

Composição do meio de cultivo para produção de microplantas de caju-de-árvore-do-Cerrado (*Anacardium othonianum* RIZZ.)

Composition of the cultivation medium for the production of microplants of Cerrado-tree cashew (*Anacardium othonianum* RIZZ.)

Ísis Danielle Sousa⁽¹⁾
Jackellyne Bruna Sousa⁽²⁾
Flávia Dionísio Pereira⁽³⁾
João Das Graças Santana⁽⁴⁾
Aurélio Rubio Neto⁽⁴⁾
Elisvane Silva de Assis⁽⁵⁾

RESUMO

O *Anacardium othonianum* Rizz. é uma planta típica de regiões de clima tropical caracterizada pela aparência exótica e aroma agradável. Na busca de diversificar a produção e atividades que proporcione maior rentabilidade, a micropropagação tem sido uma alternativa para produção em grande escala em curto espaço de tempo. Por isso, objetivou-se com este trabalho determinar as melhores condições *in vitro* para micropropagação dessa espécie, para isso, avaliamos a adição de diferentes concentrações de AIB (Ácido Indolbutírico), sacarose e carvão ativado no meio de cultivo *in vitro*. Foram utilizadas cinco concentrações de AIB (0; 1; 2; 3; 4 mg L⁻¹) e cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45, 60 g L⁻¹) na ausência ou presença de carvão ativado (2 g L⁻¹), em meio WPM 50%. Aos 30 e 60 dias foram feitas avaliações do número de explantes oxidados, comprimento médio e número de folhas por explante. Verificou-se que o meio de cultivo suplementado com carvão ativado e a adição de 4 mg L⁻¹ de AIB, contribuiu para o crescimento de raízes *in vitro* da espécie. Enquanto, que o meio de cultivo com 30 g sacarose e presença de carvão ativado proporcionou maior comprimento dos explantes e maior número de folhas.

Palavras-chave: Frutífera nativa, cerrado, micropropagação.

ABSTRACT

The *Anacardium othonianum* Rizz. It's a typical plant of regions of tropical climate characterized by the exotic appearance and pleasant aroma. In the quest to diversify production and activities that provide greatest profitability, micropropagation has been an alternative for large-scale production in short time. Therefore, the objective of this work is to determine the best *in vitro* results for micropropagation of this species, for this, we evaluated the addition of different concentrations of AIB (Indolbutyric Acid), sucrose and activated charcoal in the *in vitro* culture medium. Five concentrations of AIB (0, 1, 2, 3, 4 mg L⁻¹) and five sucrose concentrations (0, 15, 30, 45, 60 g L⁻¹) were used in the absence or presence of activated charcoal, in WPM 50% medium. At 30 and 60 days, the number of oxidation, average length and number of leaves per explant were evaluated. It was found that the culture medium supplemented with activated charcoal and an addition of 4 mg L⁻¹ of IBA, contributed to *in vitro* root growth. While the culture medium with 30 g L⁻¹ sucrose and the presence of activated charcoal provided a longer length of the explants and a larger number of leaves.

Key words: Native Fruit, Cerrado, Micropropagation.

INTRODUÇÃO

O *Anacardium othonianum* (Rizz.), é uma Anacardiaceae conhecida popularmente como caju-do-cerrado, cajuzinho ou cajuí. É uma frutífera

representativa da biodiversidade do cerrado, com grande importância silvestre e com potencial socioeconômico. Seus frutos são oleaginosos do qual se extrai óleo-resina aplicado para combater

¹ Mestranda em Biodiversidade e Conversação do IF Goiano, Campus Rio Verde - isis_danielle_sousa@hotmail.com

² Doutoranda em Fitotecnia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ - USP) - jackellyne_bruna@hotmail.com

³ Pós-doutoranda, Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos – flavia1808@hotmail.com

⁴ Professor doutor Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde – aurelio.rubio@ifgoiano.edu.br

⁵ Pós-doutoranda, Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde – assisifg@hotmail.com

moléstias cutâneas e quando torramos as castanhas podemos consumi-las. O pedúnculo é carnosos, ácido e refrigerante, considerado antissifilítico. A casca do caule é empregada como antidiarreica, em forma de infuso e decocto (SILVA et al., 2001, AGOSTINI-COSTA et al., 2006), desse modo é bastante evidente o papel dessa espécie para a população humana, já que diferentes partes da planta apresentam uso pela população.

Plantas do gênero *Anacardium* geralmente se propagam sexualmente. Porém, a assincronia no amadurecimento do fruto, germinação irregular em condições naturais e em viveiros são atributos negativos para a obtenção de mudas uniformes. A utilização dessa planta em programas de implantação de pomares comerciais requer a produção contínua e em larga escala de mudas uniformes. Assim, a técnica de micropropagação é uma alternativa viável para contornar as dificuldades de multiplicação da espécie pelos métodos convencionais (PINHAL, 2011; ASSIS, et al., 2012).

