

VERÔNICA ARAÚJO SANTOS

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO*, ACLIMATIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO
IN VITRO DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Professor Dr. José Magno Queiroz Luz

**UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010**

VERÔNICA ARAÚJO SANTOS

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO*, ACLIMATIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO
IN VITRO DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2010.

Prof.^a Dra. Denise Garcia de Santana UFU

Prof.^a Dra. Renata da Silva Brant UFU

Prof.^a Dra. Maria de Fátima Arrigoni Blank UFS

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
ICIAG-UFU
(Orientador)

**UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010**

A toda minha família,

OFEREÇO.

À minha irmã Juliana, que sem sua
colaboração nada disso seria possível...

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder mais essa vitória.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Instituto de Ciências Agrárias, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

Ao meu orientador, professor José Magno Queiroz Luz, por todo apoio e atenção durante estes anos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores da Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia.

À professora Denise Garcia de Santana pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos membros da banca examinadora, por se disponibilizarem a ajudar e por todas as sugestões.

A todos os colegas da pós-graduação em Agronomia, pelos momentos de descontração.

Aos colegas e estagiários do Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da UFU, Tâmara, Luisa, Francieli, Monalisa, e em especial, Tatiana e Leandro pelo companheirismo e por toda colaboração com meus experimentos.

Aos meus pais, Ivan e Ezelúzia, às minhas irmãs, Juliana e Alyne e à minha avó Irandy pelo apoio, incentivo e carinho.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a conclusão desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Descrição da espécie.....	3
2.2. Cultura de tecidos de plantas.....	4
2.3. Contaminação <i>in vitro</i>	4
2.4. Aclimatização de mudas propagadas <i>in vitro</i>	7
2.5. Conservação de germoplasma <i>in vitro</i>	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Tratamento das matrizes e pré-asepsia do material.....	10
3.2. Concentrações de hipoclorito de sódio no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Lippia alba</i>	10
3.3. Cefotaxima sódica no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Lippia alba</i>	10
3.4. Cultura de ápices caulinares.....	11
3.5. Aclimatização de mudas de <i>Lippia alba</i>	11
3.6. Estabelecimento do banco de germoplasma <i>in vitro</i> de <i>Lippia alba</i>	12
3.7 Análise Estatística.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4.1. Concentrações de hipoclorito de sódio no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Lippia alba</i>	14
4.2. Cefotaxima sódica no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Lippia alba</i>	16
4.3. Cultura de ápices caulinares.....	17
4.4. Aclimatização de mudas de <i>Lippia alba</i>	19
4.5. Estabelecimento do banco de germoplasma <i>in vitro</i> de <i>Lippia alba</i>	21
5 CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

RESUMO

SANTOS, VERÔNICA ARAÚJO. **Estabelecimento *in vitro*, aclimatização e conservação *in vitro* de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).** 2010. 37 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia¹.

O presente trabalho teve por objetivo promover o estabelecimento *in vitro*, a aclimatização e a conservação *in vitro* de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Para isso, foi testada a influência de diferentes concentrações e diferentes tempos de imersão de hipoclorito de sódio na assepsia dos explantes. Segmentos nodais foram imersos em hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 %) e por diferentes tempos (8, 12 e 16 min.), após 30 dias avaliou-se a contaminação bacteriana (%), número de brotos, número de folhas e sobrevivência (%). A concentração de 1% de hipoclorito de sódio foi mais eficiente no controle da contaminação. Também foi testada a influência do antibiótico cefotaxima sódica incorporada ao meio MS para evitar a contaminação. Segmentos nodais foram inoculados em meio MS contendo diferentes doses de cefotaxima sódica (0, 50, 100, 150 e 200 mg/L⁻¹), aos 30 dias avaliou-se a contaminação bacteriana (%), a oxidação (%) e a sobrevivência (%). A dose de 200 mg L⁻¹ de cefotaxima evitou totalmente a contaminação. Ápices caulinares de *Lippia alba* foram estabelecidos *in vitro* em meio MS complementado com diferentes doses de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 mg L⁻¹). Após 140 dias, avaliou-se a contaminação (%), a sobrevivência (%), a oxidação (%) e o número de brotos. Os melhores resultados foram obtidos quando foi utilizada a dose 1,5 mg L⁻¹. Para a aclimatização, foram testados quatro tipos de substratos: Pó de coco + calcário (1g. L⁻¹), Plantmax® + calcário (1g.L⁻¹), Vermiculita + calcário (1g.L⁻¹) e Pó de coco + Plantmax® + Vermiculita (1:1:1) + calcário (1g.L⁻¹). Avaliou-se a sobrevivência (%), o comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm), a massa fresca da parte aérea e da raiz (g) e a massa seca da parte aérea e da raiz (g). Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou o substrato comercial Plantmax®. Para estabelecer o banco de germoplasma da espécie, segmentos nodais foram isolados de plântulas desenvolvidas *in vitro* e inoculados em diferentes meios de cultura: T1 (MS + 2% sacarose + 4% de sorbitol); T2 (MS + 2% sacarose + 4% de sorbitol + 2 mgL⁻¹ pantotenato de cálcio); T3 (MS + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mgL⁻¹ pantotenato de cálcio); T4 (MS/2 + 2% sacarose + 4% de sorbitol); T5 (MS/2 + 2% sacarose + 4% de sorbitol + 2 mgL⁻¹ pantotenato de cálcio) e T6 (MS/2 + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mgL⁻¹ pantotenato de cálcio); e 4 repetições, sendo cada repetição constituída por cinco tubos de ensaio com um explante cada. Avaliou-se a sobrevivência (%), explantes com brotação (%), número de brotos, número de raiz e a altura dos brotos, as avaliações foram realizadas aos 45, 60, 75 e 90 dias após inoculação. O meio T6 (MS/2 + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mgL⁻¹ pantotenato de cálcio) é o mais indicado para conservação de *Lippia alba in vitro*.

