

# GERMINAÇÃO *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO DE SEMPRE-VIVA

## *In vitro* GERMINATION AND ACCLIMATIZATION OF EVERLASTING FLOWER

DÉBORA DE OLIVEIRA PRUDENTE<sup>1</sup>, FERNANDA CARLOTA NERY<sup>2\*</sup>, MICHELE VALQUÍRIA DOS REIS<sup>1</sup>,  
PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA<sup>1</sup>, MARCELA CARLOTA NERY<sup>4</sup>, THAÍS DE OLIVEIRA AMIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Lavras - MG - Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ) - São João del Rei - MG - Brasil - fernandacarlota@ufsjs.edu.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ) - São João del Rei - MG - Brasil

<sup>4</sup>Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) - Diamantina - MG - Brasil

### RESUMO

*Actinoccephalus bongardii* (A. St.-Hil.)Sano é uma espécie ornamental nativa do Brasil, conhecida popularmente como sempre-viva “chuveirinho” e possui elevado potencial para comercialização. Porém ainda não se tem estabelecido eficientes protocolos de propagação para esta espécie. Objetivou-se neste trabalho estabelecer um protocolo de germinação *in vitro* e aclimatização para *A. bongardii*. Quanto ao cultivo *in vitro* avaliou-se os meios de cultura MS e WPM. Três níveis de pH (4,8; 5,8 e 6,8) e cinco concentrações de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg L<sup>-1</sup>) em meio de cultura WPM. Porcentagem de sementes germinadas, número de folhas e comprimento das plântulas foram avaliados 30 dias após a inoculação. Plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro* foram aclimatizadas com substrato Plantmax® em casa de vegetação, sendo avaliada a porcentagem de sobrevivência das plântulas 30 dias após a aclimatização. As sementes inoculadas em meio de cultura WPM apresentaram maior porcentagem de germinação (74%) e plântulas com maior número de folhas e maior comprimento. O pH do meio de cultura em 5,8 favoreceu a germinação e a suplementação do meio com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> aumentou significativamente a porcentagem de germinação das sementes (94%). A aclimatização das plântulas foi de apenas 50%, devido à fragilidade dos tecidos.

**Termos para indexação:** Eriocaulaceae, planta ornamental, cultura de tecidos, ácido giberélico, sempre-viva chuveirinho.

### ABSTRACT

*Actinoccephalus bongardii* (A. St.-Hil.) Sano is a native ornamental specie from Brazil, popularly known as evergreen “showerhead” that presents potential for commercialization. No effective propagation protocol for the species has yet been established. The objective of this work was to establish an *in vitro* germination protocol and acclimatization of *A. bongardii*. For the *in vitro* culture, we evaluated MS and WPM culture media. Three pH levels (4.8, 5.8 and 6.8) and five concentrations of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0.0; 0.2; 0.4; 0.6 and 0.8 mg L<sup>-1</sup>) in WPM culture media were evaluated. Percentage of germinated seeds, number of leaves and length of the seedlings were evaluated 30 days after inoculation. Seedlings obtained through the *in vitro* germination were acclimatized with Plantmax® substrate in a greenhouse and the percentage of seedlings survival were evaluated 30 days after

acclimatization. The seeds inoculated in WPM showed highest germination percentage (74%) and seedlings with more leaves and longer length. The culture medium pH of 5.8 improved germination and the supplementation of the medium with 0.2 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> significantly increased the percentage of seed germination (94%). The acclimatization of the seedlings was only 50% due to the fragility of the tissues.

**Index terms:** Eriocaulaceae, ornamental plant, tissue culture, gibberellic acid.

### INTRODUÇÃO

O consumo de flores e plantas ornamentais em todo mundo vem aumentando ao longo dos anos. Nos tradicionais países consumidores e nas novas economias de países em desenvolvimento, a demanda tem crescido significativamente (LANDGRAF & PAIVA, 2009). A prospecção de plantas ornamentais nativas do Brasil, se tornou um grande desafio para o mercado interno brasileiro, que vem buscando metodologias para otimizar a produção e comercialização destas espécies em ascensão (HEIDEN et al., 2006).

