

INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS.
CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA
GUILHERME AUGUSTO RODRIGUES DE SOUZA

**FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS QUE AFETAM A MICROPROPAGAÇÃO *IN*
*VITRO***

SÃO JOÃO EVANGELISTA
2018

GUILHERME AUGUSTO RODRIGUES DE SOUZA

**FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS QUE AFETAM A MICROPROPAGAÇÃO *IN*
*VITRO***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* São
João Evangelista como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Me. Fernanda Lima Barroso

SÃO JOÃO EVANGELISTA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S719f Souza, Guilherme Augusto Rodrigues de.
2017

Fatores bióticos e abióticos que afetam a micropropagação in vitro.
/ Guilherme Augusto Rodrigues de Souza – 2018.
56f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) –
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais –
Campus São João Evangelista, 2018.

Orientadora: Mestre Fernanda Lima Barroso.

1. Cultura de tecidos. 2. Micropropagação. 3. Produção de mudas.
4. Biotecnologia. I. Souza, Guilherme Augusto Rodrigues de. II. Instituto
Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus
São João Evangelista. III. Título.

CDD 660.6

Elaborada pela Biblioteca Professor Pedro Valério

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais
Campus São João Evangelista

Bibliotecária Responsável: Rejane Valéria Santos – CRB-6/2907

GUILHERME AUGUSTO RODRIGUES DE SOUZA

FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS QUE AFETAM A MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Me. Fernanda Lima Barroso

BANCA EXAMINADORA

FLBarroso

Orientador: Prof^a. Me. Fernanda Lima Barroso
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista

Ivan da C. I. Fontan

Prof. Me. Ivan da Costa Iheú Fontan
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista

F. Couto

Prof^a. Dr^a. Fabiana Aparecida Couto
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista

"Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos, os meus caminhos, diz o SENHOR, porque, assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos, mais altos do que os vossos pensamentos."

(Isaías 55: 8-9)

À minha mãe e meu pai por, sem sombra de dúvidas, serem meus baluartes e
serem acima de tudo a mais pura inspiração de cada sonho meu.
Ao meu irmão pelo companheirismo e apoio inenarráveis.
E aos amigos por serem meus ajudadores durante meus maiores conflitos.

...**Dedico** este trabalho com o maior amor que há em mim!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, sobretudo, pela dádiva maravilhosa de existir e pela graça incalculável do Teu Amor que me alcança como filho, servo e amigo.

Á minha mãe e meu pai por serem meu refúgio, meu lugar secreto e seguro, que mesmo diante de minhas inúmeras falhas jamais deixaram de acreditar em mim e em meus sonhos.

Ao meu irmão por todo apoio, companheirismo e afeto demonstrados para além do que as palavras possam descrever.

Aos meus amigos pelos ombros, palavras, lágrimas, sorrisos e histórias a mim propiciados, em especial Luiz Otávio, Shayane, Luiz Felipe, Nathan e Clinton.

Aos meus pastores e também amigos que foram essenciais na minha caminhada, em especial Alexsandro e Fátima, Marcos e Dani, Mangelstron e Laudicéia.

Aos meus colegas de turma por me suportarem no decorrer destes cinco anos, vocês estão descritos em minha história, em especial Regina, Emanuelle, Leandro, Alba Nise, Cleicimar, Kátia e Flamínia.

Aos meus inúmeros colegas de república por me permitirem o crescimento e amadurecimento vividos.

Aos funcionários e colaboradores do IFMG – Campus São João Evangelista por todo afinho e dedicação.

À minha professora e também orientadora deste trabalho, Fernanda Lima Barroso, por ser uma das pessoas mais admiráveis nesta minha trajetória, por sua competência, profissionalismo, confiança e carinho dedicados a mim.

À banca examinadora por aceitar o convite.

E por fim, Ao IFMG – Campus São João Evangelista e todo seu corpo docente por todo conhecimento ofertado, por todas as oportunidades disponibilizadas e por todo crescimento pessoal e profissional permitidos.

RESUMO

A cultura de tecidos vegetais, também chamada de micropropagação *in vitro*, se baseia na técnica de propagar plantas a partir de células, tecidos ou órgãos vegetais em tubos de ensaio ou similares de vidro. Esta técnica de propagação tem ganhado lugar de destaque entre as técnicas de biotecnologia relacionadas aos cultivos vegetais por permitir, entre outros, a melhoria na qualidade de mudas ofertadas. Entretanto, um dos maiores problemas relacionados à cultura de tecidos é a existência de diversos fatores, sejam eles bióticos ou abióticos, preponderantes para o sucesso ou o fracasso da técnica em escala comercial. Dentre estes fatores citam-se a origem do explante, a assepsia no processo, o meio nutritivo utilizado, a qualidade da luz fornecida, a temperatura de cultivo, bem como a possibilidade de ocorrência de oxidações fenólicas, vitrificações e contaminações do material. Em função destes aspectos de extrema importância na cultura de tecidos, esta revisão objetivou a investigação destes fatores, bem como dos trabalhos desenvolvidos sobre os mesmos, trazendo resultados e perspectivas para a melhoria do processo produtivo de mudas micropropagadas. Esta investigação demonstrou que apesar de serem cruciais para o sucesso dos cultivos *in vitro*, estes fatores são passíveis de controle em função de sua adequação de acordo com as espécies trabalhadas, bem como dos métodos empregados no cultivo, o que tem reduzido significativamente as perdas no processo produtivo de mudas, além de potencializar a utilização e expansão desta técnica em escala comercial.

Palavras-chaves: Cultura de tecidos. Micropropagação. Produção de mudas. Biotecnologia.

ABSTRACT

Plant tissue culture, also called in vitro micropropagation, is based on the art of propagating plants, tissues or plant organs in test tubes or similar glass tubes. This technique of advertising has gained a prominent place among the biotechnology techniques related to vegetable crops, since it allows, among others, an improvement in the quality of seedlings offered. There are many other factors, such as biotic or abiotic, preponderant to the success or failure of the technique on a commercial scale. Among these factors, the middle of the energy production, a culture temperature, as well as a possibility of occurrence of phenolic oxidations, vitrifications and contaminations of the material. Regarding product development projects, such as the projects developed on them, bringing results and perspectives to the process of production of micropropagated seedlings. This is a demonstrated demonstration that it is a success of in vitro cultures, these factors are controllable due to their suitability according to the areas worked, as well as the methods used in cultivation, which has significantly reduced as non-process losses production of seedlings, in addition to enhancing the use and expansion of this technique on a commercial scale.

Key words: Tissue culture. Micropropagation. Seedling production. Biotechnology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 MICROPROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	12
3 FATORES QUE AFETAM A MICROPROPAGAÇÃO	14
3.1 SELEÇÃO DE EXPLANTES	14
3.2 ASSEPSIA DE EQUIPAMENTOS E MATERIAL VEGETAL.....	14
3.3 MEIO NUTRITIVO	16
3.3.1 Sacarose	17
3.3.2 Vitaminas e aminoácidos	19
3.3.3 Hormônios	20
3.3.3.1 Auxinas.....	21
3.3.3.2 Citocininas.....	23
3.3.3.3 Giberelinas.....	25
3.3.3.4 Etileno.....	27
3.3.3.5 Ácido abscísico.....	29
3.3.4 Ágar	30
3.3.5 Carvão ativado	32
3.4 LUZ.....	33
3.5 TEMPERATURA.....	36
3.5 OXIDAÇÃO FENÓLICA	37
3.6 VITRIFICAÇÃO	39
3.7 VARIAÇÃO SOMACLONAL	39
3.8 CONTAMINAÇÕES MICROBIANAS	41
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, com a expansão e diversidade de tecnologias voltadas ao setor agrícola, tem-se buscado o aperfeiçoamento de técnicas em todo o setor produtivo voltado ao campo, desde a produção de sementes, passando pelo manejo adequado de cada cultura trabalhada, até a disponibilização do produto ao consumidor, atendendo a todos os critérios de qualidade e custo esperados pelo mesmo (MARTINS, 2017).

Sob essa perspectiva, nas últimas décadas tem-se notado um aumento significativo no uso de técnicas de propagação mais elaboradas, seja em campo ou em meio laboratorial, visando sempre a melhoria da qualidade das mudas ofertadas. Com isso, uma das técnicas utilizadas que ganhando destaque, é a cultura de tecidos vegetais *in vitro*, ou como é comumente chamada, micropropagação *in vitro*, que consiste na técnica de propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro, sob adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂ (CID, 2014).

Essa técnica tem sido utilizada, principalmente, para espécies que apresentam difícil manejo de propagação vegetativa, como é o caso de muitas espécies florestais, que possuem sementes com elevado índice de dormência, além de apresentarem difícil propagação por meio de partes vegetativas, como caules, apresentam longo período de cultivo (WENDLING, 2003). Outro uso comum da cultura de tecidos vegetais tem como finalidade a melhoria na qualidade de mudas ofertadas, tanto em seus aspectos morfológicos quanto em seus aspectos sanitários. Além disso, a cultura de tecidos tem conquistado destacada posição na recuperação de plantas livres de vírus e de outros agentes causadores de doenças, como cita Junghans et al. (2013).

Em suma, a micropropagação *in vitro* pode ser usada em qualquer espécie vegetal, entretanto, sua aplicação está diretamente relacionada à espécie que se pretende trabalhar, uma vez que, em função de caracteres intrínsecos de cada espécie, faz-se necessária a realização de estudos voltados à escolha do melhor método de micropropagação a ser utilizado, bem como a adequação das técnicas referentes ao cultivo *in vitro*, objetivando desta forma, a potencialização dos processos envolvidos (GEORGE et al., 2008).

Apesar de ser caracterizada como uma técnica de uso crescente dentro da biotecnologia voltada à agricultura, sabe-se que esta pode ser influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos, desde a escolha da planta matriz até os processos finais de

aclimação, que podem contribuir tanto para o sucesso quanto para o fracasso da micropropagação (CARVALHO & VIDAL, 2003).

Dentro deste contexto esta revisão bibliográfica objetiva explicar sobre os principais fatores bióticos e abióticos que podem afetar as técnicas de micropropagação *in vitro*, demonstrando resultados a partir da análise de trabalhos realizados por diversos autores, a fim de contribuir e auxiliar em pesquisas a partir da divulgação detalhada e consubstanciada dos trabalhos disponíveis.

2 MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO*

A micropropagação *in vitro*, enquanto técnica biotecnológica aplicada à produção vegetal, tem permitido a obtenção de mudas de plantas que apresentam difícil multiplicação pelos métodos convencionais, originando plantas saudáveis e geneticamente uniformes, em um período de tempo reduzido (CARVALHO & VIDAL, 2003).

O cultivo de partes de plantas, também chamadas de explantes, em meio de cultura adequado e asséptico, sob condições ideais de temperatura, umidade, fotoperíodo e irradiância, controladas em sala de crescimento, permite o cultivo de células, tecidos e órgãos por meio de diferentes técnicas de micropropagação (FUZITANI & NOMURA, 2004).

De acordo com Scagliusi (2008), a micropropagação baseia-se na característica fundamental de células vegetais chamada de totipotência, isto é, “a capacidade que a célula vegetal possui de se organizar em um novo indivíduo, mantendo a informação genética necessária, sem haver recombinação gênica, dando origem a uma nova planta”. Esta característica permite, portanto, o desenvolvimento de diversas técnicas que possibilitem a regeneração de plantas, cujo potencial está intimamente relacionado ao tipo de planta, ao órgão utilizado e ao estágio de desenvolvimento do mesmo (FUZITANI & NOMURA, 2004).

Dentre as técnicas mais usuais na cultura de tecidos pode-se citar a proliferação de gemas axilares, que se baseia na proliferação de gemas pré-formadas na planta matriz, as quais são excisadas e inoculadas em meio de cultivo, a partir do qual serão induzidas a estímulos *in vitro* que permitirão o desenvolvimento destas gemas, possibilitando uma alta fidelidade genética do material de origem (XAVIER & OTONI, 2009).

Outra técnica amplamente utilizada nos laboratórios comerciais de cultura de tecidos é a organogênese, que induz a formação de gemas adventícias a partir dos tecidos vegetais que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, podendo ser direta quando forma gemas direto no tecido inoculado, ou indireta quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calos no tecido vegetal (CARVALHO et al., 2006).

A embriogênese somática é uma técnica de micropropagação através da qual, , “células somáticas se desenvolvem e formam estruturas semelhantes a embriões zigóticos com uma série de estádios embriológicos característicos, sem fusão de gametas”, podendo

ocorrer de forma direta quando os embriões são formados diretamente no tecido vegetal inoculado, ou indireta quando ocorre a indução da formação de calos embriogênicos do tecido, onde posteriormente serão formados os embriões zigóticos (CARVALHO et al., 2006)

Dentre outras técnicas envolvendo a cultura de tecidos pode-se citar o cultivo de meristemas, o cultivo de protoplastos, o cultivo de anteras, cultivo de embriões zigóticos ou imaturos e o cultivo de células isoladas ou massa de tecido desorganizado. Apesar de serem técnicas mais elaboradas e complexas têm grande utilização quando se pretende fazer a purificação da planta matriz, além de permitir sua aplicação recorrente em programas de melhoramento genético (CARVALHO & VIDAL, 2003).

