

# MICROPROPAGAÇÃO DE CRISÂNTEMO (*Dendranthema grandiflora* TZEVELE CV. RAGE) SOB LUZ NATURAL E ARTIFICIAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO DE CULTIVO

## MICROPROGATION OF CHRYSANTHEMUM (*Dendranthema grandiflora* TZEVELE CV. RAGE) UNDER NATURAL AND ARTIFICIAL LIGHT IN DIFFERENT CONCENTRATION OF THE CULTURE MEDIA

DANIELLA INES BORGES<sup>1</sup>; MARCELO CAETANO DE OLIVEIRA<sup>2</sup>; EDWALDO DOS SANTOS PENONF<sup>3</sup>; TULLIO RAFHAEL PEREIRA DE PÁDUA<sup>4</sup>; FRANCYANE TAVARES BRAGA<sup>5</sup>; MOACIR PASQUAL<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma - Departamento de Agricultura/DAG - Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – dinesborges@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Agricultura/DAG - Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – caetanocaldas@hotmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Agricultura/DAG - Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – espenoni@bol.com.br,

<sup>4</sup> Departamento de Agricultura/DAG - Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – trpp2000@yahoo.com.br,

<sup>5</sup> Bióloga, Doutoranda - Departamento de Agricultura/DAG - Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – ft.braga@hotmail.com

<sup>6</sup> Departamento de Agricultura/DAG - Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – mpasqual@ufla.br

### RESUMO

O cultivo *in vitro* tem sido aplicado em muitas culturas para a obtenção de plantas matrizes, especialmente em plantas ornamentais. Um dos fatores que elevam os custos de produção de mudas micropropagadas é o consumo de energia elétrica em salas de crescimento. Neste trabalho objetivou-se determinar a melhor concentração do meio MS para a propagação de plântulas de crisântemo, em dois ambientes de cultivo (sala de crescimento e casa de vegetação). Foram utilizados segmentos nodais de plântulas de crisântemo inoculados em frascos, contendo 0, 25, 50, 75 e 100% de meio MS. Após 45 dias, foram avaliadas as seguintes características: número de folhas, brotos e raízes, além do comprimento da parte aérea das plântulas. Os resultados obtidos, demonstraram superioridade do regime de luz natural em todos os tratamentos com aumento de 96,58% no número de folhas, 80% para número de brotos e raízes, e 12,0% para o comprimento de parte aérea quando comparadas às plantas incubadas sob luz artificial.

**Termos para indexação:** meio MS, cultura ornamental, ambiente de cultivo.

### ABSTRACT

*In vitro* culture has been applied in many cultures in order to obtain matrix plants, especially in ornamentals. The objective of this study was to determine the best concentration of MS medium for the propagation of seedlings of chrysanthemum in two cultivation environments (growth room and greenhouse). Nodal segments of chrysanthemum plantlets were inoculated into flasks containing 0, 25, 50, 75 and 100%

MS medium. The experiment was conducted in DIC 5 x 2, resulting in 10 treatments and 7 replicates with 5 nodal segments. After 45 days, the following characteristics: number of leaves, shoots and roots and shoot length were evaluated. The results showed superiority of the regime of natural light in all treatments with an increase of 96.58% in the number of leaves, 80% for shoots and roots, and 12% for shoot length when compared with plants incubated under artificial light.

**Index terms:** MS media, ornamental culture, culture environment

### INTRODUÇÃO

O crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzevele) tem grande valor comercial por ser uma das culturas ornamentais de maior aceitação no mercado, pela beleza de suas inflorescências (IMENES & ALEXANDRE, 1996). Segundo Aki (2004), estima-se que, anualmente, sejam comercializados cerca de 16 milhões de vasos no país, sendo possível sua propagação via sementes, estacas ou rebentos (CUQUEL et al., 1992; CUQUEL & MINAMI, 1994; BEZERRA, 1997). Tradicionalmente, o crisântemo é propagado por estacas, porém, nesse método, tem-se observado problemas de contaminação por viroses, causando grandes prejuízos aos produtores (CHAGAS et. al., 2004).