As espécies ornamentais denominadas de “sempre-vivas” são espécies nativas dos campos rupestres e Cerrados pertencentes às famílias: Cyperaceae, Eriocaulaceae, Poaceae, Rapateaceae e Xyridaceae. Suas inflorescências permanecem pouco alteradas em sua forma e coloração após serem colhidas e secas, tendo uma grande empregabilidade, tanto na decoração de interiores, como para flores de corte (GIULIETTI et al., 1988; PARRA et al., 2010). Contudo, diversas espécies de sempre-vivas vêm sofrendo com exploração desordenada, sem levar em consideração aspectos

(Recebido em 2 de Julho de 2015 e aprovado em 27 de Novembro de 2015)

de manejo, o que as levou a serem incluídas na categoria das espécies ameaçadas de extinção (MENDONÇA & LINS 2000; ANDRADE et al., 2011; GIULIETTI et al., 2012).

A sempre-viva *Actinocephalus bongardii* (A. St. Hil.) Sano, é um exemplo de espécie ornamental nativa em risco de extinção (MENDONÇA & LINS 2000). Conhecida popularmente, como “chuveirinho”, pode ser facilmente reconhecida pela presença de inflorescências em forma de capítulos. Pertencente à família Eriocaulaceae pode ser encontrada nas montanhas da Cadeia do Espinhaço (Costa et al 2008; Giuliette & Hensold, 1990; Parra et al., 2010).

No Brasil, as pesquisas com plantas ornamentais tem buscado desenvolver protocolos de germinação *in vitro* para diversas espécies, possibilitando uma maior taxa de germinação, em um menor período de tempo, utilizando espaços físicos menores com obtenção de mudas mais uniformes e com qualidade fitossanitária superiores (CARVALHO et al., 2012). Entretanto, os relatos científicos sobre o cultivo *in vitro* de espécies ornamentais nativas, como a sempre-viva *A. bongardii* são incipientes. Diante disso, objetivou-se estabelecer um protocolo de germinação *in vitro* e aclimatização para a sempre-viva *A. bongardii*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Capítulos florais de *A. bongardii* foram coletados em Diamantina, MG no ano de 2012, secos a sombra e em temperatura ambiente por sete dias. Após esse período foram armazenados em frascos de vidro em câmara refrigerada ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ). Para extração das sementes, foi realizada a fricção dos capítulos com uma espátula sobre placas de Petri, sendo separadas com o auxílio de peneiras de 0,7 mm e visualizadas em microscópio estereoscópico.

### Germinação *in vitro*

#### Meios de cultura

Para a germinação *in vitro*, as sementes foram levadas à câmara de fluxo laminar e desinfestadas em

álcool 70% por 30 segundos, e em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOH) com 1% de cloro ativo por 10 minutos, lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em dois diferentes meios de cultura.

Os efeitos de dois meios de cultura na germinação avaliados: MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980). Aos meios foi acrescido 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e gelificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, pH corrigido para 5,8. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 36  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25  $^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Cada unidade experimental foi constituída de dez tubos de ensaio com uma semente com três repetições por tratamento, dispostas completamente ao acaso. A avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sendo avaliada a porcentagem de sementes germinadas (protrusão radicular a  $\pm 2,0$  mm), número de folhas e comprimento das plântulas em cada tratamento.

#### Diferentes níveis de pH

Foram avaliados também três níveis de pH (4,8; 5,8 e 6,8) do melhor meio de germinação determinado no experimento anterior. O meio utilizado foi WPM acrescido 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e gelificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 36  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25  $^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Cada unidade experimental foi constituída de dez tubos de ensaio com uma semente com três repetições por tratamento, dispostas completamente ao acaso. A avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sendo avaliada a porcentagem de sementes germinadas (protrusão radicular a  $\pm 2,0$  mm).

#### Diferentes concentrações de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)

Diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg L<sup>-1</sup>) foram avaliadas no meio de cultura WPM para a germinação de *A. bongardii*. Aos meios foram acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e gelificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, pH corrigido para 5,8. Após a inoculação, as sementes foram

mantidas em sala de crescimento sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Cada unidade experimental foi constituída de dez tubos de ensaio com uma semente com três repetições por tratamento, dispostas completamente ao acaso. A avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sendo avaliada a porcentagem de sementes germinadas (protrusão radicular  $a \pm 2,0 \text{ mm}$ ).