A escolha da técnica utilizada para o processo de micropropagação de plantas constitui-se, portanto, em um fator primordial no sucesso de um procedimento. Entretanto, apesar de extremamente importante, as técnicas aplicadas aos cultivos *in vitro* estão sujeitas à diversos outros fatores, que podem influenciar toda a cadeia produtiva de mudas micropropagadas, tanto bióticos, tais como o tipo de explante, a possibilidade de ocorrência de contaminações, processos de oxidação e vitrificação, quanto abióticos, como o meio de cultivo e seus constituintes, os fatores físicos da sala de crescimento, entre outros (ANDRADE, 2002).

3 FATORES QUE AFETAM A MICROPROPAGAÇÃO

3.1 SELEÇÃO DE EXPLANTES

A micropropagação vegetativa de uma planta, de acordo com Vasil e Hidelbrant (1965), só é possível a partir da utilização de alguma parte específica da planta que se pretende perpetuar. Esta parte específica é chamada de explante, podendo ser um segmento de tecido ou órgão, como fragmentos de raízes, hipocótilos, epicótilos, cotilédones, caules, flores, folhas, entre outros (TORRES et al, 2000). A regeneração e obtenção de uma nova planta a partir do cultivo destes segmentos, são possíveis graças à capacidade morfogênética e totipotencial das células vegetais (VASIL; HILDERBRANT, 1965).

Em algumas espécies, como por exemplo, no maracujá (*Passiflora* spp.), são relatados alguns trabalhos realizados utilizando-se diferentes tipos de explantes, como segmentos nodais e internodais (KANTHARAJAH e DODD, 1990; DREW, 1991; FARIA e SEGURA 1997); gemas apicais (SCORZA e JANICK, 1980; DREW, 1991; FARIA e SEGURA, 1997; JUNGHANS et al., 2002), protoplastos (DORNELAS, 1994; OTONI et al., 1996); primórdios de brotos (KAWATA et al., 1995) e discos foliares (MONTEIRO-HARA, 2000).

Para tanto, a escolha do tipo de explante que será utilizado deve estar intimamente relacionada à espécie que se pretende micropropagar, bem como a disponibilidade de material vegetativo, o nível de contaminação, a juvenilidade do tecido e até mesmo à estação do ano em que estes serão coletados (CID, 2014). Entretanto, outros fatores podem influenciar o estabelecimento destes explantes no meio de cultivo, como o seu requerimento nutricional, que pode variar em função do explante escolhido, o nível de diferenciação celular e a viabilidade do explante (PIERIK, 1990; CID, 2014).

3.2 ASSEPSIA DE EQUIPAMENTOS E MATERIAL VEGETAL

O sucesso da micropropagação além de estar relacionado com a qualidade do explante e da técnica utilizada, se relaciona também à assepsia do material vegetal, bem como dos equipamentos utilizados do decorrer do processo, buscando-se eliminar e prevenir a ocorrência de contaminações microbianas que são prejudiciais no estabelecimento do cultivo *in vitro* (LEIFERT et al., 1994; SILVA et al., 2003). Segundo

Souza et al. (2006) contaminações exógenas são passíveis de serem controladas quando são provocadas por fungos e bactérias, entretanto, quando de origem endógena, geralmente ocasionadas por vírus e organismos endofíticos, as contaminações podem ser limitantes na micropropagação, envolvendo perdas de tempo, recursos e material genético.

Comumente a assepsia dos equipamentos que devem ser utilizados no processo de micropropagação é feita baseando-se em protocolos laboratoriais preestabelecidos. De acordo com Cid (2014), o procedimento de assepsia da câmara de fluxo laminar pode ser realizado com álcool 70%, enquanto pinças e bisturis utilizados devem ser imersos em álcool 95% e posteriormente flambados. Já a vidraria que será utilizada, bem como o papel-filtro e alguns outros materiais devem ser, antes de todo o processo, esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 121°C, em uma pressão de uma atmosfera.

A desinfestação e/ou assepsia dos explantes ou material vegetal destinado ao cultivo *in vitro* pode ser realizado a partir de métodos protocolados, ou em alguns casos deve ser realizada a determinação do método ideal de desinfestação, uma vez que a abrasão provocada pelo desinfetante no tecido ou órgão pode ser severa prejudicando a sua regeneração *in vitro* (CID & ZIMMERMANN, 2006). A assepsia de explantes é relatada por vários autores, através da utilização de produtos químicos como hipoclorito de sódio (PEREIRA et al, 2009) e utilização, em alguns casos, de antibióticos no meio de cultura (PEREIRA et al., 2009; ERIG; SCHUCH, 2003; TANPRASERT & REED, 1998; REED et al., 1998).

Segundo Kaneco & Morohashi (1998), os hipocloritos têm sido utilizados no processo de desinfestação, devido ao fato de serem oxidantes enérgicos e permitirem sua fácil remoção através de lavagem. Além disso, estes são citados como estimulantes da germinação, por sua capacidade de estimular a atividade da α -amilase ou por promover a quebra de dormência.

Em uma pesquisa realizada por Pereira et al. (2010) trabalhando com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação e estabelecimento de explantes de bananeira “Grande Naine”, foi observado que explantes desinfestados com NaClO a 2,0% de cloro ativo não apresentaram nenhum tipo de contaminação, enquanto nos tratamentos com decréscimo da concentração de cloro ativo do desinfetante apresentaram maiores porcentagens de contaminação do meio de cultivo.

Diniz et al. (2008), estudaram o potencial de desinfestação de hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio, ambos a 2%, e álcool 70% em explantes de *Spathiphyllum wallisi*,

sob diferentes tempos de imersão dos mesmos, e verificaram através deste trabalho que, para a espécie estudada, o tratamento envolvendo a imersão dos explantes em álcool 70% seguida de imersão em hipoclorito de cálcio apresentou a maior eficiência de desinfestação, com 73% de explantes livres de contaminação. Entretanto, o uso isolado do hipoclorito de cálcio apresentou a menor eficiência de desinfestação.

Outro importante trabalho relacionado à ocorrência de contaminações microbianas no meio de cultivo foi desenvolvido por Araújo et al. (2012), em que testaram a utilização de eritromicina, ampicilina e cloranfenicol no meio de cultivo de *Myrciaria dubia*. De acordo com os resultados obtidos pelos autores supracitados, a suplementação do meio de cultivo com o antibiótico ampicilina mostrou-se eficiente no controle de contaminações bacterianas, mesmo em baixas concentrações. Entretanto, tanto a eritromicina quanto o cloranfenicol se mostraram fitotóxicos ao estabelecimento dos explantes.

Com base nestes resultados, pode-se observar que a escolha e utilização do método de assepsia se fundamentam na sua capacidade desinfetante e em sua capacidade de permitir o estabelecimento dos explantes, o que muitas vezes requer testes para aferir seu potencial de utilização.

3.3 MEIO NUTRITIVO

Na cultura de tecidos vegetais *in vitro*, como visto, quando se trabalha com um explante de qualidade elevada e sua inoculação é feita sob condições assépticas rigorosas, a possibilidade do sucesso no estabelecimento das plântulas é grande, entretanto, outro fator pode influenciar a eficiência de seu desenvolvimento, sendo este o meio nutritivo no qual o tecido ou órgão vegetal será inoculado (CARVALHO & VIDAL, 2003). Além de desempenhar papel no suporte e/ou sustentação do explante, o meio de cultivo é fundamental para suprir os nutrientes, orgânicos e inorgânicos, necessários para a sobrevivência e desenvolvimento do mesmo, seja este liquefeito ou solidificado com ágar ou outra substância que o substitua (CARVALHO, 1996).

A composição do meio nutritivo a ser utilizado pode ser variável em função da espécie que se pretende trabalhar e em função dos objetivos que se pretende atingir na micropropagação. No entanto, assim como o estabelecimento vegetal em campo requer um adequado suprimento de minerais no solo para favorecer o seu desenvolvimento, os cultivos *in vitro* exigem a presença e balanço de macro e micronutrientes no meio de

cultivo (CID, 2014). A escolha do meio pode ser feita levando-se em conta protocolos já estabelecidos, como o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), B5 (GAMBORG et al., 1968), e o SP (CID, 2005), ou pode-se fazer a adequação do meio por meio de tentativa e erro, visando sempre a obtenção de um meio que melhor atenda às exigências nutricionais da espécie inoculada.

Golle et al. (2012), testaram o efeito dos meios MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM no desenvolvimento de diferentes tipos de explantes de *Eugenia involucrata* e perceberam que os meios nutritivos influenciaram o enraizamento da espécie de maneira diferenciada, sendo que o meio $\frac{1}{2}$ MS apresentou maior formação de raízes e o MS menor formação, e o WPM se mostrou intermediário entre os dois, o que segundo os autores pode estar ligado à relação C/N, que no meio $\frac{1}{2}$ MS passou por uma redução no nitrogênio no meio e manutenção das fontes de carboidratos, favorecendo desta forma o processo de enraizamento.

Radmann et al. (2009), estudando a influência dos meios de cultivo MS, $MS\frac{1}{2}N$, QL e WPM e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp., verificaram que o número de brotações por explante foi maior para os meios QL e MS, no entanto, para a porcentagem de crescimento das brotações os meios QL e WPM se mostraram mais eficientes. Estes resultados corroboram para a afirmativa feita acima de que a escolha do meio está diretamente relacionada ao objetivo do cultivo *in vitro*, uma vez que escolha de um meio em detrimento de outro pode favorecer ou não o melhor desenvolvimento de uma variável específica.

Além de macro e micronutrientes presentes nos meios de cultivos vistos acima, outros constituintes do meio são de extrema importância, podendo sua utilização ser obrigatória ou facultativa para o sucesso do cultivo, como a sacarose, vitaminas, inositol, hormônios, ágar, entre outros que poderão ser vistos em sequência.

3.3.1 Sacarose

O nível ou concentração de sacarose no meio de cultivo é um importante fator atuante no desenvolvimento adequado dos explantes, visto que, em decorrência da limitação da fotossíntese na sala de crescimento a planta não é capaz de sintetizar fotoassimilados que supram as exigências para seu desenvolvimento *in vitro* (CID, 2014).

A sacarose é, portanto, a fonte de energia mais comumente utilizada nos meios nutritivos, permitindo as mais altas taxas de crescimento, na maioria das culturas.

Apesar de ser considerada como de importância primária no cultivo *in vitro*, devido ser um substrato de crescimento e influenciar o ciclo celular e processos de diferenciação (VAZ, 1998), o uso de concentrações elevadas de sacarose no meio de cultivo pode ocasionar reduções nas taxas fotossintéticas *in vitro*, uma vez que o excesso de carboidrato reduz o estímulo da plântula a produzir fotoassimilados necessários para sua sobrevivência (DIGNART, 2006). Em resposta à má formação da clorofila e do ‘maquinário’ fotossintético, muitas das plântulas cultivadas *in vitro* sob elevadas concentrações de sacarose tendem a não resistir à etapa de aclimação, reduzindo assim o número de mudas viáveis para o transplântio (DIGNART, 2006). As concentrações utilizadas giram em torno de 2% a 4%, sendo que concentrações menores podem ocasionar a clorose das folhas, e concentrações maiores podem resultar em problemas de excessivo potencial osmótico do meio, gerando assim a deterioração das plântulas (DIGNART, 2006).

Maldaner et al. (2014), analisando o efeito de concentrações de sacarose na morfogênese de *Desmodium incanum* observaram que estas diferentes concentrações não foram capazes de alterar a altura das brotações, tampouco o número de raízes formadas. Entretanto, concentrações muito elevadas de sacarose foram responsáveis por promover uma redução no número de brotações e de folhas formadas, enquanto as menores concentrações levaram a resultados totalmente inversos. Estes resultados puderam ser também observados em um estudo realizado por Júnior et al. (2012) em que testaram a influência de diferentes concentrações de sacarose no cultivo de *Cattleya loddigesii* e obtiveram uma maior média para número de folhas com concentrações moderadas do carboidrato, enquanto a ausência do mesmo e suas elevadas concentrações ocasionaram redução de raízes e folhas.

Jesus (2011), trabalhando com café arábica, avaliou o efeito das concentrações de sacarose no cultivo de embriões de frutos *in vitro* juntamente com diferentes estádios de maturação dos frutos, e concluiu que, apesar de ocorrer a germinação dos embriões em 100% dos tratamentos avaliados e a interação ter sido significativa entre os fatores, as melhores respostas foram obtidas em concentrações medianas de sacarose, uma vez que a ausência ou a presença de baixas concentrações da fonte de carbono no meio, ocasionam a atrofia das plântulas, enquanto concentrações relativamente altas resultam no aumento do

potencial osmótico do meio, o que interfere na absorção de sais a partir do estabelecimento do gradiente de concentração entre a planta e o meio.