(Recebido em 26 de novembro de 2009 e aprovado em 10 de janeiro de 2011)

Sendo assim, a utilização da cultura de tecidos tem como objetivo melhorar a produção, reduzindo custos e aumento de produtividade (QUERALT et al., 1991). A micropropagação é uma forma de propagação assexuada em que se cultivam diferentes tipos de explante *in vitro*, desde meristemas, sementes ou embriões zigóticos, até folhas, segmentos caulinares e raízes; com o objetivo de obter produção em escala comercial de plantas livres de patógenos, utilizando menor espaço físico (BHOJWANI, 1990; SAGAWA & KUNISAKI, 1990). Para que esse método de propagação se torne viável, é necessário reduzir o elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são, normalmente, incubadas (KODYM & ZAPATA-ARIAS, 1999; SAVANGIKAR, 2004; ERIG & SCHUCH, 2005; BRAGA, et al., 2009).

Existem grande variedade de meios utilizados para a micropropagação a escolha desse deve ser efetuada em função da espécie e tipo de cultivo que está sendo efetivado (PASQUAL et al., 1997). Os meios nutritivos utilizados na micropropagação fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Nesse sentido, verifica-se que o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) vem favorecendo o crescimento e desenvolvimento de várias espécies. Porém, a utilização de composições mais diluídas para algumas espécies, como no caso da videira, tem fornecido melhores resultados (SILVA & DOAZAN, 1995). Várias mudanças de padrão foram propostas na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro*, essas, visam principalmente, a redução ou incremento de alguns componentes (VILLA et al. 2008).

Assim, uma alternativa para esse fator seria o cultivo de plântulas *in vitro* em ambiente de luz natural, substituindo a luz artificial, cujas vantagens vem sendo estudadas por diversos pesquisadores. Costa et al. (2009) avaliaram a influência do ambiente de cultivo *in vitro* de duas cultivares de bananeira e com exceção do comprimento da parte aérea, verificaram que a luz natural proporcionou

melhores respostas para a cv. Caipira. Além disso, o enraizamento *in vitro* sob luz natural promoveu maior rusticificação das cultivares, com 100% de sobrevivência *ex vitro*.

Kodym & Zapata-Arias (1999) obtiveram maior número de brotações de bananeira (*Musa* sp.) em casa de vegetação sob luz natural quando comparado com sala de crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Dignart (2009) no cultivo *in vitro* de *Cattleya* sp. em casa de vegetação.

Diante disso, é provável que a luz natural apresente vantagens sobre o sistema de iluminação artificial, principalmente quanto às alterações anatômicas e fisiológicas. Sob estas condições destacam-se o crescimento de plântulas micropropagadas e a melhoria das características fisiológicas, em razão do ambiente de cultivo ser semelhante ao natural, o que facilita a adaptação das plantas quando transplantadas para ambiente *ex vitro*.

Neste estudo, objetivou-se determinar a melhor concentração de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), para a propagação de plântulas de crisântemo, sob condições de luz artificial (sala de crescimento) e de luz natural (casa de vegetação).

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e em casa de vegetação do Departamento de Agricultura, na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Em câmara de fluxo laminar, foram inoculados 5 segmentos nodais, contendo pelo menos uma gema por frasco. Os seguimentos nodais foram retirados de plântulas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* cv. Rage) pré-estabelecidas *in vitro*. Os frascos foram fechados com tampas de polipropileno e vedados com plástico parafilme. Em seguida, estes foram igualmente distribuídos em duas condições de cultivo: sala de crescimento (luz artificial) com um fotoperíodo de 16 horas de luz, sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com densidade de fluxo de fótons de  $5,52 \text{ W m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes e em casa

de vegetação (luz natural) sob sombrite a 50% com temperatura ambiente entre os meses de setembro e outubro de 2007.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 5x2. Foram testadas diferentes concentrações do meio de cultura MS (0, 25, 50, 75 e 100%), acrescido 7g L<sup>-1</sup> de ágar e 30g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 6,0. Foram adicionados aos frascos, 15mL do meio de cultivo, os quais foram autoclavados a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos. Após 45 dias de incubação, foram avaliados: número de folhas, brotos e raízes além do comprimento da parte aérea das plântulas. Os dados foram comparados pelo programa SISVAR 4.3 (FERREIRA, 2000).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as análises estatísticas, as variáveis regime de luz e tratamento mostraram-se significativas ( $P \leq 0,05$ ) para todos os itens avaliados. Já, a interação regime de luz/tratamentos, mostrou-se significativa ( $P \leq 0,05$ ) apenas para número de folhas (Tabela 1).