### Aclimatização

Plântulas de *A. bongardii* com 60 dias de cultivo *in vitro*, oriundas da germinação *in vitro* em meio de cultura WPM, pH 5,8, acrescido de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  foram transferidas diretamente para recipientes plásticos (50 mL) contendo Plantmax® e envoltas com saco plástico transparente para manutenção da umidade relativa no ambiente. Esses recipientes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura controlada de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e irradiância de fótons de  $67 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . O saco plástico foi cortado lateralmente a cada 7 dias até a remoção completa, visando à redução gradual da umidade relativa. Aos 20 dias, os recipientes com as plântulas foram levados para casa de vegetação, onde

permaneceram por mais 10 dias. Cada unidade experimental foi constituída de dez recipientes plásticos com uma plântula com três repetições por tratamento, dispostas completamente ao acaso. Aos 30 dias, foi realizada a avaliação da porcentagem de sobrevivência das plântulas.

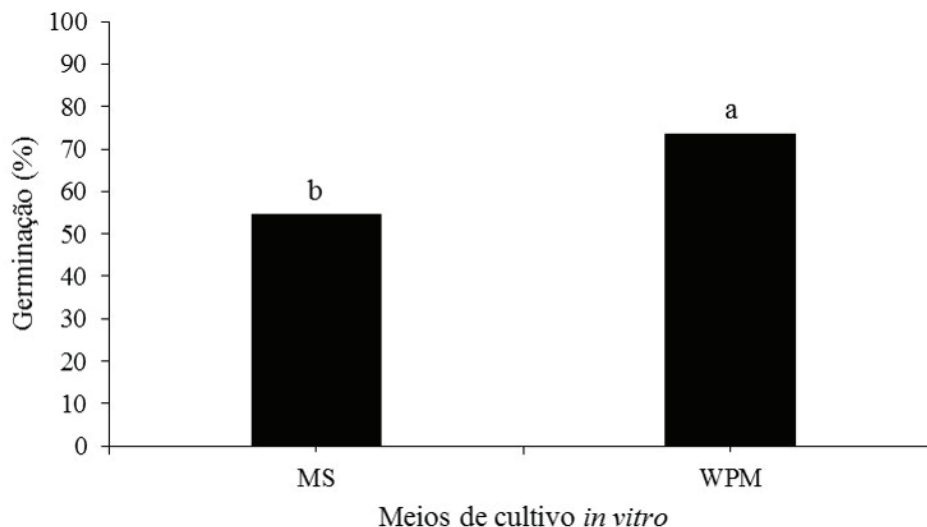
### Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente estatístico. A análise de variância foi realizada utilizando-se o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014), comparando as médias pelo teste Scott- Knott, probabilidade de 5%.

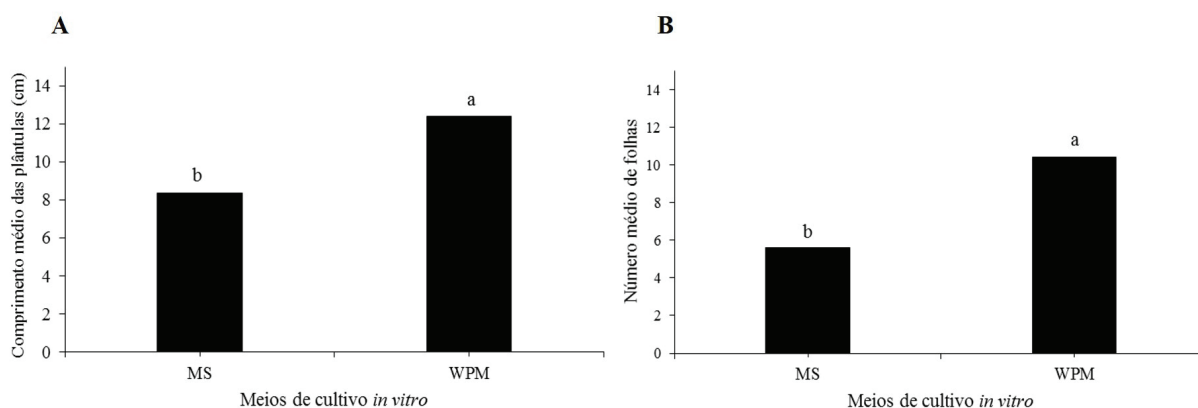
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Germinação *in vitro*

A maior eficiência na germinação *in vitro* das sementes de *A. bongardii*, foi observado com o uso do meio de cultura WPM (74%) (Figura 1). Sendo observada também uma diferença significativa para número de folhas (10 folhas) e comprimento das plântulas (12,4 cm) com o seu uso (Figura 2).