3.3.2 Vitaminas e aminoácidos

Na micropropagação *in vitro* a presença de vitaminas no meio de cultivo é muito importante, pois elas influenciam o crescimento e a morfogênese das plântulas cultivadas nestes meios, devido ao fato destas substâncias serem requeridas como catalisadores metabólicos em muitos processos enzimáticos na célula vegetal (GEORGE, 1993), e em alguns casos, segundo Canhoto (2010), a ausência de algumas delas pode ser um fator limitante da morfogênese.

As vitaminas mais comumente encontradas nos meios de cultivo são aquelas pertencentes ao complexo B, que são hidrossolúveis. Dentre elas pode-se citar a tiamina em concentrações de 0,1 a 10 mg L⁻¹, niacina ou ácido nicotínico e piridoxina nas concentrações de 0,1 a 1 mg L⁻¹ (Torres et al., 2001). Além destas, o *mio*-inositol é considerado uma vitamina do complexo B importante nos meios de cultura, por retardar a senescência das plantas, devido à sua provável interação com as auxinas e citocininas (CANHOTO, 2010).

De acordo com Canhoto (2010), apesar das plantas serem capazes de sintetizar compostos orgânicos nitrogenados a partir de nitratos e amônia, a adição de aminoácidos, como glicina, triptofano e fenilalanina, tem sido por vezes observada nos meios de cultivo, principalmente por favorecer a proliferação celular e a regeneração *in vitro*.

Em um trabalho desenvolvido por Silva (2003), ao estudar o efeito de diferentes concentrações de meio Knudson e vitaminas do meio MS no cultivo de orquídeas do gênero *Brassiocattleya* e *Laeliocattleya*, observou influência significativa das concentrações de vitaminas do meio MS para as variáveis número de brotos, número de folhas, número de raízes e comprimento médio radicular. Segundo os resultados obtidos no trabalho, concentrações de vitaminas superiores a 104,8% promoveram uma melhor resposta para o número de brotos, além de promoverem o crescimento do explante, sendo esta a sua principal função. Já para o número de folhas, percebeu-se que o aumento gradativo da concentração de vitaminas do meio MS reduziu a emissão de folhas novas, entretanto aumentou a quantidade de raízes formadas e influenciou benéficamente o tamanho médio destas raízes.

Villa et al. (2008), verificando o efeito de diferentes concentrações de glicina e inositol no meio de cultivo *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp.) e videira (*Vitis spp.*), observaram que estas concentrações influenciaram o número de folhas das plântulas de amoreira-preta, sendo que o aumento das concentrações de inositol possibilitou o aumento no número de folhas, atingindo o seu maior número na concentração de 400 mg L⁻¹ de inositol na ausência de glicina. Já nas plântulas de videira observou-se que o número de folhas aumentou gradativamente com o aumento das concentrações de glicina, enquanto que com o aumento das concentrações de inositol o número de folhas foi diminuindo.

3.3.3 Hormônios

De acordo com Cid (2014), “os hormônios são biomoléculas produzidas pela planta, cuja finalidade é induzir respostas fisiológicas, tais como a indução de raízes, indução de brotos, alongamento de entrenós, entre outros”. Estas biomoléculas estão intimamente envolvidas no sucesso obtido com a regeneração de plantas *in vitro*, pois elas atuam na regulação dos mecanismos de desenvolvimento das plantas (CANHOTO, 2010).

Os denominados hormônios são substâncias endógenas essencialmente produzidos nos tecidos vegetais, podendo ou não atuarem no tecido onde foram produzidos. Quando estes não atuam *in loco*, eles são transportados até o tecido onde desempenharão o seu papel fundamental. Entretanto, quando se trabalha com substâncias exógenas e sintéticas que desempenham papel análogo ao dos hormônios nos tecidos vegetais, estas são denominadas de reguladores de crescimento (CANHOTO, 2010).

Estes reguladores de crescimento quando adicionados ao meio de cultivo induzem respostas fisiológicas aos explantes, promovendo então o seu desenvolvimento *in vitro*. Dentre os reguladores de crescimento mais usuais na cultura de tecido pode-se citar as auxinas e citocininas, e em alguns casos faz-se uso de giberelinas, etileno e ácido abscísico (FURTADO; 2009), os quais serão descritos mais detalhadamente adiante. A suplementação do meio de cultivo com reguladores de crescimento é feita necessariamente para suprir a falta de teores de hormônios endógenos, uma vez que o explante se encontra desligado da planta matriz e, por consequência, do tecido de produção destes hormônios (BORGATTO & HAYASHI, 2002).

3.3.3.1 Auxinas

As auxinas são hormônios vegetais que necessariamente estão envolvidos no crescimento vegetal, e na cultura de tecidos a utilização de reguladores de crescimentos com função análoga à das auxinas estimula a indução de calos a partir de um explante e também o enraizamento a partir de brotos (CID, 2014). Ao nível da planta como um todo, as auxinas estão relacionadas ao fototropismo, ao geotropismo, à dominância apical e à iniciação e alongação radicular (CASTRO et al. 2005). Sua atuação está normalmente associada a outros hormônios como a citocinina e o etileno, estimulando o alongamento celular e consequentemente o aumento do volume da célula através da ativação de um mecanismo quimiosmótico que promove a extrusão de prótons, e com isso a acidificação do apoplasto e ativação de expansinas associadas ao alongamento da parede celular (CANHOTO, 2010).

As formas mais comuns de reguladores de crescimento análogos à auxina adicionados aos meios de cultura são os ácidos indolacético (AIA), indolbutírico (AIB), naftalenoacético (ANA), o 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-picolínico (Picloram), além de outros que podem atuar com posição ambígua de auxina e citocinina, como o Tidiazuron ou TDZ (CID, 2014; CANHOTO, 2010;). As respostas promovidas pela adição destes reguladores de crescimento ao meio de cultivo podem ser as mais diversas possíveis, levando-se em conta o tipo de auxina utilizada, bem como suas concentrações e períodos de avaliação dos explantes e/ou plântulas.

Radmann et al. (2002), avaliaram o efeito de diferentes concentrações de três tipos auxinas (AIA, AIB, ANA) no enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de macieira tanto na presença quanto na ausência de luz, e evidenciaram a importância da utilização de auxinas para indução de raízes adventícias nos explantes testados. De acordo com seus resultados, sob condições de escuro as maiores porcentagens de formação de raízes foram nas concentrações mais altas avaliadas de AIA (20, 50, 100 μ M). Avaliando-se os cultivos tratados com AIB e ANA, observou-se que as maiores porcentagens de raízes foram obtidas a partir da utilização de menores concentrações destes reguladores de crescimento. Sendo que o aumento das concentrações de AIB e ANA podem ocasionar fitotoxicidade aos explantes, devido ao fato destes compostos não sofrerem a fotooxidação sob condições de escuro. A não ocorrência da fotooxidação induz, portanto, a formação de calos na base dos explantes e diminuição do desenvolvimento da parte aérea.

Em um trabalho realizado por Ferreira et al. (2001), estudando o desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em função da concentração de auxinas em meio de cultivo líquido suplementado ou não com água de côco, foi observado que a utilização de diferentes concentrações de 2,4-D induziu a formação de calos em segmentos de eixos embrionários da espécie estudada, principalmente na região do hipocótilo, no entanto, nas maiores concentrações pode-se observar que estas podem anular a formação do embrião. Nos testes realizados a partir de segmentos cotiledonares, observou-se a formação de calos sob menores concentrações do 2,4-D, enquanto o aumento destas concentrações induziu a formação de uma massa calosa esbranquiçada que posteriormente sofreu escurecimento em tratamentos suplementados com água de coco, cuja combinação pode suprimir a formação de calos embriogênicos.

Souto et al. (2010), a partir da observação dos efeitos do ácido naftalenoacético (ANA) no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor*, perceberam que aos 180 dias de cultivo nas concentrações de 0,5 e 2 mg.L⁻¹ foram obtidas as melhores médias para o número de folhas formadas, enquanto na concentração de 0,25 mg.L⁻¹ além da redução no número médio de folhas percebeu-se a inibição no desenvolvimento de raízes nos explantes, refletindo uma fase em que as plantas ainda estão se adaptando às condições de cultivo *in vitro*. Entretanto, quando avaliadas aos 360 dias verificou-se melhores médias para a formação de raízes e folhas nas concentrações de 0,5 e 1 mg L⁻¹ de ANA, respectivamente, demonstrando resultado de um metabolismo de crescimento mais ajustado.

Além da influência das auxinas sobre os parâmetros biométricos das plantas, Ori (2006), estudando a sua influência sobre o teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* percebeu que a utilização de diferentes concentrações das auxinas 2,4-D, AIB e ANA nos meios de cultivo *in vitro* podem influenciar significativamente na síntese e acúmulo de produtos bioquímicos em função do período ao qual os explantes estão submetidos aos tratamentos. Percebeu-se que todos os tratamentos suplementados com os reguladores de crescimento demonstraram padrões semelhantes, sendo que aos 30 dias ocorreu o aumento dos teores endógenos de carboidratos solúveis em decorrência do aumento na concentração de auxinas e aos 120 dias ocorreu a diminuição destes teores nas folhas, conforme o aumento da concentração e em função da data de coleta. Comportamento semelhante pode ser observado nos teores de

amido das folhas, sendo que aos 30 dias não diferiram da testemunha, mas demonstraram diminuição dos 30 para os 120 dias em todos os tratamentos.

3.3.3.2 Citocininas

As citocininas, bem como as auxinas, constituem a classe de reguladores de crescimento mais usuais na cultura de tecidos vegetais. As citocininas desempenham importante papel no crescimento inicial de gemas laterais, durante o processo de morfogênese por estar diretamente envolvida no processo de divisão celular (SOARES, 2008; CID, 2014). De maneira geral, são encontradas em maiores concentrações em regiões meristemáticas, no entanto, o principal sítio de biossíntese dessa substância é no meristema apical da raiz, de onde é transportado pelo xilema para a parte aérea da planta (CASTRO et al., 2005).

Em termos fisiológicos as citocininas além de estarem envolvidas na divisão celular e formação de órgãos, atuam na germinação de sementes, iniciação de crescimento radicular, desenvolvimento de gemas e brotações, retardamento de senescência e estímulo da translocação de nutriente e substâncias orgânicas e no movimento estomático (CASTRO et al., 2005).

Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado a influência das citocininas na diferenciação de tecidos fotossintetizantes, o que promove uma melhoria do aparato fotossintético pelo maior acúmulo de clorofila e enzimas fotossintéticas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Durante o processo de ontogenia das folhas, quando associadas com auxinas, as citocininas regulam a divisão celular das mesmas. Na fase inicial do processo a atividade citocinínica é maior, o que promove uma maior divisão celular e, portanto, divisão de cloroplastos, bem como a formação de membranas e síntese de proteínas. Após essa fase a atividade das citocininas é reduzida dando espaço à atuação das auxinas que promovem estímulo ao alongamento das células mesofílicas (CHERNYAD'EV, 2000).

Na cultura de tecidos *in vitro*, devido ao seu efeito na dominância apical, as citocininas são amplamente utilizadas para promover o desenvolvimento de meristemas axilares. Sua associação com auxinas pode também promover a formação de calos, além de meristemas adventícios, podendo até induzir a formação de embriões somáticos dependendo do balanço hormonal promovido (CANHOTO, 2010).

Dentre os principais reguladores de crescimento com função análoga à função das citocininas utilizados na cultura de tecidos vegetais estão a cinetina (CIN), a 6-Benzilaminopurina (BAP) e o tidiazuron (CID, 2014), e sua utilização está intimamente relacionada à finalidade do meio de cultivo utilizado como se observa em diversos trabalhos já realizados.

Em um trabalho desenvolvido por Souza et al. (2017), avaliando o efeito de diferentes combinações de citocininas no cultivo *in vitro* de pimenteira-do-reino observaram que no meio de cultivo suplementado com 2,0 μM de BAP e 0,2 mg.L^{-1} de AIA obteve-se os melhores resultados quantitativos tanto para proliferação de número de brotos quanto para o número de gemas, apresentando em média 2,62 brotos e 3,62 gemas por explante, respectivamente. No meio suplementado com 5 μM de TDZ e 0,2 mg.L^{-1} de AIA foram obtidas em média 3,44 gemas/explante, não diferindo estatisticamente do meio anterior. Ainda de acordo com os autores todos os explantes apresentaram a formação de uma massa de calos em suas bases, justificando sua formação devido ao balanço intermediário entre citocininas e auxinas.

Oliveira et al. (2007), avaliando o efeito das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), tidiazuron (TDZ), cinetina (CIN) e zeatina (ZEA) na concentração de 1 mg.L^{-1} na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra*, observaram que após 45 dias de cultivo os meios suplementados com CIN e ZEA promoveram um maior acúmulo de clorofila *a* e *b* nos explantes mesmo após serem mantidos em condições de escuro, os resultados obtidos nestes tratamentos foram superiores aos tratamentos com TDZ, BAP e sem adição de citocinina. Observou-se também que o teor de carotenóides totais foi afetado positivamente pela presença de citocinina no meio de cultura durante a indução de senescência foliar, sendo que os meios suplementados com ZEA e CIN promoveram os maiores valores, enquanto os meios com TDZ, BAP e sem adição de citocininas apresentaram baixos valores e foram estatisticamente iguais entre si.

