

Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*¹

Protocol for desinfection, multiplication and rooting *in vitro* of *Spathiphyllum wallisi*

Josefa Diva Nogueira Diniz², Jacqueline Leite Almeida³, Alexandre Bosco de Oliveira⁴ e Antonio Marcos Esmeraldo Bezerra⁵

Resumo - O trabalho teve como objetivo a multiplicação *in vitro* do lírio-da-paz, *Spathiphyllum wallisi* Regel. Para a desinfestação dos segmentos de rizomas foram utilizados o hipoclorito de cálcio e o hipoclorito de sódio (2%) com e sem imersão em álcool (70%). Na multiplicação, os segmentos de caule, retirados de plantas multiplicadas e mantidas *in vitro*, foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e de ANA (0,0 e 0,5 mg L⁻¹). Para a indução de raízes, os explantes foram inoculados em diferentes concentrações dos sais macronutrientes do meio MS (25; 50 e 100%) e diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹). Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso com os tratamentos em disposição fatorial para todos os experimentos. A imersão em hipoclorito de sódio foi o melhor tratamento para a combinação desinfestação/sobrevivência dos explantes. No experimento de multiplicação a maior emissão de gemas foi observada com 2,0 mg L⁻¹ de BAP independente da presença do ANA. No enraizamento de explantes de lírio-da-paz, o meio MS em sua concentração normal (100%), com 1,0 mg L⁻¹ de AIB, favoreceu o enraizamento com plantas bem desenvolvidas e raízes bem formadas.

Palavras-chave - Micropropagação. Reguladores do crescimento. Gemas. Raízes.

Abstract – This work was carried out to determine a methodology for the *in vitro* multiplication of *Spathiphyllum wallisi*. The rhizome segments were disinfected using calcium hypochlorite and sodium hypochlorite at 2% with and without immersion in alcohol 70%. In the multiplication, the stem segments removed from multiplied plants and kept *in vitro* were inoculated in MS medium with different concentrations of BAP and ANA. For root induction, the explants were inoculated in different concentrations of the MS medium salts, and different concentrations of AIB. It was used for all the experiments a complete randomized design with treatments disposed in factorial arrangement. The immersion in sodium hypochlorite was the best treatment for the explant combination desinfection/survival. For the multiplication experiment the greatest buds emission was observed with 2.0 mg L⁻¹ BAP, regardless of ANA presence. For the explants rooting the MS medium in its normal concentration (100%), with 1.0 mg L⁻¹ AIB, enable rooting with great developed plant and well formed roots”.

Key Words - Micropropagation. Plant growth regulators. Buds. Roots.

¹ Recebido para publicação em 28/05/2007; aprovado em 30/10/2007

Pesquisa desenvolvida no Depto de Fitotecnia, CCA/UFC, com recursos do BNB

² Eng. Agrônoma, D.Sc., Pesq. do Depto. de Fitotecnia, CCA/UFC, Caixa Postal 12.168, CEP 60.356-001, Fortaleza, CE, E-mail: dndiniz@ufc.br.

³ Eng. Agrônoma, M.Sc., Pesq. Depto. de Fitotecnia, CCA/UFC, E-mail: jalac@bol.com.br.

⁴ Eng. Agrônomo, Mestrando em Fitotecnia, CCA/UFC, E-mail: aleufc@gmail.com.

⁵ Eng. Agrônomo, D.Sc., Prof. do Depto. de Fitotecnia, CCA/UFC, E-mail: esmeraldo@ufc.br.

Introdução

O lírio-da-paz, do gênero *Spathiphyllum*, da família Araceae, originário da Venezuela e da Colômbia, é uma herbácea perene rizomatosa, com folhas verdes, brilhantes, utilizada como ornamental mesmo quando não há floração. O florescimento ocorre durante a primavera-verão, emitindo uma espata branca que lhe conferiu o nome, lírio-da-paz (LORENZI; SOUZA, 1995; TOMBOLATO; COSTA, 1998). A multiplicação convencional é feita por divisão de touceiras. A propagação *in vitro*, por sua vez pode ser utilizada na produção comercial, possibilitando a obtenção de mudas em grande quantidade em períodos relativamente curtos e sem a necessidade de grande número de plantas matrizes.