Palavras-chave: *Lippia alba*. Hipoclorito de sódio. Cefotaxima sódica. Ápices caulinares.

¹ Orientador: Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz - UFU

ABSTRACT

SANTOS, VERÔNICA ARAÚJO. ***In vitro* establishment, acclimatization and conservation of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).** 2010. 37 f. Dissertation (Masters Program Agronomy/Crop Science) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia.¹

This study analyzed *in vitro* establishment, acclimatization and conservation of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. For this purpose, the effect of different concentrations and dipping times of sodium hypochloride in sterile explants was tested. Nodal segments were immersed in sodium hypochloride at different concentrations (0.4, 0.6, 0.8 and 1.0%) and different times (8, 12 and 16 min). After 30 days of incubation bacterial contamination (%), number of shoots, number of leaves and survival (%) were evaluated. The concentration of 1% sodium hypochloride was more effective in controlling contamination. Also the effect of the antibiotic cefotaxime sodium incorporated into the MS medium, to avoid contamination, was tested. Nodal segments were inoculated on MS medium containing different doses of cefotaxime sodium (0, 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹) and 30 days later were evaluated for bacterial contamination (%), oxidation (%) and survival (%). The dose of 200 mg L⁻¹ cefotaxime completely avoided contamination. Shoot tips of *Lippia alba* were established *in vitro* on MS medium supplemented with different concentrations of BAP (0, 0.5, 1.0, 1.5 mg L⁻¹). Contamination (%), survival (%), oxidation (%) and the number of shoots were evaluated after 140 days growth. The best result was obtained with 1.5 mg L⁻¹ of BAP. For acclimatization, four types of substrates were tested: Powder coconut + lime (1g L⁻¹), Plantmax ® + lime (1g L⁻¹), vermiculite + lime (1g L⁻¹) and coconut powder + Plantmax ® +vermiculite (1:1:1) + lime (1g L⁻¹). Survival (%), shoot length (cm), root length (cm), fresh weight of shoot and root (g) and dry weight of shoot and root (g) were evaluated. The best result was obtained when using the substrate Plantmax ®. In order to establish a germplasm bank of the species, nodal segments were isolated from *in vitro* grown seedlings and inoculated in different culture media: T1 (MS + 2% sucrose + 4% sorbitol), T2 (MS + 2% sucrose + 4% sorbitol + 2 mg L⁻¹ calcium pantothenate), T3 (MS + 2% sucrose + 3% mannitol + 2 mg L⁻¹ calcium pantothenate), T4 (MS / 2 + 2% sucrose + 4% sorbitol); T5 (MS / 2 + 2% sucrose + 4% sorbitol + 2 mg L⁻¹ calcium pantothenate) and T6 (MS / 2 + 2% sucrose + 3% mannitol + 2 mg L⁻¹ calcium pantothenate) with 4 replicates, each one consisting of five test tubes with one plant each. Survival (%), explants with shoots (%), number of shoots, root number and height of shoots, were evaluated at 45, 60, 75 and 90 days after inoculation. The medium T6 (MS / 2 + 2% sucrose + 3% mannitol + 2 mgL⁻¹ calcium pantothenate) was the most suitable for *in vitro* conservation of *Lippia alba*.

Keywords: *Lippia alba*. Sodium hypochloride. Cefotaxime sodium. Shoot tips.

¹ Supervisor: Dr. José Magno Queiroz Luz - UFU

1 INTRODUÇÃO

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) é uma planta medicinal nativa da América do Sul, amplamente distribuída em todo o território brasileiro, popularmente conhecida como erva cidreira. Preparados a base de *L. alba* são utilizados na medicina popular para o tratamento de diversos males, como cólicas, indigestão, dores, náuseas e espasmos.

A exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa através da extração direta nos ecossistemas tropicais (extrativismo) tem provocado reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, seja pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação das mesmas. A preocupante taxa de extinção destas espécies vegetais leva à necessidade de se considerar urgente o estabelecimento de políticas e ações de conservação.

A técnica de cultura de tecidos tem sido utilizada para evitar que várias espécies se extingam definitivamente. A micropropagação é uma das técnicas da cultura de tecidos que visa propagar rapidamente plantas isentas de vírus, independente da época do ano, além de requerer pequeno espaço físico (TORRES et al., 1998).

Dentre as etapas da micropropagação, a aclimatização é uma das mais importantes e pode chegar a ser um fator limitante. É um processo de adaptações induzidas às plântulas cultivadas *in vitro* quando levadas ao ambiente *ex vitro*. Esse processo consiste de modificações morfoanatômico - fisiológicas necessárias às plantas para que possam sobreviver em um novo ambiente (CARVALHO et al., 1999).

É fundamental a determinação dos substratos adequados para a aclimatização, os quais devem garantir a manutenção mecânica do sistema radicular, a estabilidade da planta, o suprimento de água e nutrientes e as trocas gasosas entre as raízes e o ar atmosférico (SILVEIRA et al., 2002).

Em certos casos, a melhor opção para evitar a extinção de uma espécie vegetal é a conservação do germoplasma *in vitro*.

A conservação de germoplasma, além de preservar a espécie, permite o acesso ao material genético para caracterização, domesticação, desenvolvimento de novas variedades e prospecção de genes, revertendo em benefícios para toda sociedade. A estratégia de conservar plantas medicinais sob condições *in vitro* é uma alternativa viável, no sentido de proteger a biodiversidade brasileira, e também uma forma de disponibilizar germoplasma dessas espécies que são matéria prima importante para o

desenvolvimento da indústria brasileira de fitoterápicos. O banco de germoplasma *in vitro* de plantas medicinais representa uma ação concreta no sentido de cumprir o capítulo 15 da Agenda 21, definido na Convenção sobre Diversidade Biológica (Rio 92), que determina a necessidade de estabelecer estratégias para a conservação da biodiversidade.

A conservação desses materiais genéticos se justifica também devido ao nível de degradação dos biomas em que estão inseridos. A perda dessa diversidade genética representará, para o Brasil, um prejuízo inestimável. A maioria das moléculas ativas presentes nas plantas medicinais são sintetizadas em diminutas concentrações e em geral de difícil síntese em laboratório.

O presente trabalho teve por finalidade estabelecer *L. alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) *in vitro*, enfocando a conservação do germoplasma, colaborando desse modo para a conservação da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem Botânica e usos de *L. alba*

L. alba (Mill.) N.E. Brown é uma planta de origem brasileira, pertencente à família Verbenaceae, mas também é encontrada em toda a América do Sul. A planta vegeta em solos arenosos e nas margens dos rios, açudes, lagos e lagoas, em regiões de clima tropical, sub-tropical e temperado. É conhecida pelos nomes populares: alecrim, alecrim do mato, alecrim do campo, camará, capitão do mato, cidrão, cidreira, cidreira brava, capim cidreira, cidreira crespa, cidreira falsa, cidreira melissa, erva cidreira, erva cidreira do campo, erva-cidreira-brasileira, falsa melissa, salva do Brasil, salva limão, e outras denominações (MING, 1992).

Arbusto perene, muito ramificado dicotomicamente, pode atingir até dois metros de altura; apresenta folhas oblongo-agudas, opostas, olentes. Suas flores são róseo-violáceas, são pentâmeras diclamídeas, em geral zigomorfas, andróginas; reunidas em capítulo axial (MARTINS et al., 2000). O androceu é formado por cinco estames, em alguns casos quatro, didínamos, sempre alternos com os lobos da corola, o ovário é súpero, bicarpelar, bilocular (às vezes falsamente tetralocular com estilete ginobásico), com um ou dois óvulos por loja. Os ramos novos são pubescentes e os velhos, glabros. Seu fruto é drupáceo ou seco ou esquizocarpo, ou ainda seco e alado pelo cálice; é uma planta indicada como antiespasmódico, estomáquico, carminativo, calmante, digestivo, combate ainda insônia e a asma (MARTINS et al., 2000). Amplamente utilizada para dores abdominais como digestivas, é consumida principalmente nas formas de chás produzidos a partir das folhas.

Também podem ser usadas na forma de compressas para combater hemorróidas; macerada para o uso local, contra dor de dente; e forma de banhos, como febrífuga. A infusão alcoólica friccionada é recomendada para combater resfriados e a raiz é utilizada no nordeste como aperiente e no combate às afecções hepáticas. Testes farmacológicos realizados com as folhas comprovaram atividade analgésica, espasmolítica, antibacteriana e peitoral, sem que nenhum efeito tóxico tenha sido verificado em animais com extratos da planta (CORRÊA, 1992; CARRICONDE, 1996).