Soares (2008), avaliando a influência de citocininas nos aspectos anatômicos no cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*), observou que a adição de citocininas no meio de cultura propiciou um incremento da proliferação de brotos, sendo que as maiores médias observadas foram para os meios suplementados com BAP e CIN, respectivamente, enquanto o TDZ ocasionou a menor proliferação de brotos, os quais se apresentaram malformados, com caules retorcidos e folhas atípicas, durante todo o cultivo. Entretanto, durante a fase de enraizamento foi observado que as plântulas advindas de

meios de cultura ausentes em citocininas apresentaram melhor formação de raízes, isso porque, de acordo com os autores, plântulas cultivadas sob elevadas concentrações de citocininas podem apresentar efeitos residuais destas, chegando a ser necessários até seis subcultivos em meios de cultura suplementado com carvão ativado a fim de se eliminar completamente o efeito inibitório deste regulador de crescimento sobre a formação de raízes.

Carvalho et al (2005), trabalhando com segmentos de hipocótilo e nós cotiledonares de *Bixa orellana* L. sob diferentes condições de meio nutritivo, observaram que na ausência de fitorreguladores os segmentos de hipocótilo apresentaram menores médias para indução de brotações adventícias, demonstrando a necessidade de se incorporar fitorreguladores ao meio de cultivo. No entanto, nos meios suplementados com fitorreguladores AIA (ácido indolacético) e ZEA (zeatina) ocorreu uma melhor resposta na indução de brotações adventícias a partir de segmentos de hipocótilo de urucum, devido ao balanço hormonal promovido no meio de cultivo. Já os nós cotiledonares aumentaram o comprimento de brotações axilares sob crescentes concentrações de ZEA, além de não estimular a calogênese, diferentemente do meio suplementado com BAP (benzilamenopurina).

3.3.3.3 Giberelinas

As giberelinas são hormônios geralmente relacionados ao crescimento caulinar de plantas e com a produção de α -amilase em sementes de gramíneas (CID, 2014). Nas plantas, de acordo com Castro et al. (2005), as giberelinas determinam importantes alterações fisiológicas como crescimento de plantas, reversão de nanismo genético, lançamento da inflorescência e florescimento, mobilização de reservas, efeitos na germinação e dormência de sementes, e por isso, são sintetizadas em regiões de crescimento, sementes em germinação, frutos imaturos e ápices caulinares e radiculares (RODRIGUES, 2010).

Na cultura de tecidos a utilização das giberelinas é mais limitada do que as auxinas e citocininas, entretanto, vários trabalhos têm buscado avaliar o seu efeito no alongamento de explantes, na germinação de sementes e na quebra de dormência de embriões somáticos no cultivo *in vitro*, através da utilização, principalmente do ácido giberélico (AG₃), que é o regulador de crescimento com função análoga à das giberelinas (CANHOTO, 2010).

Simões et al. (2012), em um estudo buscando avaliar o efeito de diferentes concentrações (0; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg.L⁻¹) do ácido giberélico no alongamento de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) durante a micropropagação, observaram que a presença do AG₃ no meio de cultura promoveu uma redução significativa no número de folhas nos explantes até a concentração de 3,0 mg.L⁻¹, sendo que em concentrações superiores a formação de folhas foi normalizada. Foi constatado também, neste trabalho, que até a concentração 1,0 mg.L⁻¹ de AG₃ o crescimento da parte aérea foi influenciado positivamente, entretanto acima desta concentração percebeu-se o efeito inibitório sobre esta variável, que passou a ser reestabelecido a partir da concentração 3,0 mg.L⁻¹, na qual foi observado um menor desenvolvimento radicular, tal qual os demais tratamentos com presença do regulador de crescimento, justificando uma estratégia de redirecionamento de gasto de energia e fotoassimilados.

Em um trabalho desenvolvido por Braun et al. (2010), onde avaliaram a germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com AG₃ em diferentes concentrações de sacarose observaram que a maior porcentagem de germinação foi obtida no tratamento no qual as sementes passaram por um processo de embebição em AG₃ (1 mg.L⁻¹) e posteriormente foram inoculadas em um meio de cultura com 15 g.L⁻¹ de sacarose. Em contrapartida nos tratamentos nos quais não se procedeu a embebição das sementes foi constatada a redução da porcentagem de germinação com o aumento gradual das concentrações de sacarose, o que se justifica pelo aumento da pressão osmótica ocasionada pela sacarose no meio de cultura. Apesar de influenciar a taxa de germinação, pode-se perceber que a embebição das sementes no ácido giberélico não influenciou o vigor das plântulas obtidas.

Soares et al. (2012), avaliando a germinação assimbiótica de *Dendrobium nobile* sob diferentes concentrações de ácido giberélico, observaram que tanto a porcentagem de germinação quanto o número de plântulas foram afetados significativamente, sendo que os melhores resultados foram obtidos na ausência do regulador de crescimento. Entretanto, ao avaliar o desenvolvimento das plântulas, os dados biométricos foram influenciados significativamente pelos tratamentos, exceto o diâmetro de pseudobulbos, sendo que na concentração de 2,9 mg.L⁻¹ foi obtido o maior número de folhas, e na concentração de 3,2 mg.L⁻¹ pode-se observar maiores números de pseudobulbos. Para número de raízes a melhor concentração foi 3,3 mg.L⁻¹ de GA₃, maiores alturas foram encontradas na concentração de 2,8 mg.L⁻¹ e a maior massa fresca pode ser observada na concentração de

3,5 mg.L⁻¹. Estes resultados demonstram que apesar de a embebição em ácido giberélico ter ocasionado a redução na porcentagem de germinação, este procedimento beneficiou o posterior desenvolvimento das plântulas *in vitro*.

Outro uso bastante comum para o ácido giberélico na cultura de tecidos vegetais é a germinação de embriões zigóticos. Chagas et al. (2005), avaliaram o cultivo de embriões imaturos de citros sob diferentes concentrações de carvão ativado (0; 0,5; 1; 1,5 e 2 g L⁻¹) e de ácido giberélico (0; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg.L⁻¹), e observaram que os maiores comprimentos de parte aérea foram encontrados em meios suplementados com 0,1; 1 e 10 mg.L⁻¹ de GA₃ juntamente com 2 g.L⁻¹ de carvão ativado, e a não adição de giberelina apresentou o menor valor para esta variável, confirmando a sua influência sobre o alongamento de plantas. Já o maior comprimento radicular pode ser observado com a utilização de 0,01 mg.L⁻¹ de GA₃, na ausência de carvão ativado, enquanto nos demais tratamentos percebeu-se ação inibitória para formação de raízes. Quando avaliaram a massa fresca das plântulas, obtiveram melhores resultados na concentração de 10 mg.L⁻¹ combinada com 0,5 ou 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado.

3.3.3.4 Etileno

O etileno é um hormônio de caráter gasoso e pode promover diferentes efeitos no crescimento e diferenciação das plantas. Pode ser encontrado na maioria dos órgãos de plantas superiores e também em alguns frutos e pode ser sintetizado nos tecidos vegetais em resposta a condições de estresse (CASTRO et al., 2005). Além disso, o etileno pode estar envolvido na quebra de dormência de algumas sementes, alongamento de plantas aquáticas, diferenciação de pelos radiculares, promoção de floração em bromeliáceas, amadurecimento de frutos e pode também atuar em mecanismos de defesa das plantas (CANHOTO, 2010).

Na cultura de tecidos a utilização do etileno, tal qual as giberelinas, é bastante restringida, apesar de ser capaz de influenciar a morfogênese das plantas e também poder ser produzido pelos explantes (KUMAR et al., 1998). Entretanto, sua utilização é limitada em função da dificuldade de se manipular este composto no meio de cultivo. Mesmo assim, alguns trabalhos têm mostrado que a influência deste hormônio na micropropagação pode ser verificada a partir da adição, ao meio de cultura, de precursores genéticos, como o aminociclopropano (ACC), de inibidores da biossíntese (cloreto de cobalto) ou da ação

(nitrato de prata) do etileno, de substâncias capazes de liberar o etileno, como o etefon, ou pela utilização de bloqueadores específicos dos receptores de etileno (ARIGITA et al., 2002; CANHOTO, 2010). Sua utilização resulta principalmente na formação de calos em algumas espécies, podendo também inibir a organogênese e a embriogênese somática em função de sua ação inibitória no transporte polar de auxinas.

Batista (2012), investigando a influência do etileno e de poliaminas na indução de morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annum* L.) suplementou diferentes meios de cultura com ACC, que é um precursor do etileno, e dos inibidores da biossíntese deste hormônio, a aminoetoxivinilglicina (AVG) e o tiosulfato de prata (STS), e observou que os tratamentos que apresentaram maior acúmulo de etileno apresentaram uma maior formação de calos, enquanto tratamentos com menores concentrações de etileno acumulado promoveram uma maior frequência de regeneração dos explantes.

Conceição et al. (1999), objetivando avaliar a influência da sacarose, da temperatura e do ácido acetilsalicílico (AAS), que é um inibidor da biossíntese de etileno, na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de batata, observaram que o aumento nas concentrações de AAS sob a temperatura de 25°C promoveu uma redução no tamanho médio dos segmentos caulinares em duas cultivares de batata, atuando desta forma como retardante do alongamento das hastes, por inibir a síntese de etileno.

Santos (2009), estudando a influência do etileno no alongamento e anatomia de plantas de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro*, realizou um experimento com quatro tratamentos, sendo que um tratamento foi mantido vedado e sem qualquer interferência durante o período experimental, no segundo tratamento promoveu-se a renovação semanal de ar sintético, no terceiro tratamento além de ser promovida a renovação semanal de ar sintético, ele passou pela aplicação de 5000 μM de etileno, e no quarto tratamento fez-se a renovação semanal do ar sintético dos frascos, seguida da aplicação de 5 μM de inibidor de etileno 1-MCP (1-metilciclopropeno). De acordo com os resultados deste trabalho a atmosfera no interior do frasco interferiu no desenvolvimento da espécie, sendo que as plantas que receberam etileno apresentaram maior número de folhas e maior quantidade de segmentos nodais quando comparado com os demais tratamentos. Entretanto, as plantas que receberam o etileno apresentaram tamanho de raízes significativamente menor, o tratamento que não passou por renovação de ar apresentou raízes maiores e o tratamento com o inibidor 1-MCP mostrou efeito inibitório

sobre a quantidade de raízes, além de promover a redução no teor de matéria fresca das plântulas.

3.3.3.5 Ácido abscísico

O ácido abscísico (ABA) é considerado um importante fitohormônio, o qual é sintetizado em todas as células que possuem cloroplastos ou amiloplastos e está diretamente ligado aos processos de abertura e fechamento estomático, além de inibir a germinação precoce e a viviparidade em plantas. O ácido abscísico influencia ainda, uma correta maturação de embriões por estimular a síntese de proteínas de reserva (CANHOTO, 2010). Para além disto, o ABA promove a dormência de gemas, atraso no crescimento e estímulo à senescência e a abscisão de folhas e frutos (CASTRO et al., 2005)

Na cultura de tecidos pouco têm sido os trabalhos que fazem uso deste regulador de crescimento, principalmente por ser considerado mais como um hormônio inibidor do que de fato promotor de atividades metabólicas nos vegetais. Entretanto, podem-se ver alguns trabalhos envolvendo a embriogênese somática que fazem uso deste regulador, promovendo uma maturação eficaz e impedindo a germinação precoce dos embriões formados (CANHOTO, 2010; CID, 2014).

Sato et al. (2001), verificando a influência de diferentes concentrações (0; 0,1; 1,0; e 10,0 mg.L⁻¹) do ácido abscísico na micropropagação da mandioca (*Manihot esculenta*), perceberam que para as variáveis número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes, comprimento de raízes e matéria seca total o ABA promoveu um decréscimo das mesmas, demonstrando o seu efeito inibitório, influenciando também o acúmulo P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Mn e Fe em função das concentrações testadas, sendo que para o P, Mn e Zn os valores decresceram a partir da testemunha até a concentração de 10 mg.L⁻¹. Para o Fe, observou-se concentração elevada no tratamento com 0,1 mg.L⁻¹ de ABA em relação aos demais tratamentos, enquanto o Cu apresentou maiores concentrações na testemunha e no tratamento com concentração de 10 mg.L⁻¹. Já a concentração de K manteve-se constante em todos os tratamentos, não demonstrando influência do ABA sobre seu acúmulo. Estes resultados demonstraram, portanto, uma tendência de redução na absorção de nutrientes a partir do aumento das concentrações de ABA no meio de cultivo, o que pode estar relacionado ao fechamento estomático promovido pelo regulador de

crescimento, que ocasiona uma menor taxa de transpiração da planta e, portanto, uma menor taxa de fluxo de absorção de água e nutrientes.