Para a micropropagação de uma espécie, há a necessidade de se determinar uma metodologia para cada etapa do processo, que consiste basicamente da assepsia dos explantes a serem utilizados para estabelecimento do cultivo *in vitro* e dos meios adequados à multiplicação e ao enraizamento para que, finalmente, se tenha uma planta em condições de ser aclimatizada.

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) a maior dificuldade para o estabelecimento *in vitro* está em se obter material descontaminado sem causar danos aos tecidos. E como os explantes geralmente são extraídos de plantas mantidas em casa de vegetação, para o sucesso da propagação *in vitro* é essencial que se encontre um método eficiente de desinfestação tanto da planta matriz quanto do explante (GEORGE, 1993). Dessa forma, para cada caso, o tipo de substância utilizada na desinfestação bem como a concentração e o tempo de exposição ao agente desinfestante devem ser previamente testados, de forma a melhor adequá-los à espécie em estudo e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MONTARROYOS, 2000).

No estabelecimento do cultivo *in vitro* de qualquer espécie o primeiro passo é a seleção da fonte de explante mais adequada. Diversos tipos de explantes podem ser utilizados, conforme a espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ERIG; SCHUCH, 2003). No lírio-da-paz, usa-se o rizoma. Normalmente, isso é feito retirando-se as folhas, pecíolos e raízes, cortando-se o explante em fatias transversais e retirando-se a camada externa do segmento danificada pela esterilização (TAKEBAYASHI, 1998).

Os reguladores de crescimento, auxinas e citocininas, são normalmente adicionados ao meio de cultura e sua interação promove respostas morfogênicas nos tecidos, que dependem do tipo e da concentração utilizada

(GEORGE, 1993). O BAP é a citocinina que geralmente apresenta melhores resultados em promover a multiplicação de partes aéreas e a indução de gemas adventícias em diversas espécies, além de ser a de menor custo quando comparada com as outras comercialmente disponíveis (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As auxinas são utilizadas, principalmente, para estimular o crescimento, o enraizamento e a manutenção da dominância apical *in vitro*. Segundo Quoirin e Lepoivre (1977), devem ser adicionadas em concentrações mais baixas que as citocininas, porque podem inibir a multiplicação ou favorecer o enraizamento em excesso ou induzir a formação de calo.

Para o enraizamento, além das auxinas, são feitas alterações na formulação dos sais dos meios de cultivo. Diluições das formulações básicas, geralmente possibilitam melhor enraizamento uma vez que, mesmo na presença de auxinas, altas concentrações dos sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O trabalho teve como objetivo a desinfestação, a multiplicação e o enraizamento *in vitro* de lírio-da-paz.

Material e Métodos

Experimento I - Desinfestação

Para a desinfestação e o estabelecimento *in vitro* foram utilizados rizomas de lírio-da-paz retirados de plantas adultas mantidas em vasos em casa de vegetação. Nos rizomas, com parte do caule, foi feita a retirada das folhas, pecíolos e raízes, depois lavados em água corrente, com o auxílio de uma escova, para a retirada de resíduos superficiais. Em seguida, foi feita uma limpeza retirando-se toda a camada superficial, ficando somente a parte branca mais interna. Nesse material, foi feita a assepsia testando-se os tratamentos: a) imersão em hipoclorito de cálcio 2% (10 minutos); b) imersão em álcool 70% (1 minuto) + hipoclorito de cálcio 2% (10 minutos); c) imersão em hipoclorito de sódio 2% (10 minutos), e d) imersão em álcool 70% (1 minuto) + hipoclorito de sódio 2% (10 minutos), num total de quatro tratamentos. Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2, com cinco repetições de seis explantes por repetição. Após a diluição do hipoclorito de cálcio em água, e a imersão dos rizomas nos tratamentos, sob agitação, estes foram lavados por três vezes consecutivas em água destilada e autoclavada. A camada mais externa foi retirada e os rizomas foram cortados em fatias com aproximadamente 10 mm de diâmetro e 0,4 mm de espessura e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml

do meio MS com 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Depois de inoculados, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura média de 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa em torno de 2000 lux, sendo estas as condições utilizadas nos três experimentos. Aos 34 dias do início da incubação, foram avaliadas a porcentagem de explantes desinfestados, a contaminação por fungos e/ou bactérias e a porcentagem de explantes verdes. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Experimento II - Multiplicação

Neste experimento, foram utilizados como explantes segmentos de caule, de aproximadamente 10 mm de tamanho e com duas a três gemas, retirados de plantas estabelecidas e multiplicadas *in vitro*. Após o preparo, os explantes foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e de ANA (0,0 e 0,5 mg L⁻¹) utilizando-se delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 3, com quatro repetições, cada uma com cinco explantes.