2.2 Cultura de tecidos de plantas

A cultura de tecidos de planta compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (PASQUAL, 1997). A técnica está baseada na totipotencialidade da célula vegetal, ou seja, na sua capacidade de, por si só, originar uma nova planta, devido às mesmas encerrarem em seu núcleo, toda a informação genética para isto (PINTO, 2001). Vale salientar que, para cada tipo de célula, há a necessidade de se empregar um meio de cultura específico, que contenha, adequadamente, os nutrientes e agentes indutores necessários ao desenvolvimento das células. Estas, por sua vez, são influenciadas pela luz (intensidade e qualidade), temperatura, estágio fisiológico e época para colheita do material a ser propagado (BERTOLOTTI; GONÇALVES, 1979).

Entre as principais funções da técnica de cultura de tecidos de planta cabe dar ênfase à produção de clones, ou seja, material homogêneo e uniforme, livre de patógenos; híbridos, por hibridação somática, através da fusão de protoplastos; haplóides; mutantes portadores de caracteres desejáveis, por meio de agentes mutagênicos ou por variação somaclonal; plantas biorreadoras; plantas geradoras de vacinas; bem como conservação de germoplasma por criopreservação ou por manutenção do material vegetal, durante períodos prolongados, sob condições limitantes de crescimento e desenvolvimento e, finalmente, biotransformação de compostos pouco interessantes em compostos muito interessantes sob o aspecto econômico (AMARAL; SILVA, 2003).

Esta técnica também pode ser empregada para a multiplicação de espécies de difícil propagação, como por exemplo, algumas espécies nativas do Cerrado.

2.3 Contaminação *in vitro*

Na micropropagação, todas as etapas são importantes, porém a desinfestação requer muita atenção, uma vez que esta deve permitir a eliminação dos microorganismos com o menor dano possível para os explantes. Na desinfestação, deve-se levar em conta o tipo de explante e a espécie vegetal para o uso das soluções desinfestantes (ROCA; MROGINSKY, 1991).

Para minimizar os problemas relacionados à contaminação, tanto endógena, quanto exógena, é recomendável cultivar a planta em condições parcialmente controladas como telados com cobertura plástica ou casa de vegetação. O cultivo da

planta nestes ambientes permite um melhor controle da irrigação, adubação, controle de pragas e doenças. O controle da quantidade e forma de aplicação da água de irrigação permitem que se evite o molhamento de folhas, ramos e flores. A ausência de água na forma líquida, nestes órgãos, é fundamental para se evitar a proliferação de bactérias e fungos superficiais, com isto, facilitando o processo de desinfestação superficial (TEIXEIRA, 2001).

Os microorganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, além de provocar danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar, no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000). Na desinfestação do explante, a maior dificuldade é obtê-lo descontaminado sem provocar a sua morte. Para isso, várias substâncias com ação germicida têm sido utilizadas, sendo as mais comuns o etanol (70%) e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio (NaOCl) e o de cálcio (CaOCl_2) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos princípios ativos desinfestantes e os tempos de exposição, podem variar muito (MONTARROYOS, 2000), sendo necessário à adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (ROCA; MROGINSKY, 1991).

Órgãos e tecidos com contaminação endógena são de difícil desinfestação. Quando se detecta a presença de bactérias ou fungos endógenos, deve-se dar preferência para outras fontes de explantes, como por exemplo, os ápices caulinares. Caso esta alternativa não seja possível, deve-se procurar eliminar esta contaminação, com cultivos em meios enriquecidos com antibióticos e fungicidas, após o material ter passado pelo tratamento de desinfestação superficial com álcool, hipoclorito ou cloreto de mercúrio.

Durante a excisão e esterilização, devem-se tomar os devidos cuidados para que os danos físicos e químicos ao explante sejam minimizados. Em alguns casos, o uso de cloreto de mercúrio resulta num menor dano e oxidação do tecido (ZIV; HALEVY, 1983). Porém, o cloreto de mercúrio é um produto altamente tóxico e de difícil aquisição. Para o estabelecimento *in vitro* de *L. alba*, cultivar Kavach, Gupta e colaboradores (2001) fizeram uso deste agente com concentração 0,1% durante cinco minutos na desinfestação dos explantes.

No estabelecimento *in vitro* de explantes *Cissus sicyoides* (insulina vegetal), os segmentos nodais não apresentaram problemas de oxidação e contaminação, quando foi realizada a assepsia de 30 minutos em água corrente, 30 segundos em álcool 70% e 20

minutos em 0,75% de hipoclorito de sódio e seis vezes em água estéril (Abreu et al., 2003).