**FIGURA 1** – Porcentagem de germinação de sementes de *A. bongardii* em diferentes meios de cultura (MS e WPM) aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, à 5% de probabilidade.



**FIGURA 2** – Influência de diferentes meios de cultivo no comprimento médio das plântulas de *A. bongardii* (A) e número médio de folhas (B) aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott, à 5% de probabilidade.

O estabelecimento *in vitro* e o desenvolvimento de plantas é determinado por vários fatores, como: genótipo, concentração de macronutrientes e micronutrientes no meio de cultura, reguladores de crescimento, vitaminas e fontes de carbono (PIERIK, 1987; COSTA et al., 2007; DISARZ & CORDER, 2009). O meio de cultura WPM pode proporcionar melhores resultados para algumas espécies, como *A. bongardii*, pois apresentam 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, sendo amplamente utilizado para o cultivo *in vitro* de muitas espécies (PASQUAL, 2001; SOARES et al., 2009). Resultados semelhantes foram encontrados para outras espécies de sempre viva como: *Syngonanthus elegantulus* Ruhland (PÊGO et al., 2013, PÊGO et al., 2015) *Syngonanthus paepalophyllu* (PÊGO et al., 2015b), onde o melhor meio para o estabelecimento das plântulas foi o WPM.

Contudo, os resultados obtidos para *A. bongardii*, diferem dos encontrados por Silva et al. (2005) e Bellintani et al. (2007) no cultivo *in vitro* das espécies de sempre-viva *Syngonanthus mucugensis* Giul. e *Neoregelia mucugensis* Leme., respectivamente, onde concluíram que o meio ½ MS afeta positivamente parâmetros do crescimento das espécies.

Diferença significativa foi observada para os diferentes níveis de pH testados em meio de cultura WPM para a germinação de sementes de *A. bongardii*. Onde o nível de pH 5,8 obteve porcentagens de germinação superiores (84%) (Figura 3).

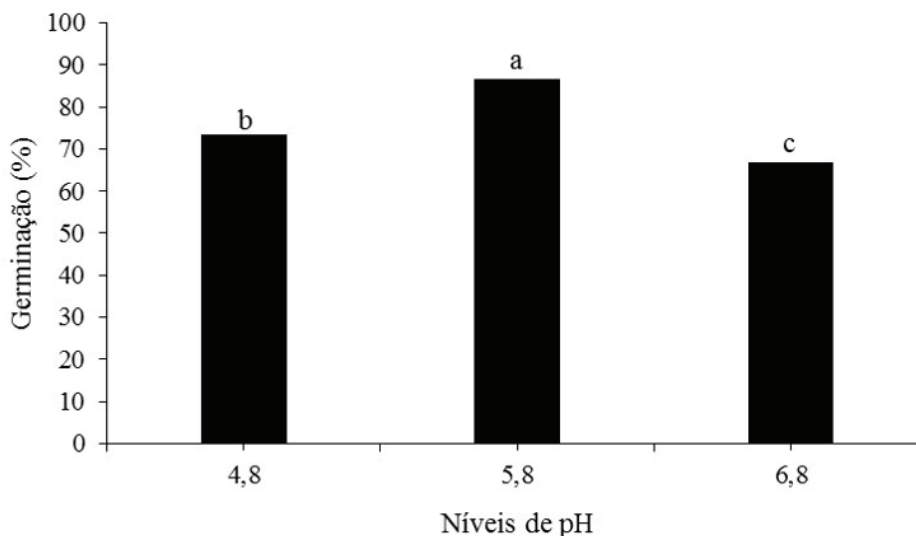
O pH é considerado um fator crítico do meio de cultura (MURASHIGE, 1974; SOARES et al., 2009), influenciando na absorção e disponibilidade de nutrientes, de reguladores de crescimento e no grau de gelificação do ágar (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Usualmente, é ajustado em uma faixa que varia de 5,0 a 6,5 (PIERIK, 1987), para o desenvolvimento adequado da maioria das espécies; em níveis inferiores a 4,5 e superiores a 7,0, geralmente ocorre paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (JANSEN & CRONIN, 1953; MURASHIGE, 1974).