Aos 30 dias após o início da incubação dos explantes, foram avaliados: número de explantes com gemas e número médio de gemas por explante, com os dados sendo submetidos à análise de variância e as médias de tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Experimento III - Enraizamento

Neste experimento de enraizamento, foram utilizados como explantes segmentos de caule de aproximadamente 15 mm de tamanho e com três a quatro gemas laterais, retirados de plantas mantidas *in vitro*. Após preparados, os explantes foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações dos sais macronutrientes (25, 50 e 100%) e diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) em um total de nove tratamentos. Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 3 x 3, com quatro repetições de cinco explantes cada.

Aos 30 dias após o início da incubação, efetuou-se a avaliação do número de explantes que emitiram raízes, número médio de raízes por explante, tamanho médio da maior raiz e altura das plântulas, com os dados sendo submetidos à análise de variância e as médias de tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Resultados e Discussão

Desinfestação

Aos 34 dias de incubação, do total de explantes inoculados, 47% contaminaram. Destes, a maior porcentagem de contaminação foi por bactérias com 91%, sendo a

contaminação por fungos de apenas 9%. A contaminação depende muito do local de cultivo do material a ser multiplicado. Assim, provavelmente a aplicação de tratamentos preventivos (com inseticidas, fungicidas e bactericidas) possa aumentar o grau de desinfestação antes da retirada dos explantes.

Verificou-se interação significativa entre os desinfestantes com e sem a imersão em álcool (Tabela 1), sendo que a maior eficiência na desinfestação foi verificada no tratamento com álcool + hipoclorito de cálcio com 73% de explantes livres de contaminação, seguido dos tratamentos com hipoclorito de sódio somente e álcool + hipoclorito de sódio, com 70% e 57% de explantes não contaminados, respectivamente (Figura 1a). Quando foi utilizado somente o hipoclorito de cálcio, houve maior contaminação (17% por fungos e 69% por bactérias), num total de 83% dos explantes contaminados. Ressalte-se que a presença de fungos foi observada apenas neste tratamento.

A eficiência na desinfestação depende muito da condição fitossanitária da planta matriz determinando a facilidade em descontaminar o explante durante o isolamento. Erig et al. (2003), quando utilizaram explantes de mirtilo *Vaccinium ashei* Reade, verificaram que a contaminação bacteriana foi praticamente nula, não representando problema para o estabelecimento *in vitro*, sendo a maior contaminação por fungos. Já Grigoletto et al. (1999), trabalhando com segmentos apicais de mangaba (*Hancornia speciosa*), obtiveram alta eficiência da assepsia com imersão em álcool 70% por 10 segundos + hipoclorito de cálcio 1% por 10 minutos.

Dos explantes não contaminados a porcentagem de explantes verdes foi significativamente maior quando a

Tabela 1 - Análise de variância para a porcentagem de desinfestação (PD) e porcentagem de explantes verdes (PEV) de lírio-da-paz, aos 34 dias de cultivo *in vitro*, com tratamentos de assepsia com hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio (2%) com e sem imersão em álcool 70%

Desinfestação	-	PD	PEV
Fontes de variação	GL	QM	QM
Desinfestante (D)	1	1680,6 *	1125,0 ns
Álcool (A)	1	2347,0 **	5013,6 **
Interação (D x A)	1	6125,0 **	680,4 ns
Erro	16	263,8	277,7
CV (%)	-	30,0	54,0