Plântulas de crisântemo cultivadas *in vitro*, quando mantidas sob o regime de luz natural apresentaram um

incremento de 96,58% no número de folhas. Já para o número de brotos e raízes, o acréscimo foi da ordem de 80% quando comparadas às plantas incubadas sob luz artificial. Analisando o comprimento de parte aérea, para os dois regimes de luz, os resultados mostraram-se estatisticamente diferentes com os valores médios diferindo em apenas 12,0% (4,7 mm) (Tabela 2).

As diferenças constatadas no desenvolvimento das plântulas sob luz natural, possivelmente, se dão pelo aumento da intensidade luminosa, o que provocaria uma redução nas concentrações de auxinas endógenas das gemas, sendo que esses fitohormônios são fotooxidados, levando a um desbalanceamento hormonal em direção as citocininas (RADMANN et al., 2001; SCOUNTOUNCHAINAKSAENG et al., 2001). Além disso, pelas condições de umidade e luminosidade a que são submetidas, as plantas cultivadas *in vitro* tendem a sofrer alterações fisiológicas e morfológicas durante seu desenvolvimento, o que pode prejudicar sua adaptação na fase de aclimação, resultando em prejuízos ao produtor (DONNELLY & TISDALL, 1993).

Quando mantidos sob regime de luz natural, o número de folhas, brotos, raízes e o comprimento da parte aérea apresentaram resultados crescentes até a

**TABELA 1** – Resumo da Análise de variância para: Número de folhas (NF), brotos (NB) e raízes (NR) e comprimento de parte aérea (CPA) de plântulas de crisântemo em diferentes regimes de luz (Natural e Artificial) e diferentes concentrações do meio MS.

F. Variação	QM			
	NF	CPA	NB	NR
Reg. Luz	2252.69*	4.05*	29.71*	245.91*
Tratamento	507.00*	14.43*	1.60*	105.48*
RL*Trat	108.43*	0.43 <sup>ns</sup>	0.51 <sup>ns</sup>	6.82 <sup>ns</sup>
CV%	24,90	21,14	34,96	24,42

\*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Scott & Knott, a 5%. <sup>ns</sup> Não significativo

Regime de luz	Itens avaliados			
	NF	NB	NR	CPA
Luz Artificial	11,7 b*	1,5 b	4,7 b	3,33 b
Luz Natural	23 a	2,7 a	8,5 a	3,80 a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Scott & Knott, a 5%.

concentração de 75% do meio MS, sugerindo que alterações na concentração do meio podem favorecer o desenvolvimento da *Dendranthema grandiflora* cv. Rage. (Figura 1).