Lemos et al. (2002), testando diferentes métodos para conservação de germoplasma de cana-de-açúcar, trabalharam com diferentes concentrações de ácido abscísico no meio de cultura e observaram que todas as concentrações, exceto na concentração de 1 mg.L⁻¹, favoreceram o crescimento dos explantes, obtendo resultados semelhantes aos obtidos no tratamento-testemunha. Entretanto, na concentração de 1 mg.L⁻¹ foi observada maior longevidade dos explantes, mostrando que apesar de inibir o crescimento dos mesmos não reduziu a sua viabilidade por um período de 12 meses sem a necessidade de proceder-se subcultivos.

De semelhante modo, Santos et al. (2012), objetivando a conservação *in vitro* de *Chrysopogon zizanioides*, testaram o efeito das concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹ de ABA no meio de cultura em temperaturas de 18 e 25°C e verificaram que dentro da temperatura de 18°C nas concentrações 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹ de ABA foram obtidos os menores tamanhos de folhas, isso porque a redução da temperatura é comumente utilizada como estratégia para conservação de germoplasmas sob condições de crescimento lento. Percebe-se, portanto, que a utilização do ácido abscísico como retardante no desenvolvimento de explantes é uma ótima alternativa para se aumentar a longevidade de explante, bem como favorecer a conservação *in vitro* de germoplasmas.

3.3.4 Ágar

O ágar, apesar de ser um constituinte inerte ao meio de cultivo, tem fundamental papel na cultura de tecidos por dar sustentação ao explante que pretende-se inocular. Extraído de algas marinhas, é o polissacarídeo mais comumente utilizado como agente gelificante em meios de cultura, devido às suas características de solubilidade em água, capacidade de fundir-se a 100°C e permanecer semissólido em temperatura ambiente (2008; CID, 2014). Pode ainda, atuar como agente tamponante (SHINGA, 1982) e participar do controle de processos de vitrificação e hiper-hidratação (WILLIAMS & LEOPOLD, 1989).

A determinação da concentração de ágar a ser dissolvida no meio de cultura é muito importante, pois a sua presença em altas concentrações pode ocasionar a indisponibilidade de nutrientes, bem como dificultar a difusão dos constituintes orgânicos e inorgânicos do

meio de cultivo, essenciais para o desenvolvimento *in vitro*. Sendo assim, pode-se utilizar concentrações que variem de 0,4 a 0,7%, podendo chegar a concentrações de 1,1% quando pretende-se evitar o processo de vitrificação do material vegetal (DEBERGH, 1983; CALDAS et al., 1990), evitando-se sempre a sua utilização em meios ácidos que podem promover a sua hidrólise (ROMBERGER & TABOR, 1971).

Apesar de sua vasta utilização, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos objetivando principalmente a substituição deste por alguns gelificantes alternativos (SOARES et al., 2014), bem como esclarecer a sua atuação minuciosa no desenvolvimento vegetal.

Paiva et al. (1999), estudando o efeito de diferentes concentrações de ágar (0,0; 0,35; 0,7 e 1,05%) e níveis de pH (4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; e 7) na propagação *in vitro* de crisântemo, observaram que o número e o tamanho de brotos formados e o número de folhas não foram influenciados significativamente pelos tratamentos. Entretanto, o peso da matéria seca da parte aérea das plântulas foi afetado significativamente pela interação entre os tratamentos, sendo que, quando se utilizou 0,35% de ágar com constante elevação do pH do meio verificou-se a diminuição do peso, demonstrando que a absorção de nutrientes pode ser influenciada pelo nível de pH do meio.

Resende et al. (2008), averiguando a influência do meio de cultura e da concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta, verificaram efeito significativo das concentrações de ágar para as variáveis comprimento de parte aérea e massa fresca das plântulas, além da influência significativa da interação sobre o número de folhas e a massa fresca das plântulas. Sendo que, o maior comprimento de parte aérea foi observado na concentração de 1,52 g.L⁻¹ de ágar. Além disso, utilizando-se o meio MS pode-se observar um aumento no número de folhas a partir da concentração de 1,69 g.L⁻¹ de ágar até atingir a concentração de 6,71 g.L⁻¹, enquanto no meio WPM foi observada melhor formação de folhas nos meios isentos de ágar, demonstrando a possível elevação do potencial osmótico do meio, o que dificulta a difusão de nutrientes para os embriões, reduzindo o seu desenvolvimento.

Avaliando o efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*, Correia et al. (1995) observaram que aos 42 dias de cultivo os clones de híbridos apresentaram maiores médias de peso de matéria fresca e seca em meio

de cultura sólido do que em meio líquido. Foi verificado ainda que aos 28 dias de cultivo alguns explantes mantidos em meio líquido apresentaram gemas com crescimento desuniforme, com folhas largas, vítreas e translúcidas, o que pode ser explicado pela ocorrência de hiperidricidade nos cultivos *in vitro*. Já em meio sólido, as plântulas demonstraram crescimento de gemas mais uniforme, entretanto após o 30º dia de cultivo alguns explantes se mostraram com sintomas de deficiência nutricional e senescência, evidenciando a indisponibilidade de nutrientes promovida pela utilização de ágar, a partir deste período. Este problema pode, no entanto, ser contornado a partir da regulação das concentrações do ágar suplementado ao meio de cultivo.

3.3.5 Carvão ativado

A utilização do carvão no meio de cultura, tal qual o ágar, não desempenha papel de essencialidade, no entanto, muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de demonstrar a capacidade que este suplemento tem de capturar e adsorver as substâncias inibidoras que são frequentemente liberadas no meio de cultivo pelos explantes, chamadas de fenóis. Sendo assim, a sua utilização em determinadas espécies pode favorecer o desempenho da organogênese e do enraizamento *in vitro*, quando utilizado entre concentrações de 0,2 a 3% (PASQUAL, 1990; CALDAS et al., 1998).

Apesar de seu bom desempenho no meio de cultura, quando utilizado em concentrações muito altas, o carvão ativado pode promover também a retenção de vitaminas, hormônios e alguns nutrientes até então disponibilizados para os explantes, podendo, desta forma, inibir o crescimento *in vitro* (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Diante do exposto, vê-se a necessidade de trabalhos que estabeleçam as concentrações mais favoráveis para as mais variadas espécies sem, portanto, comprometer o seu desempenho *in vitro*.

Ribeiro et al. (2000), avaliando os efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de citros *Limonia osbeck* x *Poncirus trifoliata*, observaram efeito significativo da interação entre os fatores para as variáveis percentual de sobrevivência, comprimento do sistema radicular e da haste caulinar de embriões do híbrido. Sendo que, o maior percentual de sobrevivência foi observado com a utilização da mais baixa concentração de AG₃ (0,01 mg.L⁻¹), suplementada com concentrações crescentes de carvão ativado. O aumento nas concentrações de carvão ativado propiciou a diminuição no

percentual de sobrevivência na concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AG_3 , bem como no comprimento de raízes e do caule, demonstrando o efeito antagônico desta dosagem de AG_3 associada ao carvão ativado em concentrações inferiores a $2,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Em outro trabalho, buscando avaliar a influência do carvão ativado e do BAP na multiplicação *in vitro* de frutíferas de clima temperado, Villa et al. (2007) verificaram a inibição da multiplicação de brotos e a promoção de crescimento da parte aérea e do sistema radicular do segmento nodal inicialmente inoculado, de porta-enxerto de videira e amoreira-preta cv. Ébano, a partir da suplementação do meio de cultivo com o carvão ativado. O incremento nas concentrações de carvão ativado proporcionou também o decréscimo no número de folhas formadas nas duas espécies trabalhadas. Entretanto, o aumento das concentrações de carvão ativado possibilitou acréscimos no comprimento e número de raízes formadas e redução no peso de matéria fresca das plântulas.

Donini et al. (2011), estudaram o efeito de diferentes concentrações (0; 0,6; 0,8; 1; 1,5; 2 g.L^{-1}) de carvão ativado no estabelecimento *in vitro* de Pinhão-manso e observaram que não houve a formação de calos com a adição do carvão ativado ao meio de cultivo, em função da lenta liberação de nutrientes propiciada pela presença do carvão ativado no meio de cultivo. Entretanto, observou-se a continuidade do desenvolvimento dos meristemas através do qual foi verificado que a concentração de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado apresentou melhores resultados, e na concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ foi percebido o desenvolvimento mais lento dos meristemas, demonstrando, portanto, a capacidade que as altas concentrações de carvão ativado têm em indisponibilizar os nutrientes para os explantes.

3.4 LUZ

No que diz respeito à luz, pode-se considerar que esta é substancialmente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois está diretamente envolvida na realização de processos vitais como a fotossíntese, a fotomorfogênese e o fototropismo. No cultivo *in vitro*, no que se refere ao fototropismo, tem-se considerado desprezível a influência da luz artificial neste processo, e em muitos casos até mesmo para a fotossíntese tem-se desconsiderado a essencialidade da luz artificial para o processo, a menos que se deseje estimular o autotrofismo das plantas cultivadas. Em contrapartida a essas considerações, pode-se afirmar que a intensidade, a qualidade e a duração da luz fornecidas

ao cultivo *in vitro*, são determinantes nos processos morfogênicos das plantas (DIGNART, 2006).

De maneira simplificada a fotomorfogênese ocorre por meio da absorção da luz por pigmentos, como o fitocromo e o criptocromo, presentes principalmente nas folhas, que se tornarão fotoquimicamente ativos, funcionando como fotorreceptores. A absorção se dá de forma seletiva a diferentes comprimentos de ondas, através dos quais o fotorreceptor interpreta a informação na forma de uma ação primária. Essa ação pode ocasionar uma mudança na conformação de uma proteína, uma reação redox ou outra forma de transdução química. Ou seja, a absorção de luz pelo fotorreceptor inicia uma sequência de eventos bioquímicos que produzirão uma resposta final na planta, ocasionando nestas modificações morfogênicas (CARVALHO e PERES, 2017).

É importante ressaltar que, segundo Carvalho e Peres (2017), a maioria dos processos biológicos das plantas influenciados pela luz, ocorrem na faixa do espectro denominada de luz visível, que varia de 400 nm a 700 nm, sendo os efeitos desta faixa do espectro podendo ser observados também na fotomorfogênese.

Usualmente as salas de crescimento de laboratórios de cultivo *in vitro* são equipadas com lâmpadas fluorescentes que emitem luz branca de amplo espectro, com similaridades espectrais, e essa irradiância fornecida, inicialmente na sala de crescimento, afeta diretamente o desenvolvimento das plantas, principalmente por meio de alterações morfogênicas (MARKS & SIMPSON, 1999).

Segundo Marks e Simpson (1999), “com a variação da qualidade espectral, é possível manipular o crescimento *in vitro* de diversas espécies de uma maneira alternativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura”.

Baseados nestas considerações, Júnior et al. (2012), a partir da realização de um trabalho que objetivava a identificação de variações anatômicas de *Laelia purpurata* sob diferentes intensidades e qualidade espectral de luz com a utilização de malhas fotoconversoras, observaram que plantas cultivadas sob malha de coloração azul apresentaram um aumento do tamanho de células da epiderme na face adaxial das folhas, quando comparadas com plantas cultivadas sob malhas pretas e vermelhas e também na ausência destas. Em contrapartida, percebeu-se que a utilização da malha vermelha em sala de crescimento com radiação de $52 \text{ w.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ocasionou o aumento na densidade de estômatos e tricomas sobre a superfície foliar. Já em casa de vegetação percebeu-se que plantas cultivadas sem cobertura de malha com radiação de $256 \text{ w.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ apresentaram

maior densidade de estômatos, seguida pelas plantas cultivadas sob as malhas azul e vermelha que não diferiram entre si.

Em outro trabalho desenvolvido por Massaro (2013), estudando a influência da qualidade da luz no crescimento de duas cultivares de *Phalaenopsis amabilis*, foi observado que na cultivar cv.6323 a gênese radicial foi maior quando se utilizou comprimento de onda amarelo, enquanto na cultivar cv.6546 este mesmo processo foi favorecido pelo comprimento de onda do verde. Avaliando-se, neste mesmo trabalho, o comprimento total da plântula, Massaro identificou que os espectros de luz branca, azul e vermelha, apresentaram maiores valores médios para a cultivar cv.6323, enquanto a cultivar cv. 6546 foi melhor influenciada pelos espectros de luz amarela e verde. Estes resultados evidenciam claramente que, apesar de se trabalhar com uma mesma espécie, a influência da qualidade de luz entre as cultivares pode ser variável, requerendo assim estudos que se proponham a diminuir estas variações.

Oliveira (2006) entre outros autores, avaliando a variação anatômica foliar de plantas de *Coffea canephora* submetidas a diferentes intensidades luminosas constataram que as folhas quando submetidas a diferentes condições de luminosidade apresentam variações ecofisiológicas significativas, podendo ser influenciadas tanto pela intensidade quanto pela qualidade da luz fornecida. Neste estudo, plantas que foram submetidas a maiores intensidades luminosas apresentaram maior densidade de estômatos.