As condições de cultivo *in vitro* normalmente proporcionam rápido crescimento das plantas multiplicadas, porém, podem induzir alterações estruturais e fisiológicas tornando as plantas impróprias para sobreviver às condições adversas no ambiente (ROUT et al., 2006). Portanto, há a necessidade de estabelecimento de protocolos confiáveis e reprodutíveis que garantam, de forma eficiente, a multiplicação *in vitro* para atender a demanda comercial (LEITZKE et al., 2010; SILVA et al., 2006; GALVANESE et al., 2007).

Brondani et al. (2012) consideram a formação de raízes um processo que exige elevada energia, por envolver a divisão celular, na qual as células predeterminadas alteram a rota

morfogenética para formar raízes adventícias. As auxinas utilizadas *in vitro* induzem a formação de raízes por estimularem a síntese de etileno nas plantas (NORBERTO et al., 2001). Desse modo, plantas micropropagadas e que possuam um sistema radícula bem desenvolvido apresentam maior capacidade de adaptação e sobrevivência na fase de aclimatização, pois, permitem fixação da planta no substrato e a absorção de água e nutrientes (SALDANHA et al., 2014).

Um fator que é comumente identificado no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas e que limita a produção de mudas em maior escala é a oxidação dos tecidos vegetais quando transferidos ao meio de cultivo. Esse processo ocorre como resposta da liberação de compostos fenólicos pelo tecido lesado. Esses compostos são oxidados pelas enzimas polifenoloxidasas, produzindo substâncias tóxicas que inibem o crescimento dos explantes ou os levam a morte. O uso de antioxidantes é uma das alternativas para contornar este problema. Estes podem ser incorporados ao meio de cultivo, como por exemplo, o carvão ativado (ANDRADE et al., 2000; SATO et al., 2001).

Muitas espécies para crescerem *in vitro* necessitam de fonte externa de carboidratos, sendo a sacarose a mais utilizada. Essa necessidade ocorre em resposta às condições impostas ao cultivo, como baixa irradiância e trocas gasosas que levam as plantas a perderem o autotrofismo. A sacarose proporciona altas taxas de crescimento e desenvolvimento na maioria das espécies (JESUS et al., 2011).

Trabalhos iniciais com micropropagação de *A. othonianum* (Rizz.) foram desenvolvidos por Assis et al. (2012), no qual estabeleceram o volume (15

mL) e a melhor concentração de sais (50 ou 100%) do meio de cultivo MS e WPM. Posteriormente, Assis et al. (2015) verificaram grande plasticidade anatômica das folhas *A. othonianum* (Rizz.) submetidas a condições de cultivo fotomixotrófico e heterotrófico. No entanto, ainda não há estudos para determinação da melhor composição do meio de crescimento que estimule, de modo eficiente, o enraizamento e, por isso, objetivou-se com esse trabalho determinar as melhores condições para enraizamento dos explantes utilizando diferentes componentes no meio (AIB, sacarose e carvão ativado).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O experimento foi realizado no Laboratório de Culturas de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano - Câmpus Rio Verde – Goiás, Brasil. Os frutos *A. othonianum* (Rizz.) foram obtidos na Fazenda Gameleira, Município de Montes Claros de Goiás-GO com coordenadas geográficas latitude (S) – 16° 06' 20"; longitude (W) - 51° 17' 11' e altitude de 592 metros. A exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás - Câmpus Jataí, sob o número de coleta 3793.

Após 30 dias de plantio das sementes, as plântulas de *A. othonianum* (Rizz.) cultivadas em bandejas com 4 cm de comprimento foram utilizadas como fonte de segmentos nodais, ou seja, os explantes. Os explantes passaram por processo de desinfecção, onde foram revestidos por gaze e colocados em água corrente com três gotas de detergente neutro por 15 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos,

e em seguida submersos em solução de hipoclorito de sódio (20 %) durante 15 minutos. Para finalizar a desinfecção, os explantes foram lavados três vezes em água destilada e autoclavada. Os segmentos nodais após desinfecção foram utilizados nos experimentos I e II.

Experimento (I): Diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *A. othonianum* (Rizz.)

Os segmentos nodais de *A. othonianum* (Rizz.) foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 25 mL de meio WPM (LLOYD E MCCOWN 1980) com 50% dos sais. Foi avaliado o efeito das concentrações 0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose na ausência ou na presença de 2 g L⁻¹ de carvão ativado. Utilizou-se 3,5 g L⁻¹ de ágar (Marca: Dinâmica®) para solidificar o meio, 30 µM de 6-Benzilaminopurina, conforme recomendações de Assis et al. (2012) e o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da autoclavagem (121 °C por 20 minutos).

Para este estudo, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5 (concentrações de sacarose) x 3 (presença e ausência de carvão ativado) em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e com irradiância de 45 ± 10 µmol m⁻²s⁻¹. Foram realizadas duas avaliações, aos 30 e 60 dias após a inoculação e foram considerados o número de explantes oxidados, comprimento (cm) e número de folhas das plântulas.