O hipoclorito de sódio foi mais eficiente na desinfestação de explantes de macieira (*Malus domestica* Borkh), possibilitando uma maior porcentagem de sobrevivência, em relação ao de cálcio (ERIG; SCHUCH, 2003). Para espécies como *L. integrifolia* (PASSERA; AMBROSETTI, 1999), *L. micromera* schau in Dc. var. *helleri* (Britt) (CAPOTE et al., 1999), *Eucalyptus globules* Labill (BENNETT et al., 1994), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) (ANDRADE et al., 2000), caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dene. et Planch) (MANTOVANI et al., 1999) e abacate “ouro verde” (BIASI et al., 1994), a desinfestação dos explantes foi efetiva utilizando NaOCl e álcool etílico (70%).

A contaminação por microorganismos é conhecida como um dos problemas mais sérios na micropropagação. Na maioria das vezes, essa contaminação é proveniente de bactérias, sendo consideradas os contaminantes mais comuns em cultura de tecidos e os que ocasionam os maiores danos, depois dos vírus, porque podem ser sistêmicas, sendo que sua detecção, muitas vezes, é mais difícil (MONTARROYOS, 2000). Para o controle das contaminações bacterianas, normalmente são utilizadas substâncias antibióticas que são incorporadas ao meio de cultura ou usadas diretamente sobre os explantes contaminados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MONTARROYOS, 2000).

Trabalhos nos quais foi avaliado o nível de toxidez de vários antibióticos demonstraram que os do grupo dos betalactamos: ampicilina, cefotaxima, carbenicilina e, particularmente, as cefalosporinas possuem amplo espectro de ação e sua toxidez é mínima nas concentrações que controlam bactérias (MONTARROYOS, 2000). Mesmo que se utilizem antibióticos de amplo espectro, o controle bacteriano na cultura de tecidos é problemático. Na maioria dos trabalhos *in vitro*, a frequência de descontaminação não é total, pois, os tecidos vegetais podem interferir no controle, por meio da destoxificação destas substâncias ou servindo como habitat para os contaminantes que se translocam por seus tecidos. É comum que as concentrações de antibióticos sejam elevadas, quando estes são adicionados ao meio nutritivo juntamente com o explante, no entanto, a fitotoxicidade dessas substâncias é fator limitante dessas concentrações (PEREIRA; FORTES, 2003).

Uma das alternativas para se evitar o efeito tóxico dos antibióticos sobre os explantes é reduzir ao máximo o tempo do tratamento (contato) dos explantes com o

agente antimicrobiano. No entanto, esta técnica, muitas vezes, causa efeitos apenas bacteriostáticos, constituindo uma ação paliativa frente ao principal objetivo que é a eliminação por completo do organismo contaminante (PEREIRA et al., 2003). Num estudo com bactérias endofíticas contaminantes na cultura da batata *in vitro*, doze antibióticos foram testados, e seis apresentaram algum tipo de controle. Destes, os que proporcionaram os melhores resultados para a inibição do crescimento bacteriano foram a ampicilina, o cloranfenicol, a estreptomicina e a tetraciclina, em concentrações que variaram de 32 a 256 mg L⁻¹ (PEREIRA et al. 2003).

2.4 Aclimatização de mudas propagadas *in vitro*

A aclimatização é o processo pelo qual as plantas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente com as condições climáticas naturais progressivamente, de forma a diminuir a possibilidade de estresse, levando a injúrias profundas ou até mesmo à morte (BRAINERD; FUCHIMGAMI, 1981). Por isso, essa etapa pode ser fator limitante no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Ao sofrer mudança abrupta de ambiente, ou seja, passando de condições *in vitro* para *ex vitro*, normalmente as plantas apresentam uma parada ou redução do crescimento até que se adaptem às novas condições, podendo levar de dias a semanas até que retornem ao crescimento (PEREIRA; FORTES, 2000; PEREIRA et. al., 2001).

Fatores como o substrato, genótipo, estresse hídrico, tipo e a qualidade do sistema radicular obtidos são importantes para se obter sucesso na sobrevivência das plantas. Raízes curtas são mais desejáveis, pois facilitam o manuseio no momento do plantio e estão numa fase de crescimento ativo, o que também facilita o pegamento da planta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O substrato de transplantio deve ter boa capacidade de retenção de umidade e não compactar excessivamente, comprometendo a drenagem e a aeração radicular. Quimicamente, ele deve ser de preferência inerte, para permitir a manipulação dos conteúdos de nutrientes de acordo com a necessidade da espécie (SOUZA JÚNIOR et al., 2001). Existem vários tipos de materiais que podem ser utilizados para a formulação de substratos para o cultivo de plantas. Dentre eles, pode-se destacar a casca de arroz, a casca de arroz carbonizada, o pó de coco, a vermiculita, a areia lavada de rio e o substrato comercial (ANJOS et al., 2008).