No trabalho desenvolvido com plantas de *Coffea arabica* utilizando-se telas com colorações azul, branca, cinza, preta e vermelha, Henrique et al. (2011), perceberam que as telas vermelha, azul e preta proporcionaram maiores incrementos em altura se comparadas às outras colorações. A área foliar assim como o índice de matéria seca, segundo este estudo, foram melhor influenciados pela tela de coloração vermelha, enquanto a utilização da tela branca resultou em menores médias de área foliar. Estes resultados facilmente reafirmam a condição de vulnerabilidade das diferentes espécies à qualidade de luz à qual são submetidas, podendo estas sofrer significantes alterações tanto em sua estrutura morfológica quanto anatômica.

De acordo com Dignart (2006), a qualidade da luz espectral pode afetar estruturas anatômicas das folhas, principalmente no momento de expansão foliar onde a luz exerce seus maiores efeitos, induzindo nas plantas um alto grau de plasticidade fisiológica e anatômica para mudanças na qualidade da luz. Dentre as principais características passíveis de sofrerem alteração estão a espessura foliar, diferenciação do mesófilo, desenvolvimento

vascular, divisão celular e o desenvolvimento de estômatos (DIGNART, 2006). Entretanto, embora confirmados por diversos autores, os efeitos morfológicos e fisiológicos da qualidade da luz nas plantas variam de acordo com a espécie que se deseja estudar, tornando-se assim necessária a realização de trabalhos que identifiquem o espectro de onda que atua com maior eficiência no processo de micropropagação de cada espécie cultivada, como se pode observar nos resultados experimentais supracitados.

3.5 TEMPERATURA

A temperatura do ambiente onde serão acondicionados os recipientes com explantes já inoculados é considerada como um fator crucial para o sucesso do processo de micropropagação, uma vez que, devido às condições dos materiais vegetais e ao conteúdo dos meios nutritivos necessitam de uma temperatura ótima para dar continuidade ao desenvolvimento das plântulas que se pretende obter. Geralmente, a temperatura dentro da sala de crescimento deve permanecer em torno de 23°C a 27°C, sendo necessária a utilização de um sistema de refrigeração capaz de diminuir as oscilações térmicas da sala em função da temperatura externa (CID, 2014).

De acordo com Salisbury & Ross (1991), alterações na temperatura ambiental podem influenciar sensivelmente o crescimento das plantas, sendo que mudanças em poucos graus podem ocasionar alterações significativas na taxa de crescimento. Por isso eles consideram a temperatura mínima como sendo aquela abaixo da qual não há crescimento, a temperatura ótima como sendo aquela em o crescimento atinge sua máxima taxa e a temperatura máxima é aquela a partir da qual a planta cessa o crescimento podendo atingir a senescência.

Ortolan et al. (2007), avaliando o efeito da temperatura e da luminosidade na regeneração *in vitro* de plantas de trigo, observaram que a indução de calos apresentou melhores resultados quando utilizada a temperatura de 4°C independente da condição de escuro ou de fotoperíodo, apresentando a maior porcentagem de calos formados e de plântulas regeneradas. Enquanto isso os tratamentos que foram mantidos à temperatura de 4°C e depois transferidos para temperatura de 25°C em condição de escuro foram aqueles que apresentaram menor porcentagem de calos formados, bem como menor número de plântulas regeneradas, verificando-se desta forma a influência da temperatura no desenvolvimento embriogênico.

Mollo (2009), estudando a influência da temperatura sobre o crescimento de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro*, observaram que as sementes da espécie mantidas por 90 dias em câmara de germinação *in vitro* a 5°C, sob fotoperíodo de 12 horas não germinaram, após 14 dias sob temperaturas de 26°C e 30°C percebeu-se até 80% de germinação. Já sementes mantidas em condições de alternância, sendo 15°C no escuro e 30°C no claro, foram necessários 21 dias para se atingir a taxa de germinação anterior, e 50 dias para sementes mantidas a 15°C. Estes resultados demonstram que as baixas temperaturas reduzem o metabolismo das sementes, fazendo com que estas germinem mais vagarosamente. Além disso, Mollo (2009) observou ainda que após três meses de cultivo a temperatura influenciou os parâmetros biométricos das plântulas formadas, sendo que o número de raízes formadas foi 30% menor naquelas mantidas à temperatura de 15°C quando comparadas àquelas mantidas em condições de alternância, as quais apresentaram 50% menos raízes dos que as plântulas mantidas a 30°C. Para outras variáveis como número de folhas formadas, comprimento das folhas, massa fresca e massa seca a temperatura de 30°C se mostrou a mais eficiente, sendo que temperaturas mais baixas tiveram maior influência em inibir o crescimento das plantas.

3.5 OXIDAÇÃO FENÓLICA

A oxidação fenólica é um processo de ocorrência natural nos tecidos vegetais, e é responsável pelo escurecimento dos explantes inoculados, bem como pela liberação de exsudados tóxicos no meio de cultura. É mais frequente em espécies perenes e arbóreas em função do teor de lignina dos tecidos vegetais, entretanto, pode ocorrer também em plantas não perenes (GONÇALVES, 2013).

O escurecimento do tecido vegetal ocorre devido à presença da enzima cobre dependente, polifenoloxidase, que catalisa reações orto-difenóis na presença de oxigênio, ocasionando a formação e a polimerização de quinonas (GEORGE & SHERRINGTON, 1984), desencadeando as colorações escuras ou pardas aos tecidos, quando estes são, de alguma forma, injuriados, além de inibir o crescimento celular (AMORIM, 1985).

Apesar de ser um problema recorrente na micropropagação *in vitro*, a oxidação fenólica pode, por muitas vezes, ser contornada a partir da suplementação do meio de cultura com algumas substâncias adsorventes e/ou antioxidantes, como é o caso do carvão ativado, da polivinilpirrolidona (PVP), do ácido ascórbico ou da cisteína (TEIXEIRA,

2001). Muitos trabalhos têm demonstrado a eficiência de utilização destes suplementos quando adicionados ao meio de cultivo.

Objetivando a redução da oxidação na micropropagação *in vitro* da bananeira ‘maçã’, Camolesi et al. (2007) realizaram um estudo utilizando uma combinação de 0,25 g/L de ácido cítrico e 0,75 g/L de citrato de potássio em imersão dos ápices caulinares por 90 minutos e em adição ao meio de cultura sob diversos tratamentos, em que observaram que os tratamentos mostraram efeitos significativos sobre o grau de oxidação nos casos em que os explantes foram imersos na solução antioxidante. O pré-tratamento dos explantes com a solução antioxidante foi eficiente na redução da oxidação dos ápices caulinares de bananeira. Entretanto, notou-se que quando adicionados ao meio de cultura, os antioxidantes promoveram o aumento da oxidação dos explantes. Todavia, este efeito pode ser contornado ao se transferir o explante, dentro do mesmo frasco, para fora do alo de compostos fenólicos formado no meio de cultivo, sem a necessidade de preparo de um novo meio.

Em um trabalho buscando alternativas para controlar a oxidação *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia uniflora*, Cola et al. (2010) testaram a influência do ácido ascórbico e do carvão ativado na redução da oxidação fenólica, entretanto, observaram que após 7 dias de cultivo em condições de escuro o tratamento que apresentou melhor resultado foi aquele cujo meio não foi suplementado com os antioxidantes citados, enquanto o meio suplementado com ácido ascórbico se mostrou menos eficiente no controle da oxidação. Ao final de 50 dias de cultivo foi verificado que os tratamentos que apresentaram menor grau de oxidação foram o sem antioxidante e com 100 mg/L de carvão ativado com apenas 16% de explantes pouco oxidados.

Utino et al. (2001), avaliando o crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata *in vitro* em função das concentrações de sais de ferro, cobre e zinco no meio de cultivo, perceberam que as concentrações de ferro no meio influenciaram significativamente o grau de oxidação dos explantes, demonstrando efeito linear, sendo que, conforme aumenta-se a concentração de ferro até 5,58 mg/L aumenta-se também o grau de oxidação dos explantes. Estes resultados demonstram claramente a influência das concentrações de sais de ferro no meio de cultivo, que apesar de serem essenciais para o desenvolvimento *in vitro*, podem se tornar um problema quando não se trabalha com concentrações adequadas destes.

3.6 VITRIFICAÇÃO

Também chamada de hiperidricidade, a vitrificação é um fenômeno característico na micropropagação *in vitro*, definido basicamente como uma desordem fisiológica e morfológica em que a planta apresenta acúmulo anormal de água em suas células e tecidos, principalmente quando cultivadas em meios semissólidos ou líquidos, apresentando um aspecto translúcido e quebradiço (KEVERS et al., 2004; GARCIA et al., 2011).

As principais características de plântulas ou brotos que apresentam a vitrificação são folhas de coloração clara, translúcidas, alongadas, túrgidas e frágeis (FRANCK et al., 2001), além de apresentarem baixos teores de lignina e celulose, baixa resistência da parede celular, baixo teor de clorofila e de matéria seca, estômatos anormais e baixo índice de sobrevivência em ambientes naturais (KEVERS & GASPAR, 1986; MAJADA et al., 2001; FRANCK et al., 2004).

Dentre as causas principais da ocorrência da vitrificação em cultivos *in vitro* pode-se citar as altas concentrações de citocinina que estimulam o crescimento anormal de células, bem como o aumento da umidade relativa dentro dos tubos utilizados para o cultivo (CID, 2014). No entanto, apesar de ser um problema que pode acarretar perdas de até 70% de parte aérea em plantas micropropagadas comercialmente, pouco se sabe a respeito dos fatores intrínsecos que podem influenciar a ocorrência deste fenômeno. Entretanto, várias pesquisas têm buscado formas de reverter este processo ou até mesmo de evitá-lo controlando a umidade, trocas gasosas, concentração de agentes geleificantes, além dos tipos e concentrações dos reguladores de crescimento utilizados no meio de cultura (VASCONSELOS, 2012). Porém o controle e pesquisas nesta área se tornam dificultadas em função das distintas reações possíveis para indução desta desordem intra ou interespecífica, sendo que o estímulo de um fator de controle para o fenômeno de hiperidricidade pode desencadear ou inibir uma série de outros fenômenos que podem ser também prejudiciais ao cultivo *in vitro*.

3.7 VARIAÇÃO SOMACLONAL

Na cultura de tecidos vegetais há uma variedade imensa de técnicas e metodologias que podem ser utilizadas buscando-se a regeneração *in vitro* de diversas espécies, como a

calogênese, que promove a indução de calos nos explantes, a organogênese, que promove a formação de um órgão diferente a partir de um segmento da planta (raízes, caules, folhas, etc.), a embriogênese somática, que se propõe a formar embriões somáticos a partir de calos induzidos em folhas, a suspensão em células, a cultura de protoplastos e etc. Entretanto, a utilização destas técnicas pode promover, de diversas formas, variações genéticas ou epigenéticas nas células ou tecidos cultivados, o que é, portanto, denominado de variação somaclonal (CID, 2014).

A variação somaclonal pode se manifestar em vários níveis da planta, como no fenótipo, na ploidia, nível cromossômico e até molecular, podendo ou não ter sua origem conhecida. Quando se tem variações conhecidas e hereditárias estas são chamadas de mutações, entretanto, quando não são conhecidas, elas são referidas como variantes (PEREDO et al., 2008; CID, 2014).

Estas variações estão mais relacionadas à formação de plantas adventícias, quando têm origem a partir de um calo, do que de plantas formadas a partir de gemas axilares. No entanto, a ocorrência deste fenômeno não é uma regra nos cultivos *in vitro*, mas quando ocorrem podem se manifestar de diferentes maneiras. Em função desta complexidade das variações somaclonais possíveis, ainda não se tem compreensão total dos mecanismos relacionados à indução deste fenômeno (SANTIAGO, 2011).

Apesar do seu difícil controle ou imprevisibilidade, a variação somaclonal em alguns casos tem sido induzida na cultura de tecidos por originar mutantes com qualidade genética superior à planta matriz, criando então possibilidades para o melhoramento genético de diversas espécies, a partir da utilização de marcadores moleculares, sendo assim chamada de variação somaclonal induzida (RIBEIRO, 2012; CID, 2014).

A ocorrência das variações somaclonais pode estar relacionada a diversos fatores, como a estabilidade genética de certos genótipos, o tipo de explante e métodos de cultivo *in vitro*, o tempo e a quantidade de subcultivos realizados sobre um mesmo explante, bem como a composição do meio de cultura (SANTIAGO, 2011), os quais podem ser discutidos em diversos trabalhos já realizados em que estas variações puderam ser observadas. Observa-se que o fator de maior influência na ocorrência deste fenômeno é o aumento significativo de subcultivos a partir de um explante.

Santos et al. (2004), avaliando a ocorrência da variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira cultivar *Pacovan*, a partir de sucessivos cultivos, puderam observar a formação de quatro diferentes variantes a partir da realização do 5º subcultivo.

A Variante Cacho, apesar de se apresentar como uma planta normal para todas as suas características morfológicas, demonstrou uma redução no número de pencas formadas por cacho, o que se caracteriza como uma variante ruim para a produção de bananas. A Variante Variegada se caracterizou pela presença de variegações em todas as partes da planta, como folhas, pseudocaule e cacho, reduzindo a produção e apresentando queimaduras solares. A Variante Morfológica da Forma da Folha associada a uma Variação da Clorofila nas Folhas caracterizou-se pelo estreitamento do limbo foliar e afilamento pronunciado da ponta da folha, apresentando variegações, tamanho reduzido, e manchas negras na face superior da folha. A Variante da Coloração do Pseudocaule apresentou colorações negras e brilhantes no pseudocaule e tons opacos no engaço. Estes resultados demonstram claramente que quanto maior o número de subcultivos promovido na cultura de tecidos maior é a chance de se obter variações somaclonais indesejadas.