Experimento (II): Enraizamento *in vitro* de *A. othonianum* (Rizz.) sob diferentes concentrações do Ácido Indolbutírico (AIB)

Segmentos nodais *A. othonianum* (Rizz.) foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo meio de cultivo WPM (LLOYD E MCCOWN,

1980) com 50% dos sais. Utilizou-se 3,5 g L⁻¹ ágar (Marca: Dinâmica[®]) para solidificar o meio, 2 g L⁻¹ de carvão ativado e 30 g L⁻¹ de sacarose. Foram avaliadas as concentrações de 0; 1; 2; 3; 4 mg L⁻¹ de Ácido Indolbutírico (AIB) (Marca: Vetec[®]). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da autoclavagem (121 °C por 20 minutos).

Para este segundo estudo, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e com irradiância de 45 ± 10 μmol m⁻²s⁻¹. Aos 30 e 60 dias de inoculação, foram avaliados comprimento das plântulas (cm), número de gemas e porcentagem de enraizamento.

Análise Estatística

Em ambos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) aplicando-se o teste F. Detectado diferença entre os fatores, foi realizada análise de regressão ou teste de Tukey, com $p \leq 0,05$. Foi utilizado o software SISVAR (FERREIRA, 2011) para o teste estatístico e o software SigmaPlot 11.0 para produção dos gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento (I): Diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *A. othonianum* (Rizz.)

Não ocorreu interação entre concentração de sacarose e carvão ativado. Desta forma, os efeitos de forma independente, sendo o modelo de regressão quadrática que explicou melhor os dados.

A menor porcentagem de oxidação dos explante ocorreram em meio contendo sacarose entre 30 a 40 g L⁻¹, tanto aos 30 como aos 60 dias

após inoculação (Figura 1A e B). Taxas elevadas de oxidação foram observadas na ausência de sacarose e com carvão ativado, chegando a mais de 60% aos 30 dias de cultivo (Figura 1A). Após 60 dias de cultivo *in vitro* observou-se taxa de 80% de oxidação na ausência de sacarose e na ausência de carvão (Figura 1B).

A presença de carvão ativado no meio de cultivo diminuiu consideravelmente a porcentagem de oxidação. Média de 38,22% de oxidação foi observada em meio sem carvão e na presença do carvão a média foi 10,79%. Este resultado foi obtido aos 60 dias de cultivo (Figura 1B). Desta forma, concluímos que, apesar de não haver interação entre os fatores foi possível inferir sobre a concentração ideal de sacarose combinada com carvão ativado para proporcionar maior sobrevivência das plântulas de *A. othonianum* (Rizz.) *in vitro*. A figura 2B demonstra plântulas saudáveis, com folhas verdes e vigorosas obtidas no cultivo com concentrações entre 30 e 45 g L⁻¹ de sacarose e na presença de carvão.

De acordo com Villa et al. (2014), a presença de carvão ativado no meio de cultivo tem particularidade de adsorção de substâncias tóxicas, desta forma, auxilia na prevenção de oxidação dos tecidos vegetais em contato com meio de cultivo. Porém, a quantidade de carvão a ser adicionada no meio de cultivo é variada, sendo recomendado no cultivo *in vitro* de orquídeas *Brassocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow* 137,5 mg L⁻¹ (GUSON et al., 2012). No cultivo de *A. othonianum* (Rizz.) a presença de 2,0 g L⁻¹ de carvão diminuiu a taxa de oxidação, permitindo melhor regeneração da plântula