Contudo, a maximização da porcentagem de geminação em *A. bongardii* foi obtida em meio de cultura WPM acrescido de baixa concentração de  $GA_3$  ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), representando 94% de germinação (Figura 4).

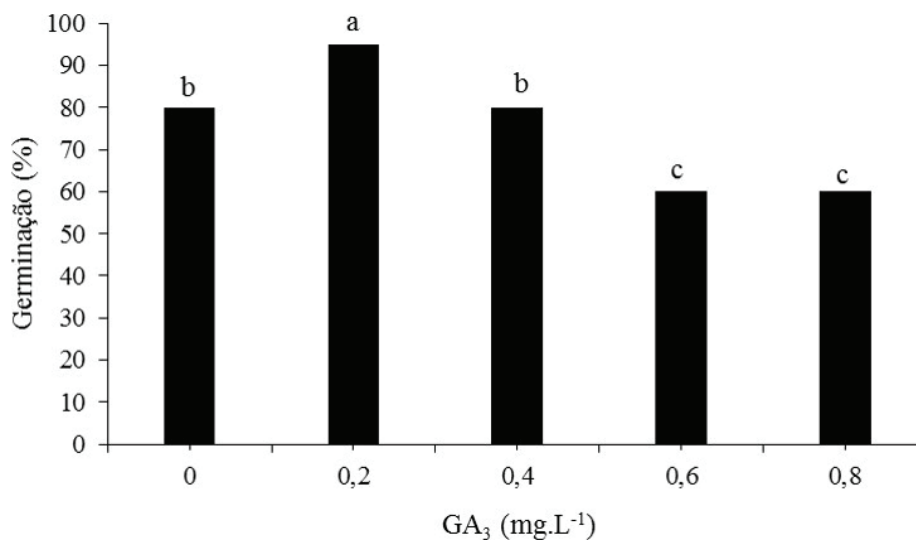
A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura, como o  $GA_3$ , contribui para acelerar o processo germinativo e elevar a porcentagem de

germinação em algumas espécies (SOARES et al., 2009). As giberelinas estão envolvidas síntese de enzima que digerem as reservas armazenadas no endosperma, formando açúcares simples, aminoácidos e ácidos nucléicos, que são absorvidos e transportados para

as regiões de crescimento do embrião, estimulando o alongamento celular, fazendo com que a raiz rompa o tegumento da semente, acelerando a germinação com maior uniformidade (STENZEL et al., 2003; SANTOS et al., 2013).



**FIGURA 3** – Porcentagem de germinação de sementes de *A. bongardii* em meio de cultivo WPM, em função de diferentes níveis de pH aos 30 dias de cultivo *in vitro*.



**FIGURA 4** – Porcentagem de germinação de sementes de *A. bongardii* em meio de cultivo WPM acrescido de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg L<sup>-1</sup>) aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