2.5 Conservação de Germoplasma *in vitro*

O desenvolvimento de melhores métodos de conservação *in vitro*, para apoiar trabalhos com germoplasma que apresenta problemas na manutenção, tem sido prioritário na área de recursos genéticos. Embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, os sucessos obtidos tem sido animadores, e deve ser possível desenvolver uma metodologia adequada de crescimento lento, para uma nova espécie, com pouco esforço.

A manutenção de bancos de germoplasma em condições de campo tem como desvantagem a sua vulnerabilidade. As plantas são expostas ao ataque de patógenos, a intempéries climáticas e ao vandalismo, podendo ser perdidas por falha de identificação ou erros humanos. Assim, há uma necessidade de se encontrar maneiras de minimizar esse risco e manter a identidade genética dos genótipos originais.

Coleções *in vitro*, em geral, são conservadas em bancos de germoplasma, sob condições especiais, protegidas de eventuais perdas, garantindo a sua utilização a curto, médio e longo prazo. Materiais introduzidos nesses bancos têm sido coletados nos centros de origem das culturas ou nas regiões onde se desenvolvem raças locais (TOWILL, 2000). O crescimento *in vitro*, durante o período de conservação, pode ser limitado por vários fatores físicos e químicos, tais como a redução da temperatura e/ou intensidade luminosa, a diluição dos elementos nutritivos no meio de cultura e pelo uso de agentes químicos e osmóticos, capazes de inibir o crescimento do material em cultivo (VILLALOBOS; ENGELMAN, 1995).

Na conservação *in vitro* a curto e médio prazo, o material armazenado é subcultivado em intervalos regulares de no mínimo seis meses. Frequentemente, os períodos entre as subculturas devem ser os mais longos possíveis, para diminuir a manipulação das plântulas e reduzir o risco de contaminação. O objetivo do armazenamento do germoplasma, a curto e médio prazos, é definir condições experimentais favoráveis a um crescimento mínimo, sem alteração da estabilidade genética. (ENGELMANN, 1991; ROCA, 1995; VILLALOBOS; ENGELMAN, 1995).

Plantas mantidas em banco de germoplasma têm baixa taxa de divisão celular, o que tende a diminuir a frequência de mutações que ocorrem durante a duplicação do DNA na fase mitótica do ciclo celular (HENSHAW, 1982).

As técnicas *in vitro* podem contribuir em todas as etapas do processo de conservação de germoplasma, incluindo coleta, indexação para doenças, quarentena,

multiplicação, caracterização e avaliação, armazenamento e distribuição de germoplasma (IBPGR, 1991).

A conservação de espécies medicinais e aromáticas em um banco de germoplasma *in vitro* permitirá enfrentar os desafios futuros, fornecendo material genético para caracterização, desenvolvimento de variedades e contribuindo para o conhecimento do metabolismo secundário dessas espécies.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tratamento das matrizes e pré-asepsia do material

As matrizes cultivadas em casa de vegetação foram pulverizadas com 2 g L⁻¹ de fungicida Cerconil®, durante 15 dias. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, ramos jovens foram coletados e lavados em água corrente por 30 minutos, retirando-se o excesso de lâminas foliares. Em seguida, foram colocados em um recipiente com 10 gotas de detergente neutro por 1L de água, durante 10 minutos, com agitação e, posteriormente, lavados três vezes com água destilada e autoclavada para remoção do detergente.

3.2 Concentrações de hipoclorito de sódio no estabelecimento *in vitro* de *L. alba*

Em câmara de fluxo laminar, segmentos nodais de aproximadamente 1,5 cm foram individualizados e imersos em hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações (0,4; 0,6; 0,8 e 1,0%) e por diferentes tempos de imersão (8, 12 e 16 min.), e logo após foram inoculados em tubos de ensaio com 20mL de meio MS (MURASHIGE; SCOOG, 1962), contendo 7g L⁻¹ de ágar e pH ajustado a 5,7±0,1 antes da autoclavagem (121±1°C e 1,05 atm por 20 minutos). Após a inoculação os tubos foram vedados com parafilme. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 35µmol m⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias. Após 30 dias, os propágulos foram avaliados em contaminação (%), número de brotos, número de folhas e sobrevivência (%).

O experimento foi instalado em esquema fatorial 4x3, quatro concentrações de hipoclorito e três tempos de imersão, totalizando 12 tratamentos e quatro repetições, cada uma composta por cinco tubos de ensaio, com um explante cada.

3.3 Cefotaxima sódica no estabelecimento *in vitro* de *L. alba*

Na câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram submersos em álcool etílico 70% durante 30 segundos, e em seguida, lavados três vezes com água destilada e autoclavada para assim serem submetidos aos tratamentos.