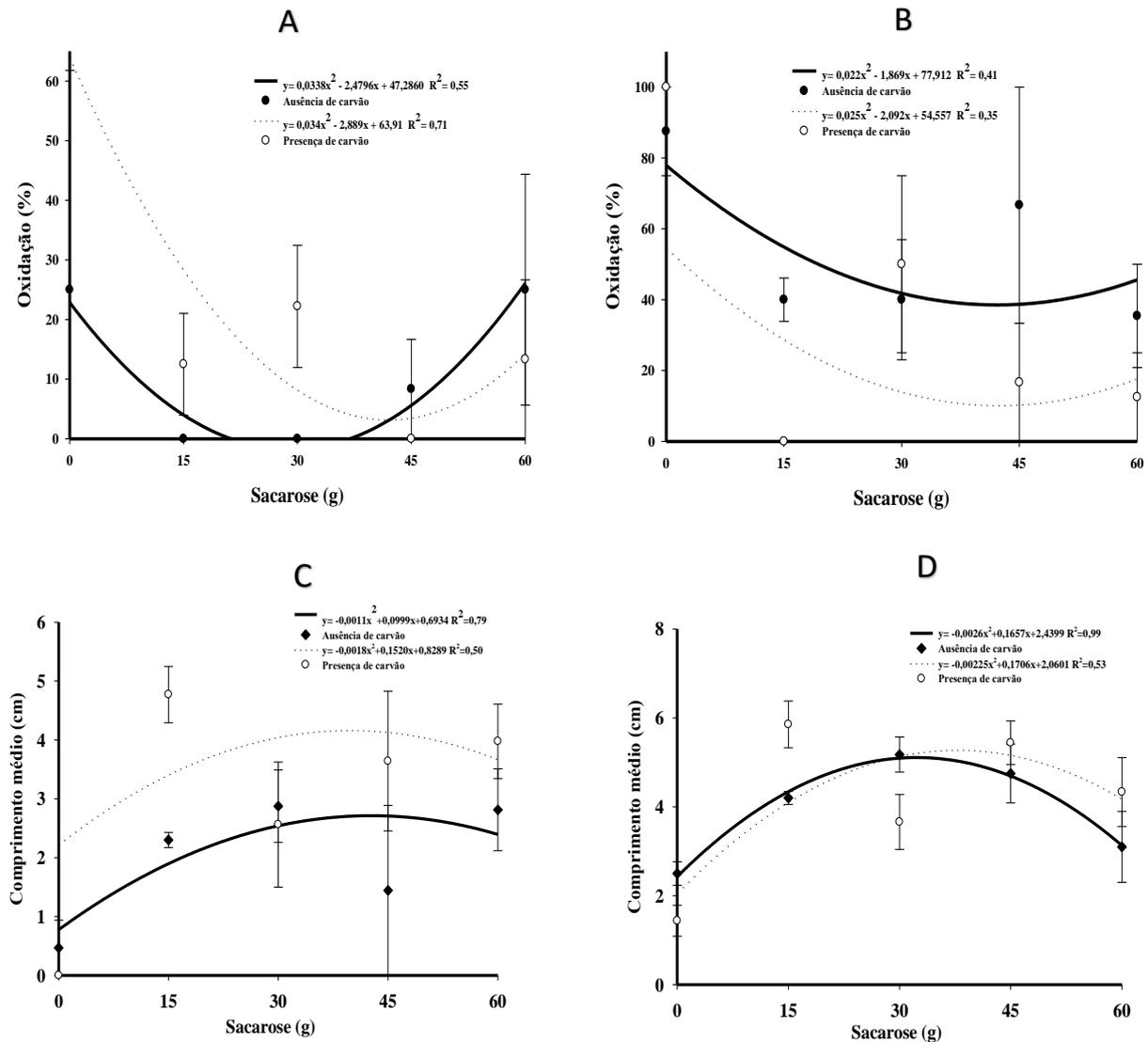


Figura 1. Avaliação da porcentagem de oxidação aos 30 dias (A) e 60 dias (B) e comprimento médio das plântulas aos 30 dias (C) e 60 dias (D) de *A. othonianum* (Rizz.) em diferentes concentrações de sacarose na ausência e presença de carvão ativado.

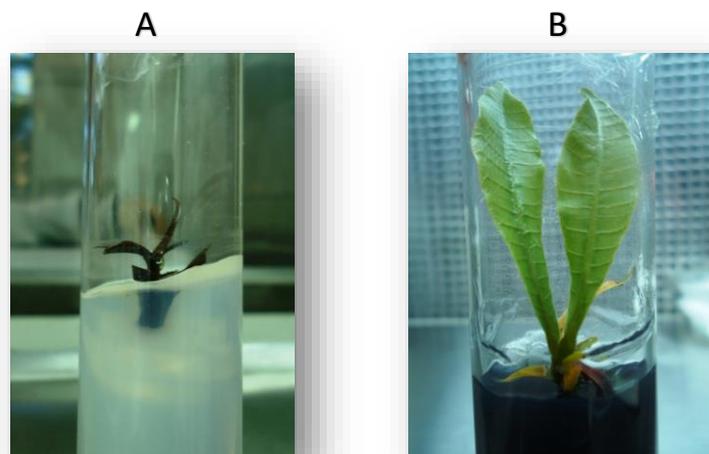


Figura 2. Plântulas de *A. othonianum* (Rizz.), aos 60 dias cultivo *in vitro* na ausência (A) e presença de carvão ativado (B). Barra: 1,5 cm.

O comprimento médio das plântulas de *A. othonianum* (Rizz.) aumentou até a dose de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 1C e D). Aos 30 dias, o ponto máximo para o comprimento das plântulas foi obtido com 30 g L⁻¹ de sacarose. Nesta concentração, observou-se 5,12 cm de comprimento na ausência de cavão e, na presença, 5,30 cm (Figura 1C). Já aos 60 dias de cultivo o ponto máximo de comprimento foi com adição de 42,81 g L⁻¹ de sacarose, com comprimento médio de 4,08 cm (Figura 1D).

Quanto ao número de folhas, observou-se que, níveis muito baixos ou muito elevados de sacarose 15 e 60 g L⁻¹, proporcionaram menores valores 3,51 e 3,28, respectivamente. Ponto máximo (4,5 folhas por planta) foi observado com a utilização de 35,45 gL⁻¹ (Figura 3A). Maior

número de gemas axilares foi obtido com 45,18 gL⁻¹ de sacarose (Figura 3B). Na ausência de sacarose observou-se baixo número de folhas e gemas.