* e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns - não significativo

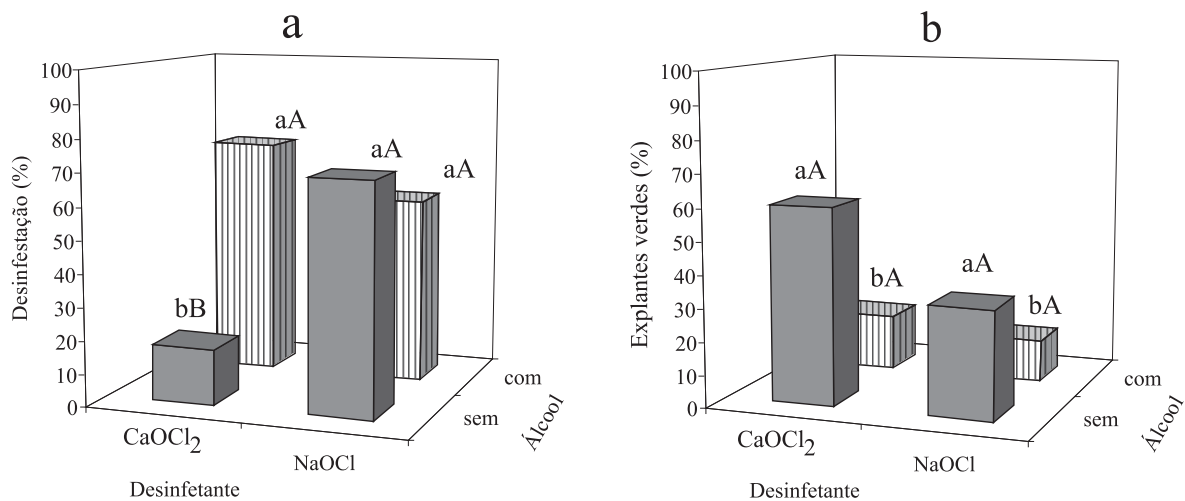


Figura 1 - Porcentagens de explantes livres de contaminação (a) e de explantes verdes (b) de lírio-da-paz, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, após a desinfestação com e sem álcool a 70% e com hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio a 2%. Médias com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

assepsia foi feita com hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio sem imersão em álcool, com 62% e 34%, respectivamente (Figura 1b). Quando foi feita a imersão em álcool a porcentagem de explantes verdes foi de 17% e 13% nos tratamentos com hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio, respectivamente, evidenciando a toxidez pelo álcool. O álcool proporciona a oxidação do material vegetal e talvez a diminuição do tempo à exposição possa reduzir essa oxidação. A maior porcentagem de explantes verdes foi observada no tratamento com hipoclorito de cálcio (62%). Porém, neste tratamento a porcentagem de contaminação foi de 83%. Dessa forma, o tratamento com hipoclorito de sódio, com 34% de explantes verdes, foi o mais eficiente para a combinação desinfestação/sobrevivência dos explantes.

Multiplicação

Verificou-se que aos 30 dias de cultivo *in vitro* todos os explantes haviam emitido novas gemas. De acordo com a análise de variância mostrada na Tabela 2, houve um aumento significativo no número médio de gemas emitidas por explante, quando o BAP foi acrescentado ao meio de cultivo e sua concentração aumentada de 1,0 mg L⁻¹ para 2,0 mg L⁻¹ (Figura 2), independente da concentração de ANA. Em explantes de guaco, Diniz et al. (2006) verificaram o maior número médio de gemas com BAP nas concentrações de 1,0 mg L⁻¹ a 4,0 mg L⁻¹. Entretanto, para a indução de gemas em explantes de *Aloe vera*, Liao et al. (2004) obtiveram melhores resultados com a combinação de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,3 mg L⁻¹ de ANA. Arimura et al. (2000)

também verificaram uma interação significativa entre BAP e ANA no desenvolvimento de brotações de gengibre quando as concentrações desses fitohormônios no meio foram de 1,0 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹, respectivamente. Da mesma forma, Ramirez-Malagon et al. (2001) verificaram as melhores respostas quanto ao número de gemas, diâmetro e altura das plantas de *Spathyphyllum floribundum* L. quando foram adicionados ao meio 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA. Porém, dependendo da espécie, as respostas aos efeitos dos reguladores de crescimento podem ser diferentes. Em porta-enxerto de videira, utilizando diferentes concentrações de BAP e de AIB, Lucas et al. (2006) obtiveram maior número de gemas por brotação e maior altura das plantas, na ausência de BAP. Para *Coffea arabica*, o maior

Tabela 2 - Análise de variância para número médio de gemas emitidas por explante de lírio-da-paz, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes concentrações de BAP e de ANA