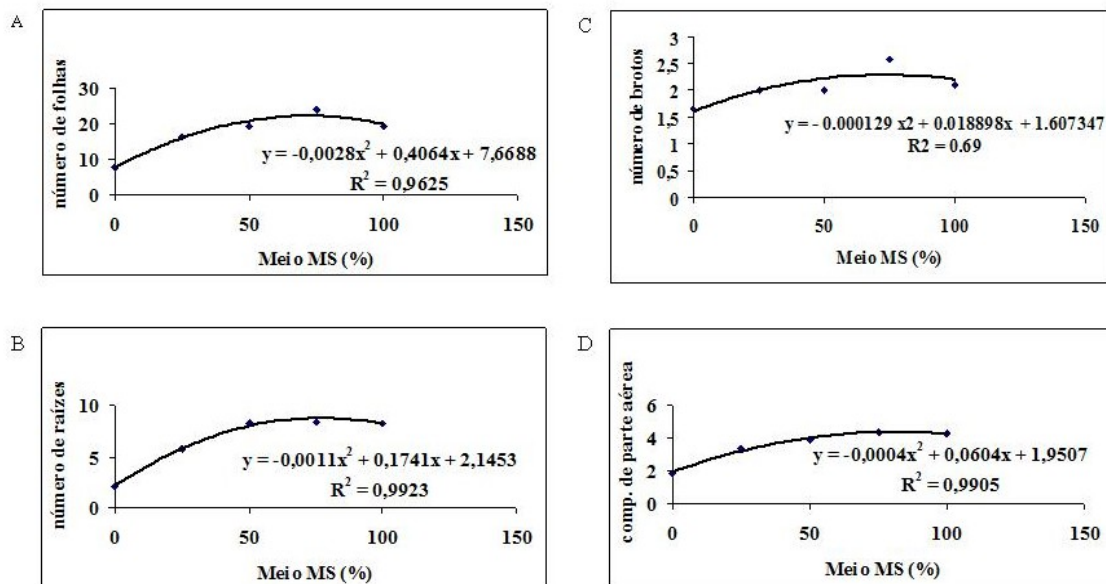
O crescimento das culturas de células e tecidos vegetais *in vitro* depende em parte da otimização da concentração de três grupos de componentes do meio de cultura, a saber: os fitoreguladores, as substâncias orgânicas e os nutrientes minerais. Para Morard & Henry (1998) e Morard et al. (1999), em alguns casos, a alteração da composição mineral parece ser a que mais traz benefícios. Em *Solanum tuberosum* L., Sarkar & Naik (1998) observaram que a redução até a quarta parte da concentração de N do meio MS proporcionou aumento no número de raízes por planta. Por outro lado, estudos realizados por Nicoloso et al. (2001) mostram que a percentagem de enraizamento (91%) da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen não foi influenciada pela variação conjunta de todos macronutrientes do meio de cultura MS.

Observou-se uma diminuição na quantidade de raízes na concentração de 100% do meio MS quando comparada às concentrações de 50 e 75% do meio MS.

Esse menor valor pode estar relacionado à alta concentração salina encontrada no meio MS a 100%, causando fitotoxidez às raízes, diminuindo seu desenvolvimento.

Resultados superiores foram obtidos sob o regime de luz natural e quando foi utilizado o meio MS a 75% (Tabela 3). Um menor crescimento de parte aérea foi também observado nas concentrações de 25, 50 e 100%. Os resultados encontrados devem estar relacionados à incidência da luz no ambiente, visto que, em casa de vegetação, o desenvolvimento das plântulas foi mais pronunciado (maior número de brotações) quando comparados com plântulas incubadas em sala de crescimento, onde a fonte luminosa estava posicionada logo acima dos frascos, o comprimento das brotações foi maior. Rocha (2007) explica que o maior crescimento dos brotos pode ser resultado do processo de estiolamento, induzido pela luminosidade deficiente nas salas de crescimento, ocasionando maior crescimento dos entrenós com caules mais finos.

Possivelmente, as alterações promovidas pelo ambiente podem tornar a folha semelhante àquela



**FIGURA 1** – Resposta do número de folhas (A), número raízes (B), número de brotos (C) e comprimento de parte aérea (D) em plântulas de crisântemo cultivadas em casa-de-vegetação nas diferentes concentrações do meio MS.

encontrada em ambiente natural, podendo evidenciar uma maior capacidade fotossintética (DIGNART et al., 2009).

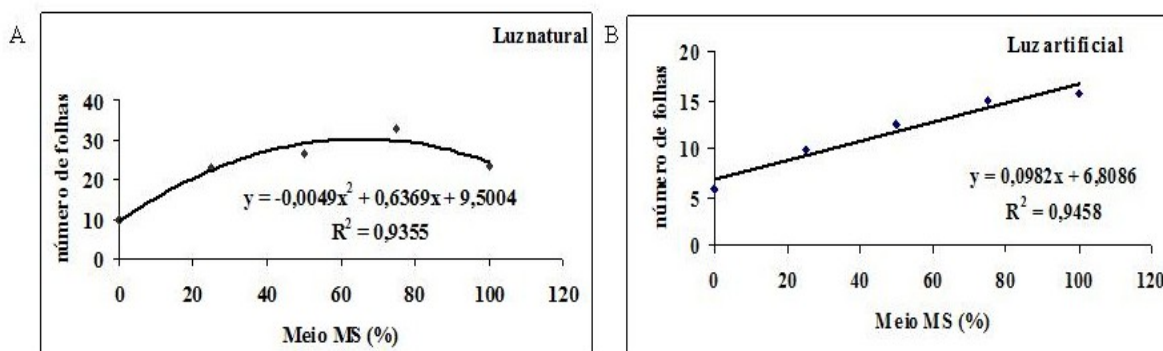
O balanço hormonal pode afetar o crescimento e desenvolvimento de plântulas. As auxinas, por serem fotoxidativas em alta intensidade de luz. As citocininas, que atuam juntamente às auxinas na divisão celular e no cultivo *in vitro*. As giberelinas, proporcionam o alongamento de brotos, o qual aumenta seu comprimento à medida que a intensidade luminosa diminui (SCONTOUNCHAINAKSAENG et al. 2001).