Algumas espécies possuem a capacidade de crescer *in vitro* na ausência de sacarose tendo condições (luz e trocas gasosas) suficientes para que a mesma realize fotossíntese, como observado no cultivo *in vitro* de [*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen] (IAREMA et al., 2012) e com híbridos de *Doritaenopsis* (SHIN et al., 2014). Neste estudo, notou-se necessidade dos explantes de *A. othonianum* (Rizz.) por fonte de energia metabólica primária. Porém, concentrações elevadas de carvão proporcionaram aumento na oxidação dos explantes (Figura 1A e B) e queda no crescimento da parte aérea.

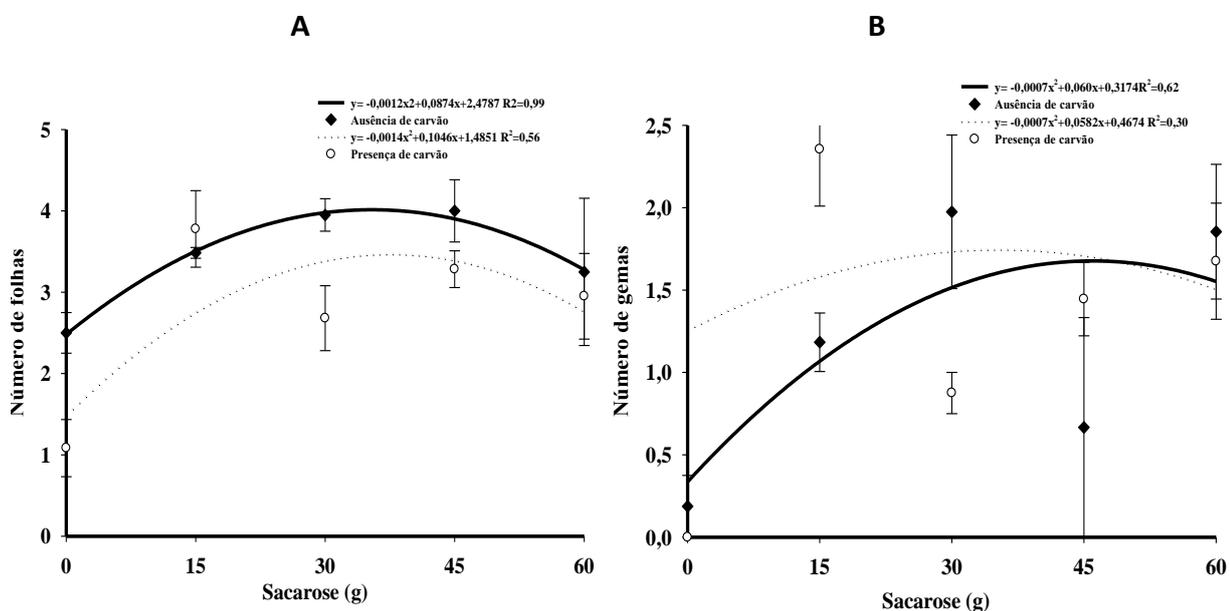


Figura 3. Número de folhas por plântula (A) e número de gemas por explantes aos 60 dias de cultivo de *A. othonianum* (Rizz.) em diferentes concentrações de sacarose na ausência e presença de carvão ativado.

A necessidade de sacarose como fonte de energia metabólica para o crescimento e desenvolvimento de plântulas *in vitro* tem sido registrado em outros trabalhos. Sendo 30 g L⁻¹ a melhor concentração de sacarose para o cultivo de Corango-de-batata [*Pfaffia tuberosa* (Spreng.)] (FLORES et al., 2013) e de embriões zigóticos de macaúba (BANDEIRA et al., 2013). Segundo estes autores o meio de cultivo acrescido de sacarose contribuiu para o desenvolvimento de plantas viáveis ou saudáveis. A Concentração de 90 g L⁻¹ de sacarose não causou desordens fisiológicas no maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) (ROSSAROLLA et al., 2012).

Experimento (II): Enraizamento *in vitro* de *A. othonianum* (Rizz.) sob diferentes concentrações do Ácido Indolbutírico (AIB)

Ocorreu diferença no enraizamento em função das diferentes concentrações (0; 1; 2; 3; 4 mg L⁻¹) de AIB. A maior porcentagem de enraizamento e comprimento médio de raiz foi observada nas doses de 4 mg L⁻¹ de AIB, sendo os valores médios de 32,5% e 2,95 cm, respectivamente (Figura 4A e B). Este resultado foi observado aos 30 dias de cultivo *in vitro* e, aos 60 dias não houve diferença para estas variáveis, com valores médios de 36,4% e 3,14 cm, para porcentagem de enraizamento e comprimento médio de raiz.