Fontes de variação	GL	QM
ANA	1	0,0266 ns
BAP	2	2,9066 *
ANA X BAP	2	0,0866 ns
Erro	18	0,52333
CV(%) = 26,0	-	-

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ns - não significativo

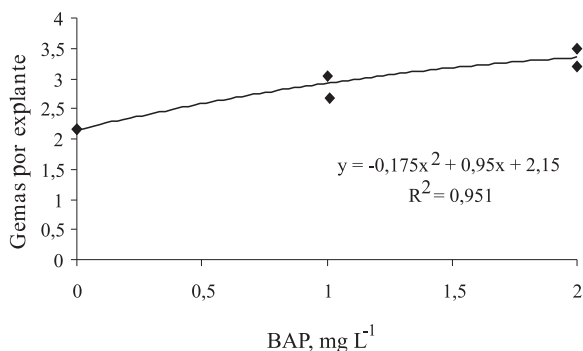


Figura 2 - Número médio de gemas emitidas por explante de lírio-da-paz, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes concentrações de BAP

comprimento de brotações foi obtido por Santos et al. (2005) quando esses utilizaram 12 mg L⁻¹ de BAP.

Enraizamento

Dos explantes inoculados, 96% emitiram raízes aos 35 dias. O aumento no número de explantes com raízes foi favorecido com concentrações mais baixas dos sais, no meio MS, e também pela presença de AIB. A menor porcentagem de explantes enraizados foi observada no tratamento com 100% dos sais no meio MS sem auxina (Figura 3a). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Centellas et al. (1999) quando utilizaram explantes de macieira, cujos resultados evidenciaram uma redução de 60% para 5% na porcentagem de enraizamento quando a concentração dos sais no meio foi aumentada de 50% para 100%. De

Tabela 3 - Análise de variância para número médio de raízes emitidas por explante (NMR), tamanho médio das raízes (TMR) e altura média das plantas (AMP) de lírio-da-paz, aos 35 dias de cultivo *in vitro* em meio com diferentes concentrações dos sais no meio MS e de AIB

Enraizamento	-	NMR	TMR	AMP
Fontes de variação	GL	QM	QM	QM ns
MS	2	51,48**	0,86*	0,28 ns
AIB	2	328,22**	13,23**	1,33**
MS x AIB	4	13,40*	0,09 ns	0,07
Erro	27	4,70	0,23	0,13
CV(%)	-	27,0	18,0	10,0

* e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns - não significativo

acordo com Bertolucci et al. (2000), não somente os reguladores de crescimento afetam a indução e crescimento das raízes, mas também a concentração dos sais no meio.

O número médio de raízes por explante foi maior na presença de AIB com 50% dos sais no meio MS (Figura 3b), verificando-se diferença significativa para a interação entre esses dois fatores (Tabela 3). A redução de 100% para 50% dos sais no meio MS resultou em um aumento significativo no número médio de gemas emitidas por explante. O mesmo foi observado quando AIB foi acrescentado ao meio de cultivo. O efeito das auxinas sozinhas ou em combinação tem sido observado por diversos autores, sendo que de acordo com Hu e Wang (1983), são incluídas em 86% dos meios de enraizamento.

Na ausência de AIB o número médio de raízes por explante foi similar nas diferentes concentrações do meio MS. Já na presença de AIB, o aumento da concentração dos sais resultou num aumento do número médio de raízes emitidas até a concentração de 50%, sem contudo diferir da concentração de 25%. Porém, a combinação de AIB (1,0 e 2,0 mg L⁻¹) com 100% dos sais no meio resultou numa redução significativa do número médio de raízes por explante, não havendo diferença entre esses dois tratamentos. Essa redução no número médio de raízes por explante com aumento da concentração dos sais de 50% para 100% também foi observada por Centellas et al. (1999) em explantes de macieira, cv 'Fred Hough'. Pereira et al. (1999), utilizando as concentrações de 50%; 75% e 100% dos sais no meio, também verificaram que a concentração de 50% foi a que proporcionou maior número médio de raízes em duas cultivares de morangueiro.