Na interação para o número de folhas entre concentração do meio MS e regime de luz verificaram-se comportamentos distintos em cada condição, com a melhor resposta em plantas mantidas sob regime de luz natural na concentração de 75% do meio MS. Já, para plantas mantidas regime de luz artificial o comportamento foi linear com respostas crescentes ao aumento da concentração do meio MS. Esses resultados sugerem que as condições de ambiente podem afetar o desenvolvimento das plantas (Figura 2).

**TABELA 3** – Médias do número de folhas, brotos e raízes e comprimento de parte aérea de plântulas de crisântemo cultivadas *in vitro*, sob luz artificial e natural.

Meio MS (%)	NF*	NB	NR	CPA
<b>Luz Artificial</b>				
0	5,80	1,05	1,43	1,87
25	9,90	1,25	2,88	3,55
50	12,40	1,37	6,34	4,4
75	14,85	1,69	6,37	4,60
100	15,60	1,71	5,88	4,61
<b>Luz Natural</b>				
0	9,68	2,22	2,77	1,90
25	22,90	2,74	8,03	3,22
50	26,43	2,65	10,23	3,50
75	32,94	3,48	10,51	3,63
100	23,34	2,48	9,34	3,96

\* NF: Número de folhas; NB: Número de brotos; NR: Número de raízes; CPA: Comprimento de parte aérea.



**FIGURA 2** – Número de folhas em plântulas de crisântemo cultivadas em concentrações diferentes de meio MS, em casa-de-vegetação (A) e câmara de crescimento (B).

Resultados obtidos por Lee et al. (1988) e Dousseau et al. (2008) sugerem que altas intensidades de luz propiciam um aumento no tamanho das células do mesofilo, maior espessura da folha, bem como a uma compactação celular mais pronunciada, em folhas cultivadas de *Liquidambar styraciflua*. L.. Estes afirmaram ainda, que baixas intensidades luminosas reduzem a divisão celular, resultando em reduzida área foliar, produzindo folhas mais delgadas. Diversas alterações na estrutura da folha de plantas mantidas *in vitro* têm sido reportadas, como o aumento no tamanho na densidade dos estômatos e a redução no controle estomático, na quantidade de cera epicuticular e na espessura do mesofilo, com alta proporção de espaços intercelulares (KHAN et al., 2003; HAZARIKA, 2006). Por outro lado, Nicoloso et al. (2001) sugeriram que a resposta linear positiva da *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro* à variação conjunta da concentração de todos macronutrientes do meio MS deveu-se, possivelmente, ao rápido esgotamento dos nutrientes N, P e K do meio de cultivo, em razão da sua alta taxa de crescimento.

Existem poucos trabalhos enfatizando a propagação *in vitro* de plântulas sob luz natural e, conforme os dados obtidos, essa condição de cultivo pode fornecer bons resultados no estabelecimento *in vitro* de plântulas de crisântemos.

Assim, este estudo é de suma importância na produção de mudas micropropagadas, sendo que estas responderam bem à condição de cultivo sob luz natural, visando à redução dos custos e a obtenção de mudas de alta qualidade.

### CONCLUSÕES

O efeito da luz natural foi superior ao efeito da luz artificial para o comprimento da parte aérea, número de folhas, brotos e raízes das plântulas.

No cultivo do crisântemo *in vitro*, a utilização de meio de cultivo MS a 75% mantidas sob regime de luz natural favorecem o desenvolvimento das plântulas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKI, A. **Bússola da comercialização para produtores de ornamentais**. São Paulo: Heliza Editora Comércio e Indústria Gráfica, 2004, 177 p.