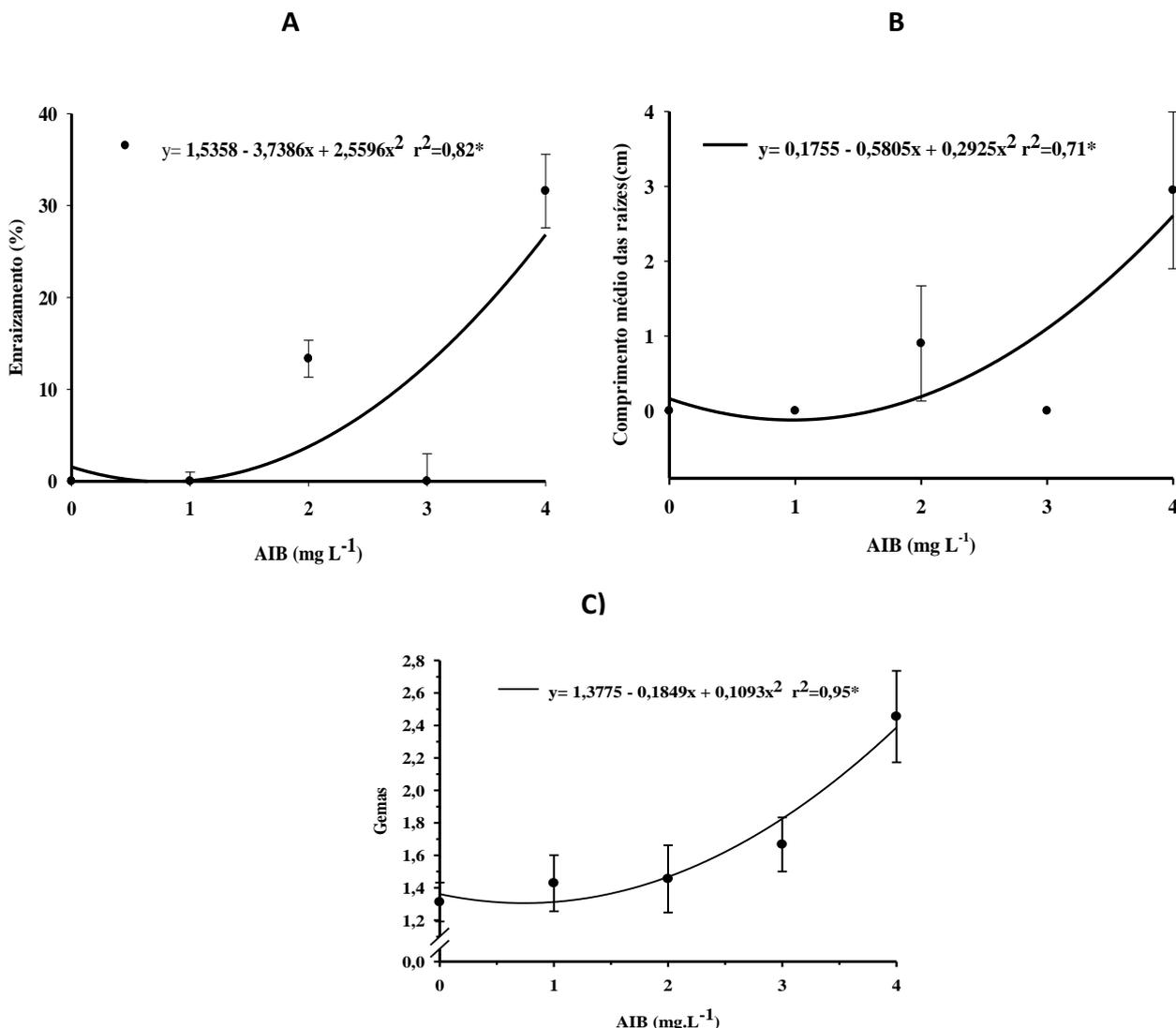


Figura 4. Enraizamento (A), comprimento médio das raízes (B), aos 30 dias e (C) número de gemas por explante aos 60 dias de cultivo de *A. othonianum* (Rizz.) em diferentes concentrações de AIB.

A adição de 4 mg L⁻¹ de AIB proporcionou maior crescimento das plântulas de *A. othonianum* (Rizz.) e conseqüentemente maior número de gemas axilares (2,45) (Figura 3C). Explantes que possuem mais gemas permitem multiplicação mais rápida, pois dessas são extraídos novos segmentos que podem ser submetidos à formação de novas plântulas.

Observamos que a presença de 4 mg L⁻¹ do AIB no meio de cultivo para o crescimento de *A. othonianum* (Rizz.) foi importante para acelerar a obtenção de plântula. Resultados similares aos obtidos nesse trabalho foram obtidos por Reddy e

Saritha (2013) em gardênia (*Gardenia latifolia* Ait.). Concentrações de AIB mais baixas podem ser suficientes para estimular o crescimento da plântula *in vitro*, como Azuca-caá (*Stevia rebaudiana* Bertoni) que necessitaram de apenas 3 mg L⁻¹ de AIB para a formação de raízes (DEY et al., 2013). Já Werner et al. (2013) relataram que apenas 2 mg L⁻¹ foram suficientes para induzir o crescimento de raízes *in vitro*. Esses resultados reforçam a resposta específica de cada espécie, sendo, assim, necessário a realização de estudos visando o estabelecimento de protocolos específicos para cada espécies de interesse.