Antes de serem inoculados, os segmentos nodais foram reduzidos a 2 cm de comprimento. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado

(DIC), com cinco doses de Cefotaxima sódica (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹) e cinco repetições, sendo cada repetição constituída por cinco tubos de ensaio contendo um explante cada. O meio de cultura utilizado foi o MS, contendo 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,7 ± 0,1. O antibiótico foi esterilizado a frio por filtração (millipore, 0,22 µm) e adicionado ao meio de cultura quando este permanecia em processo de resfriamento (40 a 50°C).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 35µmol m⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

Após 30 dias, foram avaliadas a contaminação (%), a oxidação (%) e a sobrevivência (%) dos explantes.

3.4 Cultura de ápices caulinares

Em câmara de fluxo laminar, os ramos foram imersos em álcool 70% durante 30 segundos. Em seguida, os ápices caulinares foram assepticamente extraídos, sob lupa estereoscópica binocular, com aumento de 300 x e com o auxílio de pequenas pinças, bisturis e estiletos, sendo inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE; SCOOG, 1962) suplementado de diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 mg L⁻¹). Após a inoculação, os tubos foram vedados com parafilme e as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 35µmol m⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

Após 140 dias, foram avaliadas a contaminação (%), a sobrevivência (%), a oxidação (%) e o número de brotos. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro doses de BAP e cinco repetições, sendo cada repetição constituída de cinco ápices caulinares.

3.5 Aclimatização de mudas de *L. alba*

Foram utilizadas mudas cultivadas *in vitro* e com 40 DAI (dias após inoculação), já enraizadas e com aproximadamente 6 cm de altura.

O processo de aclimatização constou de três etapas sucessivas. Na 1ª etapa, os tubos de ensaio foram abertos e as plântulas ficaram expostas ao ambiente de câmara climatizada durante 15 dias.

Para a 2ª etapa, as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio e lavadas para remover os resíduos de meio de cultura aderidos às raízes, sendo, posteriormente feito o transplântio para bandejas de poliestireno expandido, com 72 alvéolos contendo os diferentes substratos. As mudas permaneceram em ambiente de câmara climatizada durante 20 dias. Nesse período, elas foram regadas com solução de sais MS.

Na 3ª etapa, foi feita a transferência da bandeja para casa de vegetação, onde as mudas permaneceram durante 40 dias.

O delineamento foi o inteiramente casualizado, constando de quatro tipos de substratos, sendo eles: Pó de coco + calcário (1g. L^{-1}), Plantmax® + calcário (1g.L^{-1}), Vermiculita + calcário (1g.L^{-1}) e Pó de coco, Plantmax® e Vermiculita (1:1:1) + calcário (1g.L^{-1}), e cinco repetições, sendo cada repetição constituída de cinco plântulas.

Após o término das três etapas (75 dias), foram avaliadas as variáveis sobrevivência (%), comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm), número de folhas e peso de massa fresca e seca da parte aérea e da raiz (g^{-1}).

3.6 Estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro* de *L. Alba*

Mudas cultivadas *in vitro*, com 30 dias e com média de 6 cm de comprimento, foram utilizadas como fonte de explantes para o experimento; segmentos nodais foram isolados em câmara de fluxo laminar e inoculados em tubos de ensaio com meio MS contendo 7g L^{-1} de ágar e pH ajustado a $5,7\pm 0,1$ antes da autoclavagem ($121\pm 1^\circ\text{C}$ e $1,05\text{ atm}$ por 20 minutos) e suplementado com agentes osmóticos e inibidores de crescimento.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos, sendo eles: T1 (MS + 2% sacarose + 4% de sorbitol); T2 (MS + 2% sacarose + 4% de sorbitol + 2 mg L^{-1} pantotenato de cálcio); T3 (MS + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L^{-1} pantotenato de cálcio); T4 (MS/2 + 2% sacarose + 4% de sorbitol); T5 (MS/2 + 2% sacarose + 4% de sorbitol + 2 mg L^{-1} pantotenato de cálcio) e T6 (MS/2 + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L^{-1} pantotenato de cálcio); e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por cinco tubos de ensaio com um explante cada.

O material foi mantido em câmara de germinação a 18°C e fotoperíodo de 16 h de luz. Avaliou-se a sobrevivência (%), explantes com brotação (%), número de brotos, número de raiz e a altura dos brotos. As avaliações foram realizadas aos 45, 60, 75 e 90 dias após inoculação.

3.7 Análise Estatística

Os dados de porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $(x/100)$ e submetidos à análise de variância, pelo teste F e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000). E, para os dados do Banco de Germoplasma, utilizou-se o programa Assistat (SILVA, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentrações de hipoclorito de sódio no estabelecimento *in vitro* de *L. alba*.