BEZERRA, F. C. **Curso de floricultura**: aspectos gerais e técnicas de cultivo de flores tropicais. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 1997. 38 p.

BHOJWANI, S. S. **Plant tissue culture**: applications and limitations. Amsterdam: Elsevier, 1990. 461 p.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. DE; DIGNART, S. L.; BIAGIOTTI, G.; PORTO, J. M. P. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, mar./abr., 2009.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

CHAGAS, E. A.; FRAGUAS, C. B.; SILVA, E. N.; PASQUAL, M.; MENDONÇA, V. Multiplicação *in vitro* de crisântemo cv. White polaris. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 123-126, jan/mar, 2004.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; ROCHA, H. S.; PEREIRA, J. E. S.; CASTRO, E. M.; MIYATA, L. Y. Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v. 68, p. 303-311, 2009.

CUQUEL, F. L.; GRANJA, N. P.; MINAMI, K. Avaliação do enraizamento de estacas de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* L.) cv. White Reagan 606 tratadas com ácido indolbutírico (IBA). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 49, n. 1, p. 15-22, 1992.

CUQUEL, F.L.; MINAMI, K. Enraizamento de estacas de crisântemo [*Dendranthema morifolium* (RAMAT.) TZVELEV] tratadas com ácido indolbutírico veiculado em talco. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 51, p. 28-35, 1994.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M. de; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 780-787, 2009.

DONNELLY, D. J.; TISDALL, L. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Micropropagation of wood plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.153-166.

- DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A. DE; CASTRO, E. M. DE; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; MELO, L. A. DE. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, nov./dez., 2008.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e o uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: Sistema de análise estatística. Lavras: UFLA; DEX, 2000. Software.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 105-120, 2006.
- IMENES, S. L.; ALEXANDRE, M. A. V. **Aspectos fitossanitários do crisântemo**. São Paulo: Instituto Biológico, 1996. 47 p. (Boletim Técnico, 5).
- SHA VALLI KHAN, P. S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 55, p. 141-145, 1999.
- LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed Sweetgum Leaves. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, 1988.
- MORARD, P.; HENRY, M. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 8, p. 1565-1576, 1998.
- MORARD, P.; FULCHERI, C.; HENRY, M. Mineral nutrition of *Gypsophila in vitro* root culture. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.22, n. 4-5, p. 717-730, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p.11-18, 2001.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 127 p.
- QUERALT, M. C; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGHE, A.; DEBERGH, P. C. Ornamentals. In: DEBERGH, M.C.; ZIMMERMAN, R.H. (ed.). **Micropropagation - Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.215-230.
- RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 171-175, jul./set. 2001.
- ROCHA, H. S.; SILVA, C. R. de R.; ARAUJO, A. G. de; SILVA, A. B. da. Propagação *in vitro* de bananeira Prata Anã (AAB): intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 3, p. 10-16, 2007.
- SAGAWA, Y.; KUNISAKI, J.T. Micropropagation of floriculture crops. In: AMMIRATO, P.V. (Ed.). **Handbook of plants cell culture: ornamental species**. New York: McGraw Hill Publishing Company, 1990. Cap. 3, v. 5, p. 25-26.
- SARKAR, D.; NAIK, P. S. Effect of inorganic nitrogen nutrition on cytokinin-induced potato microtuber production *in vitro*. **Potato Research**, Wageningen, v. 41, p. 211-217, 1998.
- SAVANGIKAR, V. A. Role of low cost options in tissue culture. In INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Low costs options for tissue culture technology in developing countries**. Viena: International atomic energy agency.2004. p. 11-15.
- SCONTOUNCHAINAKSAENG, P.; CHAICHAROEN, S.; SIRIJUNTARUT, M.; KRUATRACHUE, M. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phainus tankervilleae* (banks ex L' Herit) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. **Science Asia**, Shanghai, v. 27, p. 233-237, 2001.

SILVA, A. L.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **Journal International Science of Vigne et Vin**, Bordeaux, v. 29, p. 1-9, 1995.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; TEODORO, G. S.; MIYATA, L. Y. Cloreto de potássio e fosfato de sódio na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Tupy. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 37-41, 2008.