio de gemas emitidas por explantes de guaco (*Mikania glomerata* Spreng), aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações do meio MS e de AIA.

Conclusões

1. Para a multiplicação de guaco *in vitro*, a concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, na ausência de AIA, é suficiente para a emissão de maior número médio de gemas por explante;
2. O AIA reduz o número médio de brotações por explante e para a emissão de raízes pode ser utilizada a concentração de 0,25 mg.L⁻¹ independentemente da concentração do meio MS.

Referências Bibliográficas

- ABREU, I. N. de. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 101f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- BARNA, K. S.; WAKHLU, A. K. Effects of thidiazuron on micropropagation of rose. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v.31, n.1, p.44-46, 1995.
- BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. das G.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A.; LAMEIRA, O. A. Micropropagação de *Tournefortia cf. paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.1, p.43-49, 2000.
- CONCEIÇÃO, H. E. O. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris sp.*)** 2000. 191f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p.759-764, 2002.
- ERIG, A. C.; FORTES, G. R. de L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus spp.*) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.577-582, 2002.
- FERREIRA, A. F.; FARIAS, A. X.; SILVA, E. S. B. da A.; FORTES, G. R. de L. Enraizamento de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) em diferentes concentrações de sais do meio MS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14, 1996, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1996. p.351.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCPT/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.99-169.
- GUAMANTICA, E. G. C. **Micropropagação *in vitro* de três espécies de *Heliconia* através da cultura de meristemas**. 1998. 56f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.
- GULLO, C.; PEREIRA, C. Medicina alternativa, ou cura no jardim. **Revista Isto É**, v.1513, n.30/09, p.72-78, 1998.
- HAMBURGER, M.; HOSTTEMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, Elmsford, v.30, n.12, p.3864-3874, 1991.

- INNECCO, R. **Propagação vegetativa de pimentão *Capsicum annum* L. através de métodos *in vitro* e em estacas**. 1993. 105f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.
- LALIBERTE, S.; CHRETIEN, L.; VIETH, J. *In vitro* plantlet productions from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. **HortScience**, v.20, n.1, p.137-139, 1985.
- LAMEIRA, O. A.; GOMES, M. R.de.O.; NETO, O. G. de R.; SANTIAGO, E. J. A. de; RODRIGUES, I. A. Efeito de auxinas sobre o enraizamento de estacas de raiz de *Cephaelis ipecacuanha*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.51, n.1, p.81, 1993.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**, 2. ed. Fortaleza: 2000. 346p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.
- PEREIRA, A. M. S.; BERTTONI, B. W.; MORAES, R. M.; FRANÇA, S. C. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.2, n.2, p.17-21, 2000.
- PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Netherlands: M. Nihoff Puhers, 1987. 344p.
- PIERIK, R. L. M.; SEGERS, B. ***In vitro* culture of midrib explants of *Gerbera jamesonii* L.** Dordrecht: M. Nihoff Puhers, 632p. 1989.
- RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F. Propagação de macieira cv. Gala através da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, n.1, p.39-43, 1992
- SABÁ, R. T. **Propagação *in vitro* e dinâmica do crescimento de células de jaborandi**. 2000, 38f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
- SCHWERTNER, A. B. S.; ZAFFARI, G. R. Micropropagação de singônio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.9, n.2, p.135-142, 2003.
- SILVA JÚNIOR, A.; VIZZOTTO, V. J.; GIORGI, E.; MACEDO, S. G.; MARQUES, L. F. **Plantas medicinais, caracterização e cultivo**. Florianópolis: EPAGRI, 1994. 71p. (Boletim Técnico, 68).
- SMITH, S. M.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**, New York, v.57, p.562-568, 1970.
- YUI, E. **Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh)**. 1990. 69f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1990.
- ZIMMERMAN, P. M.; BROOME, G. U. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v.2, p.268-310, 1979.