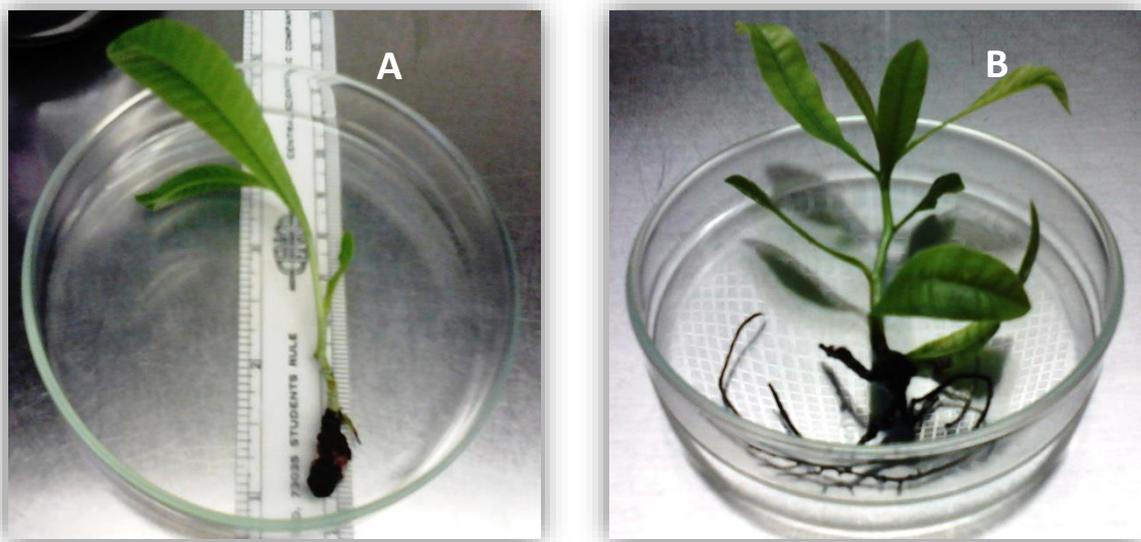


Figura 5. Plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz., com 60 dias de cultivo *in vitro*. Segmento nodal estabelecido *in vitro* em meio WPM 50% suplementado com carvão ativado (A) e adicionado AIB (B). Rio Verde, GO, 2014. Foto: Ísis Danielle Sousa.

Para Ramos et al. (2003), as auxinas são essenciais no processo de enraizamento, possivelmente por estimularem a síntese de etileno, favorecendo, assim, à emissão de raízes (Figura 5B). Vários trabalhos consideram o uso de auxina como promissora no cultivo *in vitro*, como observado em *Vaccinium ashei* Reade (SILVA et al., 2006) e *Aechmea blanchetiana* Baker (GALVANESE et al., 2007). No cultivo de híbridos de Garnem (*Prunus amygdalus* x *Prunus persica*) observou-se alta porcentagem de enraizamento e comprimento da raiz nas as concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) de AIB em estudo, porém, utilizando-se 0,5 mgL⁻¹ a formação de calos foi menor (REZAEI E HOSSEINPOUR, 2015).

De acordo com Souza e Pereira (2007), além da presença de regulador de crescimento no meio de cultivo, são vários os mecanismos envolvidos no enraizamento *in vitro*. Muitos trabalhos têm sido realizados com êxito, porém, para várias espécies as condições ótimas de enraizamento ainda não foram elucidadas. Desta forma, toda informação sobre esse processo contribuirá para viabilizar o estabelecimento de protocolos de micropropagação, em especial para as espécies com potencial econômico como é o caso da *A. othonianum* (Rizz.). O próximo passo das nossas pesquisas se baseará em protocolos de aclimatização em casa de vegetação para posterior transplante para pomares de produção a fim de concluir toda a cadeia do processo de implantação de pomares com clones oriundos de plantas com características superiores.

CONCLUSÕES

Utilizando diferentes meios de cultivo foi possível obter microplantas de *A. othonianum* enraizadas com elevada qualidade fisiológica. Pois, determinamos que o meio de cultivo suplementado com 2 g L⁻¹ de carvão, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4 mg L⁻¹ de AIB foram efetivos para o estabelecimento, crescimento e enraizamento de microplantas obtidas a partir de segmentos nodais de caju-de-árvore-do-cerrado. Essa determinação favorecerá a produção de mudas dessa espécie utilizando a cultura de tecidos vegetais, uma ferramenta capaz de disponibilizar mudas com elevada qualidade genética e fitossanitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; VIEIRA, F.R.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Espécies de maior relevância para a região Centro-Oeste**. In: PEREIRA, A. V. et al. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cap. 1. p 12-24, 2006.
- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-80, 2000.
- ASSIS, K.C.; SILVA, F.G.; PEREIRA, F.D.; VASCONCELOS-FILHO, S.C.; MENEZES, C.C. Effects of Photomixotrophic Conditions and Type of Culture Vessel Closure on *Anacardium othonianum* Rizz. Grown *In Vitro*. VIII Simpósio Internacional de cultivo *in vitro* e Melhoramento Horticultura. **Acta Horticulturae**, v. 1083, s/n, 2015.
- ASSIS, K.C.; PEREIRA, F.D.; CABRAL, J.S.R.; SILVA, F.G.; SILVA, J.W.; SANTOS, S.C. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. **Acta Scientiarum. Agronomy** (Impresso), v. 34, n.1, p. 77-83, 2012.
- BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; LANI, E.R.G.; OTONI, W.C. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos

maduros de macaúba influenciada por temperaturas de armazenamento dos frutos e concentrações de sacarose. **Revista Árvore**, v. 37, n. 4, p. 691-700, 2013.