O tamanho médio de raízes divergiu nas diferentes concentrações do meio MS e de AIB, porém não houve interação entre os dois fatores (Tabela 3). O acréscimo de AIB ao meio resultou numa redução significativa do tamanho das raízes, sendo essa redução proporcional ao aumento da concentração (Figura 3c). O menor tamanho das raízes foi observado no tratamento com 2,0 mg L⁻¹ e 100% dos sais no meio MS. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), concentrações excessivas de auxina podem favorecer demasiadamente o enraizamento, porém a presença de altas concentrações de sais pode inibir as fases de enraizamento, mais particularmente a de crescimento das raízes, mesmo na presença de auxinas.

Para as diferentes concentrações dos sais do meio MS, o tamanho das raízes foi similar com 25% e 50%. Porém, houve redução significativa no tamanho quando a concentração aumentou de 50% para 100% dos sais. Da mesma forma, Pereira et al. (1999) verificaram que para o

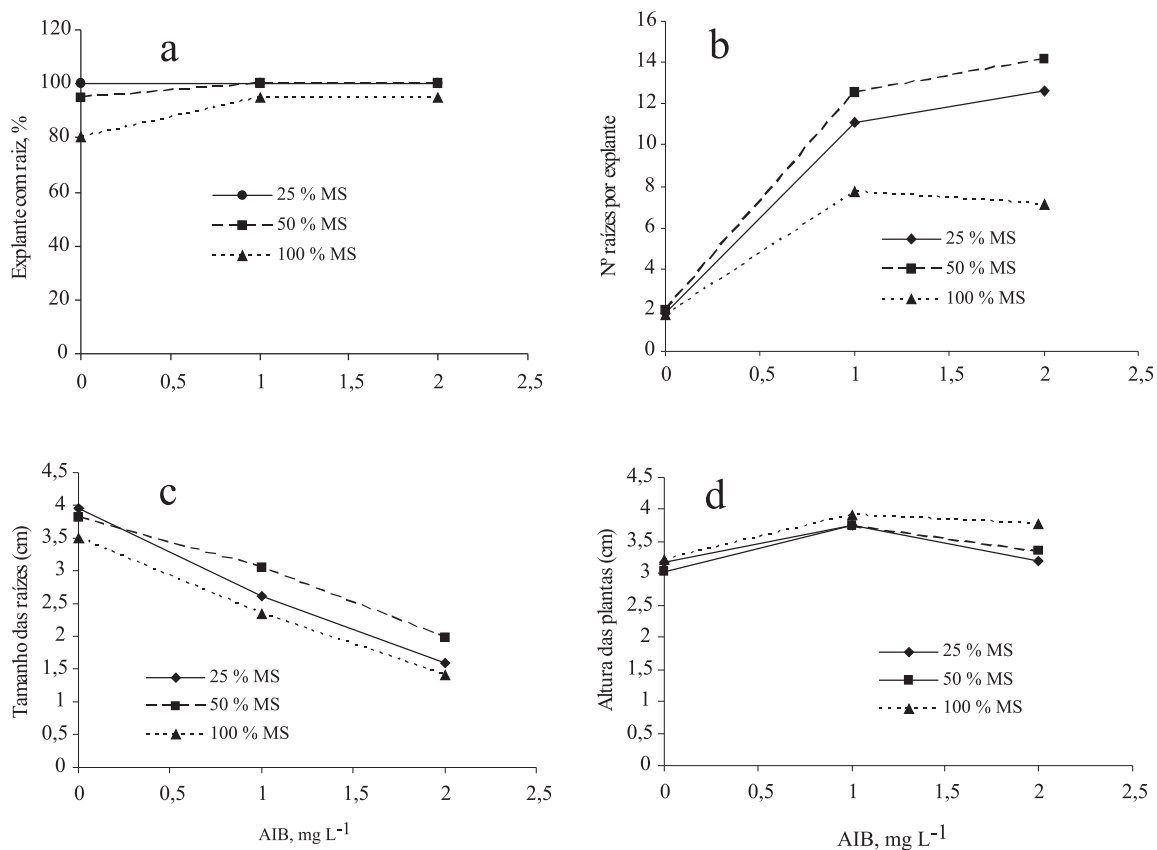


Figura 3 - Porcentagem de explantes enraizados (a), número médio de raízes por explante (b), tamanho da maior raiz (c) e altura das plantas (d) de lírio-da-paz, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, com diferentes concentrações dos sais e de AIB no meio MS

morangueiro cultivar 'Hofla', o comprimento das raízes foi maior que o dobro, com a redução de 100% para 50% dos sais do meio MS. A altura das plantas foi influenciada pelas diferentes concentrações de AIB, mas não apresentou diferença estatística nas diferentes concentrações do meio MS (Tabela 3, Figura 3d). A presença de AIB aumentou de forma significativa a altura das plantas nas concentrações mais altas do meio MS (50% e 100%). Porém, na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de AIB com o meio MS na concentração de 100% de MS as plantas apresentaram melhor aspecto visual, com folhas normais e bem desenvolvidas.