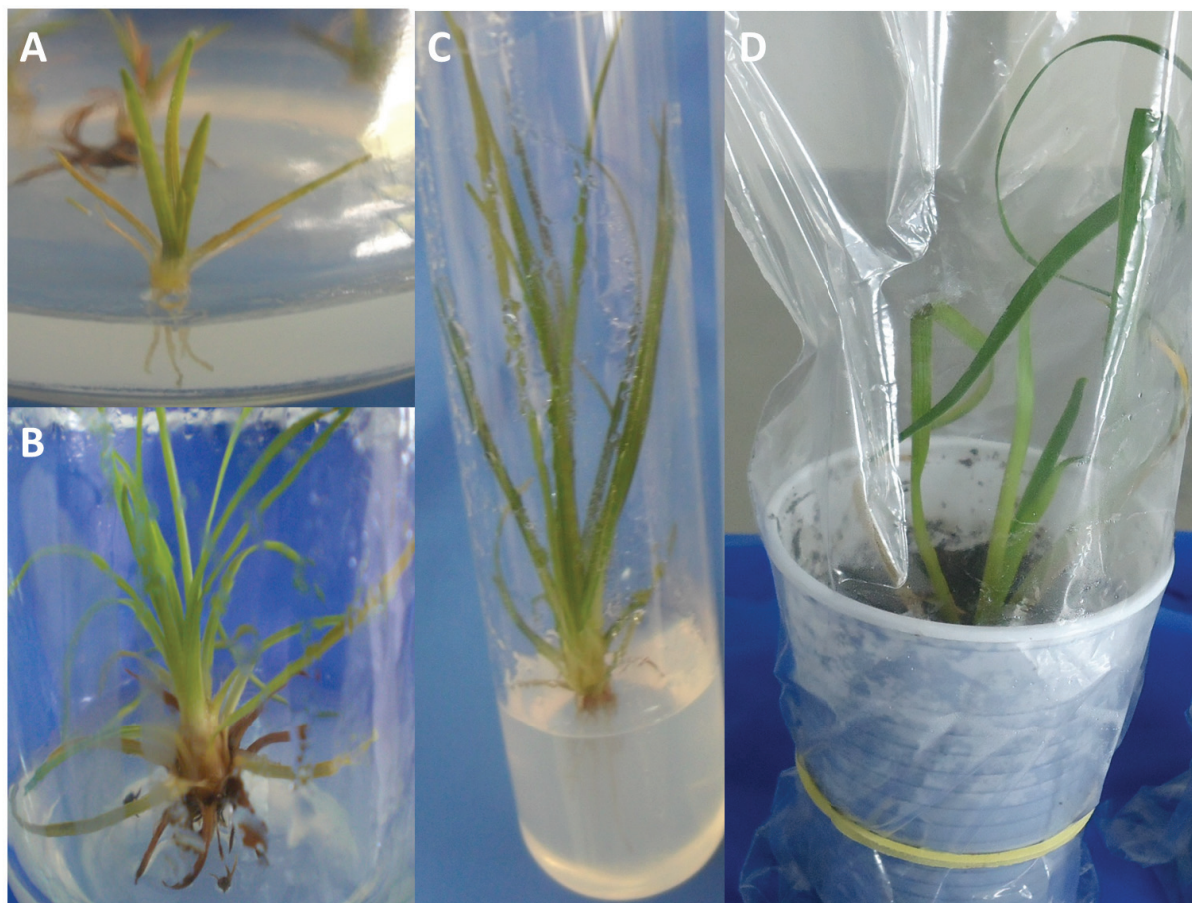


Resultados semelhantes foram encontrados para *Hancornia speciosa* Gomes, em meio de cultura WPM suplementado com  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , constatando maior porcentagem de sementes germinadas *in vitro* (SOARES et al., 2007). Em contrapartida, não houve diferenças significativas entre as porcentagens de sementes de ingazeiro (*Inga vera* Will subsp. affinis (DC). T.D. Penn.) germinadas em diferentes concentrações de  $\text{GA}_3$ , apesar das diferenças entre os tratamentos não terem sido significativas, os maiores percentuais de germinação foram na concentração de  $20 \mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$ , com 100% de germinação (STEIN et al., 2007).

### Aclimatização de plântulas

As plântulas de *A. bongardii* submetidas a aclimatização apresentaram, aos 30 dias em casa de vegetação, 50% de sobrevivência (Figura 5). Essa baixa taxa de sobrevivência mostra a fragilidade dos tecidos de *A. bongardii* o que, possivelmente, dificultou seu estabelecimento *ex vitro*.

Na aclimatização, as plantas sofrem muitos estresses durante a transferência das condições *in vitro* para as condições *ex vitro*. O tipo de substrato, dependendo de suas características físico-químicas, entre elas sua capacidade de retenção de água, influencia na sobrevivência, crescimento e desenvolvimento das plântulas (MOREIRA et al., 2006).



**FIGURA 5** – Aspecto geral de plântulas de *A. bongardii* cultivadas em meio WPM, pH 5,8 acrescido de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  aos 15 dias de cultivo *in vitro* (A), 30 dias de cultivo *in vitro* (B) 60 dias de cultivo *in vitro* (C) e durante o processo de aclimatização, aos 30 dias de cultivo *ex vitro* (D).