Rodrigues et al. (2007), em um trabalho desenvolvido com o abacaxizeiro ornamental (*Ananas bracteatus*), avaliaram a variação somaclonal promovida em mudas micropropagadas após sete subcultivos das gemas estabelecidas *in vitro* e observaram três tipos de variantes somaclonais formados. O tipo *A. bracteatus* Verde apresentou colorações verdes e ausência de estrias laterais. O tipo *A. bracteatus* Albino, foi caracterizado pela ausência de clorofila e coloração esbranquiçada nas folhas. No tipo *A. bracteatus* Variegado percebeu-se a presença de estrias longitudinais variegadas na região central da folha ou presença de uma faixa verde em uma ou duas laterais das folhas. Neste caso, a variação somaclonal pode agregar valor ao produto, uma vez que sua utilização é meramente ornamental, o que seria indesejável em cultivo de abacaxi comestível.

Percebe-se, a partir da análise de diversos estudos, que a ocorrência da variação somaclonal pode ou não ser desejada, caracterizando-se, portanto, como um fator que pode ou não desencadear o sucesso da micropropagação *in vitro* de diversas espécies, e a realização de estudos que visem esclarecer a ocorrência deste fenômeno torna-se essencial para melhoria das técnicas de micropropagação mais usuais.

3.8 CONTAMINAÇÕES MICROBIANAS

As contaminações microbianas na cultura de tecidos *in vitro* são extremamente comuns e são admitidas até 2% de perda por subcultivos. Entretanto, o grande problema

das contaminações é que elas podem atingir 10% de perdas na produtividade de laboratórios comerciais, podendo resultar no completo insucesso do processo produtivo de mudas micropropagadas (CASSELLS, 2001).

As contaminações geralmente ocorrem no momento da introdução dos explantes no meio de cultivo, em função da presença de microrganismos endofíticos ou microrganismos que resistam aos procedimentos básicos de desinfestação (LONDE et al., 2007; PANICKER et al., 2007). Dentre os principais agentes contaminantes estão os fungos, leveduras, bactérias, vírus e viroides, que podem ser patogênicos ou latentes não patogênicos nas plantas cultivadas *in vitro* (HERMAN, 1990).

Apesar da possibilidade de se tornarem patogênicos às plantas formadas, os principais problemas do estabelecimento de agentes contaminantes no meio de cultura é a sua capacidade de competir com a planta pelos nutrientes deste meio, e também a possibilidade de excretarem no meio de cultura substâncias que sejam tóxicas ao desenvolvimento normal dos explantes (PEREIRA, 2010).

Independentemente do tipo de associação promovida pelo agente contaminante com o explante é necessário que todo o material seja descartado, evitando-se desta forma a proliferação dos casos de contaminações no laboratório. No entanto, desde que sejam tomados todos os cuidados necessários de desinfestação a possibilidade de se reduzir o número de contaminantes dos explantes, é grande e pode tornar eficiente o processo produtivo. Por isso, têm sido pesquisados e desenvolvidos diversos protocolos de desinfestação, baseando-se no tipo de contaminante, espécie vegetal trabalhada e no tempo de ação dos produtos desinfetantes sobre o tecido vegetal (PEREIRA, 2010).

Sousa et al. (2007), avaliando contaminações microbianas na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*, observaram as contaminações somente após transferir o material de cultivo do escuro para o ambiente com luminosidade, onde registraram 60% de contaminações mais pronunciadas na primeira e segunda avaliação, sendo que 97% destas foram descritas como contaminações fúngicas e 3% de origem bacteriológicas. Entretanto, a partir da utilização de carvão ativado nos meios de cultivo foi observada uma redução significativa das contaminações, apresentando 40% menos contaminações do que os meios sem adição de carvão ativado.

Borsoi (2009), avaliando a desinfestação de explantes em cultivo *in vitro* de *Pietro da Dalmácia*, observou que o aumento das concentrações de hipoclorito de sódio no momento da desinfestação de explantes, bem como o aumento no tempo de imersão dos

explantes na solução de hipoclorito influenciaram significativamente a porcentagem de contaminações ocasionadas no meio de cultivo. Entretanto, apesar de apresentar um papel positivo na desinfestação dos explantes, verificou-se que após os 30 dias de cultivo a taxa de sobrevivência dos explantes imersos em maiores concentrações de hipoclorito foi menor, ou seja, apesar de ser um bom desinfetante, sua utilização em excesso pode ocasionar a morte dos explantes dependendo da espécie trabalhada.

Pereira et al. (2010), realizou um teste objetivando averiguar a influência de diferentes concentrações (0, 5, 6, 7 e 8 g.L⁻¹) do antibiótico agrimicina na desinfestação de explantes de bananeira “Grande Naine”, e observaram que nas concentrações acima de 6 g.L⁻¹ os resultados foram significativos, sendo que nestes tratamentos não foram verificadas contaminações na fase de estabelecimento, enquanto nos tratamentos nos quais procedeu-se somente desinfestação com álcool 70% e hipoclorito de sódio foi verificada a maior porcentagem de contaminações. Estes resultados demonstram a necessidade de se implementar protocolos de desinfestação a fim de reduzir os riscos de contaminações existentes nos cultivos *in vitro*, que podem ocasionar perdas severas na produção de mudas em larga escala.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível observar através desta revisão que, de fato, vários são os fatores que podem influenciar o desenvolvimento das técnicas referentes à micropropagação *in vitro*. Portanto, o sucesso desta atividade está intimamente relacionado à observação destes fatores.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H.V. de. Respiração. In: FERRI, M.G. (Coord.) **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1985. v.1, p.251-279.
- ANDRADE, S.R.M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Documentos 58**. Embrapa Cerrados. Planaltina, 2002. 16 p.
- ARAÚJO, M.C.R.; CASTRO, A.M.; CHAGAS, E.A.; SILVA, M.L.; COUCEIRO, M.A.; FLORES, P.S. Uso de antibióticos no controle da contaminação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Bento Gonçalves. 2012. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/950519/1/Nilma2usodeantibioticos.pdf>> Acesso em: 01 de dezembro, 2017.
- ARIGITA, L.; TAMÉS, R.S.; GONZÁLES, A. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiology Plantarum**. 115: 166-173. 2002.
- BATISTA, D.S. Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.). **Dissertação** (Mestrado). UFV. Viçosa-MG, 2012.
- BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. (Eds.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 227-253.
- BORSOI, N.L. Desinfecção de explantes e cultivo *in vitro* de Pietro da Dalmácia (*Chrysanthemum cinerariaefolium* cv. *Vacaria*). **Dissertação** (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2009.
- BRAUN, H.; LOPES, J.C.; SOUZA, L.T.; SCHMILDT, E.R.; CAVATTE, R.P.Q.; CAVATTE, P.C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 539-546, jul./set. 2010.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998, p. 87-131.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPH, 1990. p.37-70.
- CAMOLESI, M.R.; KAIHARA, E.S.; SACONI, C.G.; FARIA, R.T.; NEVES, C.S.V.J. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira “maçã”. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, jul./ago., 2007.

CANHOTO, J.M. Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. **Imprensa da Universidade de Coimbra**. Coimbra: [s.n.]. 2010 407 p.

CARVALHO, A.C.P.P.; TOMBOLATO, A.F.C.; RODRIGUES, A.A.J. Panorama da Cultura de Tecidos no Brasil com Ênfase em flores e Plantas Ornamentais. In: JUNGHANS, T.G. (Ed.) Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. 2ª Edição revista e ampliada. Brasília. EMBRAPA, 2013. P. 13-54.

CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**. v.29, n.6. Viçosa-MG. 2005. p.887-895.

CARVALHO, J.M.F.C. Aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* en la multiplicación y mejora del algodón. 1996. 174p. **Tese** (doutorado). E.T.S.I.U.P.M., 1996.

CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, M.M.A.; AIRES, P.S.R.; VIDAL, M.S.; PIMENTEL, N.W. Embriogênese Somática. **Documentos 152**. 35p. Embrapa Algodão. Campina Grande, 2006.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. Noções de cultivo de tecidos vegetais. **Documentos 116**. Embrapa Algodão. Campina Grande. 2003. 39p.

CARVALHO, R.F; PERES, L.E.P. Fotomorfogênese. Apostila. Disponível em:< <http://www.miniweb.com.br/Ciencias/artigos/fotomorfogênese.pdf>> Acesso em: 28 de novembro de 2017, às 09:55h.

CASSELLS, A.C. Aseptic microhydroponics: a strategy to advance microplant development. **Acta Horticulturae**. The Hague, v. 530, p. 187-194, 2000b.

CASSELLS, A.C. Contamination and this impact in tissue culture. **Acta Horticulturae**. The Hague, v. 560, p. 353-359, 2001.

CASTRO, P.R.C; KLUGE, R.A., PERES, L.E.P. Hormônios e reguladores vegetais. In: **Manual de Fisiologia Vegetal**. Editora Agronômica Ceres, Piracicaba, 2005. p. 389-399.

CHAGAS, E.A.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; PIO, L.A.S; DUTRA, L.F.; CAZETTA, J.O. Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1125-1131, nov./dez., 2005.

CHERNYAD'EV, I. I. Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 36, n. 6, p. 527-539, Nov./Dec. 2000.

CID, L.P.B. **Cultivo in vitro de plantas**. 3ª edição ampliada. Brasília, DF. EMBRAPA, 2014. 325p.

CID, L.P.B. El cultivo de tejidos. In: PIETRO, H.; JORDAN, M; BARRUETO CID, L.P.; CORDEIRO, M.C.; DURZAN, D.J. **Biotecnologia vegetal**. Santiago-Chile: Inia, 2005. p. 35.

CID, L.P.B.; ZIMMERMANN, M.J. A contaminação *in vitro* de Plantas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. 2006). 20p.

COLA, M.P.A; COLA, G.P.A; ANDRADE, E.K.V.; SILVA, N.C.B. Controle da oxidação *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia uniflora* L. XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2010.

CONCEIÇÃO, A.M.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J.B. Influência do ácido acetilsalicílico, da sacarose e da temperatura na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de batata. **Horticultura brasileira**, v. 17, n. 3, p. 182-185, nov. 1999.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.T.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n.48/49, p.107-116, jan./dez.1995.

DANTAS, S.A.F., OLIVEIRA, S.M.A. & CÂMARA, T.R. 2002. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 10: 391-403.

DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, p.270-276, 1983.

DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, p. 270-276, 1983.

DIGNART, S.L. **Luz e sacarose na micropropagação de Cattleya walkeriana**: alterações anatômicas e fisiológicas. Biblioteca Central da UFLA. Lavras, 2006.

DINIZ, J.D.N.; ALMEIDA, J.L.; OLIVEIRA, A.B.; BEZERRA, A.M.E. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**. v. 39, n. 01. Fortaleza. 2008. p. 107-113.

DONATO, V.M.T.S., ANDRADE, A.G., TAKAKI, G.M.C., MARIANO, R.L.R. & MACIEL, G.A. 2005. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, 29: 134-141.

DONINI, L.P.; DUTRA, L.F.; SILVA, S.D.A.; SILVA, N.D.G.; THIEL, F.B. Estabelecimento *in vitro* de pinhão-manso. 2 - Concentrações de carvão ativado. **II Congresso brasileiro de pesquisas de pinhão-manso**. Brasília – DF. 2011.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of Passiflora. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 36, n. 2, p. 211-217, feb. 1994.

DREW, R. A. In vitro culture of adult and juvenile bud explants of *Pasiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 23-27, jul. 1991.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de Macieira (*Malus domestica* Borkh.) CVS, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, n. 3, v.9, p. 221-227, 2003.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1276-1277, 1997.

FERREIRA, M.G.R.; CARDÉNAS, F.E.N.; CARVALHO, C.H.S.; CARNEIRO, A.A.; FILHO, C.F.D. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 3, p. 473-476, dezembro 2001.

FRANCK, T. et al. Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. energy deficient. **Plant Science**, v.160, p.1145-1151, 2004. Disponível em: Acesso em: 30 de novembro, 2017.

FURTADO, M.B. Indução e controle da embriogênese somática em *O. Catharinensis* e *O. odorifera*. **Dissertação** (Mestrado). Universidade de São Paulo. 2009.

FUZITANI, E.J.; NOMURA, E.S. Produção de Mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. Campinas, v.10, n.1/2, p.15-19, 2004.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, p. 151-158, 1968.

GARCIA, N.F. et al. ROS as biomarkers of hiperhydricit. In: GUPTA, D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. London Local: Sciences Publishers, 2011. Cap.12, p.249-272.