Apesar do maior número de raízes observado nos tratamentos com maiores concentrações de AIB, elas se apresentavam curtas, grossas e mal formadas. Dessa forma, a combinação altura das plantas, número médio de raízes e tamanho de raízes no tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de AIB e 100% dos sais no meio MS mostra ser este o tratamento mais indicado para enraizamento e desenvolvimento normal de lírio-da-paz em cultivo *in vitro*, o que provavelmente deverá favorecer a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização.

Conclusões

1. O hipoclorito de sódio (2%) permite a obtenção de boa porcentagem de desinfestação e de explantes verdes, favorecendo o processo de estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de lírio-da-paz.
2. A concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP favorece o desenvolvimento de gemas em explantes de lírio-da-paz, independentemente da concentração de ANA.
3. A concentração de 1,0 mg L⁻¹ de AIB com 100% dos sais no meio MS, resulta em plantas bem formadas e com bom desenvolvimento quanto ao número, tamanho e qualidade das raízes, sendo, portanto, essa combinação a mais indicada para o enraizamento *in vitro* de lírio-da-paz.

Agradecimento

Ao Banco do Nordeste do Brasil pelo apoio financeiro ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Referências

- ARIMURA, C. T.; FINGER, F. L.; CASALI, V. W. D. Efeito do ANA e do BAP sobre o brotamento de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) em meio geleificado e líquido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 02, n. 02, p. 23-26, 2000.
- BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Micropropagação de *Tournefortia cf paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 03, n. 01, p. 43-49, 2000.
- CENTELLAS, A. Q. et al. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 02; p. 181-186, 1999.
- DINIZ, J. D. N. et al. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 01, p. 59-64, 2006.
- ERIG, A. C. et al. Desinfestação de explantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) visando o estabelecimento de plantas *in vitro*. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 08, n. 01, p. 142-148, 2003.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de plantas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivares MC, Adams e Portugal. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 08, n. 02, p. 107-115, 2003.
- GEORGE, E. F. Equipment and procedures. In: GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. The Technology. Ed. Edington: Exegetics Limited, 1993. v. 01, p. 95-126.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/ Embrapa - CNPH, 1998. v. 01, p. 183-230.
- GRIGOLETTO, E. R.; SILVA Jr., A. F. da; CALDAS, L. S. Desinfestação de explantes adultos de *Hancornia speciosa* Gomez (mangabeira). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, suplemento, p. 101, 1999.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMIRATO, P. V.; YAMADA, Y.; Ed. **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p. 117-227.
- LIAO, Z. et al. Micropropagation of endangered Chinese aloe. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, The Netherlands, v. 76, p. 83-86, 2004.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais no Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1995. 174 p.
- LUCAS, M. K. et al. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira 'Paulsen 1103' com benzilaminopurina e ácido indolbutírico. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 02, n. 01, p. 29-34, 2006.
- MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 36 e 37, p. 5-10, 2000.
- PEREIRA, J. E. S. et al. *In vitro* Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) rooting in different MS medium concentrations. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 01, p. 17-20, 1999.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de Prunus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 78, p. 437-442, 1977.
- RAMIREZ-MALAGON, R. et al. Soot number and shoot size as affected by growth regulators in *in vitro* cultures of *Spathiphyllum floribundum* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 89, p. 227-236, 2001.
- SANTOS, C. G. dos et al. Propagação de *Coffea arabica* cv acaia cerrado por meio do cultivo *in vitro* de embriões. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 01, n. 01, p. 19-23, 2005.
- TAKEBAYASHI, S. S. G. *Spathiphyllum*. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, 1998. (Boletim técnico, 174).
- TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, 1998. (Boletim técnico, 174).