O Plantmax® é um substrato comercial que mistura diferentes materiais: casca de pinus, turfa, vermiculita expandida e carvão moído, oferecendo granulometria específica formada pela diferença de tamanho de partículas dos materiais envolvidos (SCHUCK et al., 2012). Porém, para a espécie *A. bongardii* ainda faltam ajustes na metodologia de aclimatização, a fim de garantir, uma maior porcentagem de sobrevivência das plântulas.

Resultados semelhantes foram encontrados com as sempre-vivas *Syngonanthus elegantulus* (PEGÔ et al., 2013) e *Syngonanthus elegans* (PÊGO et al., 2014), baixas porcentagens de plântulas aclimatizadas 43% e 25,6% respectivamente foram observadas. Sugerindo que são necessários avaliar outros tipos de substratos e a pré-aclimatização.

### CONCLUSÕES

Um melhor estabelecimento *in vitro* de *A. bongardii* é possível em meio de cultivo WPM, nível de pH 5,8, suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. A aclimatização de plantas foi de apenas 50%, devido à fragilidade dos tecidos.

### REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. J. G. et al. Blastocaulon (Eriocaulaceae), a synonym of Paepalanthus: morphological and molecular evidence. **Taxon**, 60:178-184, 2011.
- BELLINTANI, M. C. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia-Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, 5(2):1101-1103, 2008.
- CARVALHO, D.; BIASI, L.; TELLES, C. Organogênese do caquizeiro 'Fuyu' a partir de ápices meristemáticos. **Current Agricultural Science and Technology**, 10(3):303-307, 2012.
- COSTA, A. S. et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, 25(1):68-72, 2007.
- COSTA, F.N., TROVO, M; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, 4(1-2):117-125, 2008.
- DISARZ, R.; CORDER, M. P. M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* de Wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, 33(4):599-606 2009.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um guia dos seus procedimentos de comparações múltiplas Bootstrap. **Ciência e Agrotecnologia**, 38(2):109-112, 2014.
- GIULIETTI, A. M. et al. The synonymization of *Philodice* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, 60:50-56, 2012.
- GIULIETTI, N. et al. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, 1(2):179-193, 1988.
- GIULIETTI, A. M., HENSOLD, N., Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Botânica Brasileira**, 4(1):133-158, 1990.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v.1, p.183-260.
- HEIDEN, G.; BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, 12(1):2-7, 2006.
- LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. O. Produção de flores cortadas no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, 33(1):120-126, 2009.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, 30:421-427, 1980.
- MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas/Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, 2000. 157p.
- MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, 30(5):875-879, 2006.
- MURASHIGE, R.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15(3):473-497, 1962.

- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, 25:135-166, 1974.
- PARRA, L. R. et al. Reestablishment and new circumscription of *Comanthera* (Eriocaulaceae). **Taxon**, 59(4):1135-1146, 2010.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**, Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.
- PÊGO, R.G. PAIVA, P. D. O, PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**, 37:32-39, 2013.
- PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O; PAIVA, R. Micropropagation protocol of *Syngonanthus elegans* (Bong) Ruhland: an ornamental species. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 36(2):347-353, 2014.
- PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. *In vitro* seed germination and seedlings development of *Syngonanthus elegans* and *Syngonanthus elegantulus*. **Acta Horticulturae**, 1083:249-254, 2015.
- PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. *In vitro* establishment of *Syngonanthus paepalophyllus* in different culture media. **Acta Horticulturae**, 1083:255-260, 2015.
- PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: M. Nyhoff, 1987. 344p.
- SANTOS, C. A. C. et al. Seed germination and seedling vigor of passion fruit submitted to the action of gibberellic acid. **Bioscience Journal**, 29(2):400-407, 2013.
- SCHUCK, M. R. et al. Aclimatização de plantas micropropagadas de videira cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) em diferentes substratos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 3(4):206-212, 2012.
- SILVA, J. R. S. et al. Efeito da sacarose sobre o enraizamento e desenvolvimento *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, 5(2):56-59, 2005.
- SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, 31(4):1048-1053, 2007.
- STEIN, V. C. et al. Germination *in vitro* and *ex vitro* of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, 31(6):1702-1708, 2007.
- STENZEL, N. M. C.; MURATA, I. M.; NEVES, C. S. V. J. Superação de dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25(2):305-308, 2003.