BRONDANI, G.E.; HOFFMANN, J.M.E.; GOLÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Determinação do teor de carboidratos em minicepas de *Eucalyptus benthamii*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.1, p.51-60, 2012.

DEY, A.; KUNDU, S.; BANDYOPADHYAY, A.; BHATTACHARJEE, A. Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Comptes rendus biologiques**, v. 336 n. 1, p. 17-28, 2013.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FLORES, R.; ULIANA, S.C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T.M.B. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 192-199, 2013.

GALVANESE, M.S.; TAVARES, A.R.; AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; CHU, E.P.; STANCATO, G.C.; HARDER, I.C.F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (BAKER) L. B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, v. 54, n. 1, p. 063-067, 2007.

GUSON, R.R.; MORAES, C.P.; RONCONI, C.C. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento *in vitro* de *Cattleya pumila* HOOK. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 5, n. 3, p. 551-563, 2012.

IAREMA, L.; CRUZ, A.C.F.; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 227-238, 2012.

JESUS, A. M. S.; VILLA, F.; LARA, C. C.; PASQUAL, M. Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estágios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro. **Revista Ceres**, v.58, n.6, p. 679-684, 2011.

LEITZKE, L.N.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração

de citocinina na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v.30, n.2, p.421-327, 1980.

MARAFON, A.C. Análise quantitativa de crescimento em Cana-de-açúcar: Introdução ao procedimento prático. **Documentos: Embrapa**, Dezembro, 2012.

MOREIRA, M.A.; CARVALHO, J.G.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C.B.; SILVA, A. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006.

NORBERTO, P. M.; CHALFUN, N.N.J.; PASQUAL, M.; VEIGA, R.D.; PEREIRA, G.E.; MOTA, J.H. Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência Agrotecnologia**, v.25, n.3, p.533-541, 2001.

PINHAL, H.F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P.A.P.; SILVA, V.J.; MORAIS, T.P.; LUIZ, J.M.Q. Aplicações de cultura de tecidos vegetais em fruteira do cerrado. **Ciência Rural**, v.41, n.7, p.1136-1142, 2011.

RAMOS, J.D.; MATOS, L.E.S., GONTIJO, T.C.A., PIO, R., JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C. Enraizamento de estacas herbáceas de 'mirabolano' (*Prunus cerasifera* EHRN) em diferente substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.1, p.189-91, 2003.

REDDY, Y. M.; SARITHA K. V. *In vitro* clonal propagation of *Gardenia latifolia* Ait.: a toy making woody tree. **Agroforest System**, v. 87, n. 3, p. 591-598, 2013.

REZAEI, A.; HOSSEINPOUR, B. In vitro propagation and rooting of Garnem rootstock. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v. 16, n.1-2, p. 41-47, 2015.

ROSSAROLLA, M.D.; TOMAZETTI, T.C.; DA SILVA, F.A.; HEIFFIG-DEL AGUILA, L.S.; DEL AGUILA, J.S. Germinação *in vitro* do grão de pólen de maracujá-doce (*Passiflora alata*) com diferentes níveis de sacarose. **Journal System**, v.4, n.2, p. 2012.

ROUT, G.R.; MOHAPATRA, A.; MOHAN JAIN, S. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on presente scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 531-560, 2006.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; ROCHA, D.I.; CAVATTE, P.C.; DETMANN, K.S.C.; TANAKA, F.A.; DIAS, L.L.C.; DAMATTA, F.M.; OTONI, W.C. CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffiaglomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 87-99, 2014.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; SOUZA, C.V. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SHIN, K-S.; PARK, S-Y.; PAEK, K-Y. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, n. 1, p. 26-33, 2014.

SILVA, D.B. da; SILVA, J.A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. de. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 179p. 2001.

SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; ERIG, A.C.; ANTUNES, L.E.C. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e *frio no estabelecimento in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) Cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SILVA, E.F. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio knudson com adição de vitaminas do meio MS, benzilaminopurina e carvão ativado. **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 683-694, 2014.

WERNER, A.M.; PLA, G.P. Influência do ácido indolbutírico (AIB) e da sacarose no desenvolvimento radicular em guaco (*Mikaniaglomerata*) cultivado *in vitro*. **Cadernos Acadêmicos**, v. 4, n. 2, p. 215-217, 2013.