GEORGE, E. F. (Ed.). Plant propagation by tissue culture. Part 1. – **The technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure: background. In: GEORGE, E. V.; HALL, M. A.; DE KLERK, G -J. **Plant propagation by tissue culture**. Springer, Dordrech, The Netherlands. 2008. p. 1-28. v. 1.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Basingstoke: Edington, 1996.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D.; **Plant propagation by tissue culture**. Eversley; Exegetics, 1984. 709p.

GOLLE, D.P.; REINIGER, L.R.S.; CURTI, A.R.; LEÓN, E.A.B.; Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, jan.-mar., 2012.

GONÇALVE, T.S.; BARBOSA, W.M.; NANNETTI, D.C.; SANTOS, L.G.M.; CAPRONI, D.T.R.; MELO, F. Oxidação *in vitro* de *Olea europaea* L. 5ª Jornada Científica e Tecnológica e 2º Simpósio de Pós-Graduação do IFSULDEMINAS. Inconfidentes-MG. 2013.

HENRIQUE, P.A.; ALVES, J.D.; DEUNER, S.; GOULART, P.F.P.; LIVRAMENTO, D.E. Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de mudas de café cultivadas sob telas de diferentes colorações. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília. v.46, n.5, p.458-465, maio 2011.

HERMAN, E.B. Bacterial contamination in micropropagation. **Agricell Report**. Mohegan Lake, v. 14, p. 41-43, 1990.

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

JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M.; SOUZA, A. S. **Cultivo in vitro de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura**. In. XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura: Os Novos Desafios da Fruticultura Brasileira, Belém. 2002. CD-ROM.

JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2ª edição. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

JUNIOR, J.M.S.; CASTRO, E.M.; RODRIGUES, M.; PASQUAL, M.; BERTOLUCCI, S.K.V. Variações anatômicas de *Laelia purpurata* var. *cárnea* cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades e qualidade spectral de luz. **Ciência Rural**, v.42, n.3, p.480-486. 2012.

KANEKO, K.; MOROHASHI, Y. Effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons. **Plant Science**. Limerick, v. 52, p. 61-65, 1998.

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. In vitro micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple passionfruit). **Annals of Botany**, Oxford, v. 65, n.3, p. 337-339, mar. 1990.

KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, p. 281-284, 1995.

KEVERS, C. et al. Hyperhydricity of micropropagated shoots: at typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p.181-191, 2004.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 77, p. 181-191, 2004.

KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation in vitro: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. **Physiologie Végétale**, v.244, p.647-653, 1986.

KUMAR, P.P.; LAKSHMANAN, P.; THORPE, T. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. **In Vitro-Plant**, New York, v. 34, p. 4-103, 1998.

LEIFERT, C.; MORRIS, C.E.; WAITES, W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems in vitro. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Netherlands, v.13, p. 139-183, 1994.

LEMOES, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; NETO, C.E.R.; ALBUQUERQUE, M.M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators**, Ashville, v. 30, p. 421-427, 1980.

LONDE, L.N., SOUSA, C.S., VIEIRA, C.U., BONETTI, A.M. & KERR, W.E. 2007. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Biosci. J.**, 23: 94-100.

MALDANER, J.; SCHWALBERT, R.; STEFFEN, G.P.K.; SALDANHA, C.W.; MORAIS, R.M. Efeito de concentrações de sacarose na morfogênese *in vitro* de *Desmodium incanum* DC. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 847. 2014.

MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**. Dorchrecht, v. 28, n. 2, p. 133 – 142, June 1999.

MARTINS, L.S. Biotecnologia e agricultura no Brasil contemporâneo. Disponível em: <http://www.proec.ufg.br/revista_ufg/agro/B24_biotecnologia.html> Acesso em: 15 de novembro de 2017.

MASSARO, R. Qualidade da luz no crescimento *in vitro* e aclimação de dois cultivares de *Phalaenopsis amabilis* Blume (Orchidaceae). Biblioteca Comunitária da UFSCar. 2013.

MOLLO, L. Efeito da temperatura no crescimento, no conteúdo e na composição de carboidratos não-estruturais de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*. **Dissertação** (Mestrado). Instituto de Botanica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. de. Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora*. 2000, 82p. **Dissertação** (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p473-497, 1962.

OLIVEIRA, L.M.; PAIVA, R. SANTANA, J.R.F.; NOGUEIRA, R.C., SOARES, F.P.; SILVA, L.C. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo in vitro de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 025-030, Abril 2007

OLIVEIRA, R.B.; SILVA, A.F. ZUCOLOTO, M.; LIMA, J.S.S. Variação da anatomia foliar de plantas de *Coffea canephora* Pierre submetidas a diferentes intensidades luminosas. X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2006.

ORI, S.S. Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* (Lineu)Blume (Orchidaceae) cultivada in vitro. **Dissertação** (mestrado). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, 2006. 133 p. il.

ORTOLANI, D.; SCHUELTER, A.; SCHUSTER, I.; VENDRUSCOLO, E. Efeito da temperatura e luminosidade na regeneração in vitro de plantas de trigo. **Scientia Agraria**, v.8, n.1, p.61-65, 2007.

OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Isolamento de protoplastos de mesófilo de *P. suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 43, p. 157-164, 1996.

PAIVA, P.D.O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação in vitro de crisântemo. **Revista Ceres**, 1999. p. 141-148.

PANICKER, B., THOMAS, P., JANAKIRAM, T., VENUGOPALAN, R. & NARAYANAPPA, S.B. 2007. Influence of cytokinin levels on in vitro propagation of shy suckering chrysanthemum “*Arka Swarna*” and activation of endophytic bacteria. **In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant**, 43: 614-622.

PASQUAL, M. **Introdução à cultura de tecidos**. Lavras: ESAL, 1990. 33p.

PEREDO, E.L. Genetic and epigenetic stability of criopreserved and cold-stored hops. **Cryobiology**. 2008.

PEREIRA, G. A.; ALVES, L. M. S. M.; BOLIANI, A.C.; JUNIOR, E.F.; MORAES, A.M. Controle de contaminantes em explantes de bananeira ‘Grande Naine’ na micropropagação in vitro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, n.2, p.35-39, jun. 2010.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L.S., BOLIANI, A.C. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira ‘Grande Naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Volume especial, E. 222-226. Jaboticabal – SP. Outubro, 2011.

PEREIRA, G. A.; RIBEIRO, B. V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M. B. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.2, p.43-46, 2009.

PEREIRA, J.E.S. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, 2010.

PEREIRA, S.F. Influência das citocininas nos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos do cultivo in vitro da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Tese** (Doutorado). Lavras: UFLA, 2008. 75 p.: il.

PIERIK, R.L.M. Cultivo In vitro de las plantas superiores. Madrid: Mundiprensa, 1988.
 QUISEN, R.C.; ANGELO, P.C.S. **Manual de Procedimentos do laboratório de Cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM. 1990.

RADMANN, E.B.; BIANCHI, V.J.; SOUZA, T.M.; FACHINELLO, J.S.; OLIVEIRA, R.P. influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.2, p.095-101, Mar.Apr. 2009.

RADMANN, E.B.; FACHINELLO, J.S.; PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 624-628, dezembro 2002.

REED, B.M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micro-propagated hazelnut: Identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.52, p. 67-70, 1998.

RESENDE, J.C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S.P.; PEREIRA, A.R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e da concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas de embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2008.

RIBEIRO, A.P. Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videira. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2012.

RIBEIRO, V.G.; SANÁBIO, D.; SOUZA, C.N.; LOPES, P.S.N.; BOCARDO, M.R.; PASQUAL, M. Efeitos do ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) RAF. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 27-30, jan. 2000.

RODRIGUES, C. Produção, extração e Purificação de Hormônio Vegetal (Ácido Giberélico) por Fermentação no Estado Sólido em Polpa Cítrica e Utilização do Extrato Fermentado em Meio de Cultivo de Bromélias *in vitro*. **Tese** (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2010.

RODRIGUES, P.H.V.; DUTRA, M.F.B.; FARIA, O.A.; LIMA, A.M.P. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental, *Ananas bracteatus* Schultes var. *striatus* (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 12, n.2, p. 122-125, 2007.

ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.58, p.131-140, 1971.

SALISBURY, F. B. & ROSS, C. W. 1991. **Plant Physiology**. 4th ed. California; Wadsworth Publishing Company, 682p.

SANTIAGO, G. Variação somaclonal nas cultivares de batatas Asterix e Atlantic por marcadores morfológicos e microssatélites. **Tese** (Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2011.

SANTOS, C.C.C.; RODRIGUES, P.H.V. Variação somaclonal de mudas micropropagadas de bananeira, cultivar *Pacovan*. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.

SANTOS, D.S. Micropropagacao da bromelia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch e a influência do etileno. **Dissertação** (Mestrado). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, 2009. 121 p. il.

SANTOS, T.C.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; MENEZES, M.M.L.A.; Conservação in vitro de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) ROBERTY (Poaceae). **Bioscience J.**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 963-970, Nov./Dec. 2012.

SATO, A.Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; CECON, P.R.; JUNQUEIRA, C.S. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1235-1237, 2001.

SCAGLIUSI, S.M. A cultura de Tecidos e o melhoramento genético vegetal. Disponível em: < <https://www.seedquest.com/News/releases/2008/december/24603.htm> > Acesso em: 31/12/2017.

SCORZA, R.; JANICK, J. In vitro flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Dordrecht, v. 105, p. 892-897, 1980.

SHINGA, S. Influence of agar concentration on “in vitro” shoot proliferation of *Malus* sp. *Almey* and *Pyrus communis* Seckel. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.107, p.657-660, 1982.

SILVA, E.F. Multiplicação e crescimento in vitro de orquídea *Brassiocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber glow. **Dissertação** (Mestrado). Lavras: UFLA, 2003. 62 p.: il.

SILVA, J.T. S.; NHUT, D.T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 97, p. 397-410, 2003.

SILVA, S.M.G. Reguladores vegetais no desenvolvimento *in vitro* de Bromélia (*Aechmea blanchetiana*). **Dissertação** (Mestrado). Botucatu: [s.n.], 2010.

SIMÕES, M.A.; VASCONSELOS, J.M.; OLIVERA, J.P.; BELTRÃO, R.T.; MANFIO, C.E.; JUNIOR, P.C.P.F.; RAPOSO, A. Efeito do ácido giberélico (AG₃) no alongamento *in vitro* de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) durante a micropropagação. **Amazonia: Ciência & Desenvolvimento**, Belém, v. 7, n. 14, jan./jun. 2012.

SOARES, F.P. Influência das citocininas nos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Tese** (Doutorado). Lavras: UFLA, 2008. 75 p.: il.

SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; SORGATO, J.C.; ROSA, D.B.C.J.; PEREIRA, S.T.S. utilização de agentes geleificantes alternativos no cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 1832-1838. 2014.

SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; SUZUKI, R.M.; SCALON, S.P.Q.; ROSA JUNIOR, E.J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.617-623, 2012.

SOUSA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISAAC, V.L.R.; FARIA, S.P.; CAMPOS, M.R.C. Contaminação Microbiana na Propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 405-407, jul. 2007.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, F.V.D.; SANTOS-SEREJO, J.A. Micropropagação da Mandioca. In: JUNGHANS, T.G. (Ed.) Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. 2ª Edição revista e ampliada. Brasília. EMBRAPA, 2013. P. 345-372. 2006.

SOUTO, J.S.; MORIMOTO, J.M.; FERREIRA, W.M.; NAKABASHY, M.; SUZUKI, R.M. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 179-185, abr./jun. 2010.

SOUZA, C.B.L.; LEMOS, O.F., SOARES, B.O.; SANTOS, L.R.R. **Citocininas no cultivo *in vitro* de pimenteira-do-reino**. 18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/994739/citocininas-no-cultivo-in-vitro-de-pimenteira-do-reino>> Acesso em: 01 de dezembro, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre-RS: Editora Artmed, 2004. 719 p.

TANPRASERT, P.; REED, B. Detection and identification of bacterial contaminants on strawberry runner explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.52, p.53-55, 1998.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2001.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 2001. (EMBRAPA-CNPq. Circular Técnica). 20p.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa AAB*) *in vitro*. I. concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 225-229, agosto 2001.

VASCONSELOS, A.V.G.; TOMAS, L.F.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v.42, n.5, mai, 2012.

VASIL, V; HILDERBRANT, A.C. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. **Science**, Washington, v. 150, p. 889-892, 1965.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G.B.; RIBEIRO R.C.L. Changes in soluble carbohydrate and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Amsterdam, v. 54, n. 2, p. 105-111, 1998.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L.A.S.; ASSIS, F.A.; TEODORO, G.S. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. **Revista Ceres**, p. 118-124, 2007.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L.A.S.; ASSIS, F.A.; ZÁRRAGA, Z.A. Efeito de concentrações de glicina e inositol no cultivo **in vitro** de duas frutíferas de clima temperado. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1637-1642, set./out., 2008.

XAVIER, A.; OTONI, W.C. Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**. 33(2). 2009

WENDLING, I. Propagação Vegetativa. I Semana do Estudante Universitário. 2003. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/50925/1/Wendling.pdf> Acesso em: 01 de dezembro, 2017.

WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**, v.89, p.977-981, 1989.