A interação entre as concentrações de hipoclorito de sódio e os tempos de imersão não foi significativa. Observou-se que, para todas as variáveis analisadas, a concentração de 1% de hipoclorito de sódio foi a mais eficiente.

Quanto maior a concentração de hipoclorito de sódio utilizada, menor foi a ocorrência de contaminação. Quando se utilizou a concentração de 0,4%, a contaminação foi de 66,67%. Para as concentrações de 0,6 e 0,8%, a contaminação foi de 48,33% e, com a concentração 1%, a contaminação foi de 23,33% (FIGURA 1).

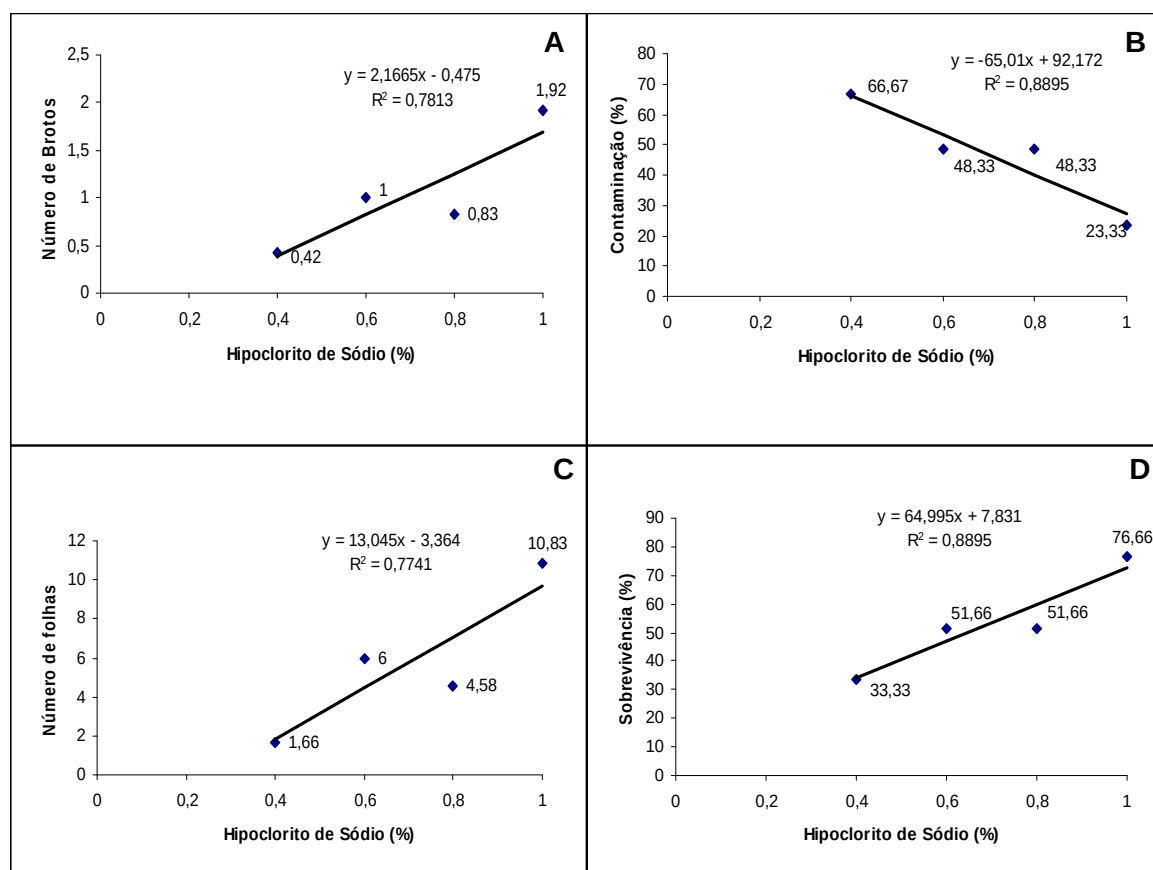


Figura 1. A-número de brotos, B-contaminação (%), C-número de folhas, D-sobrevivência (%) de segmentos nodais de *L. alba*, em função de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. UFU, Uberlândia, MG. 2010.

Resultados semelhantes foram obtidos por Passera e Ambrosetti (1999), que utilizando solução de hipoclorito de sódio a 1,2% e por 30 minutos na desinfestação dos explantes de *L. integrifolia*, obtiveram 24% de contaminação.

Na desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunni* com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, Almeida e colaboradores (2008) obtiveram menor contaminação bacteriana utilizando 1% de hipoclorito de sódio.

No geral, o número de brotos pode ser representado por uma equação linear positiva, sendo o aumento de acordo com o aumento das concentrações de hipoclorito de sódio, com valores de 0,41; 1; 0,83 e 1,91 brotos, para as concentrações de 0,4; 0,6; 0,8 e 1% de hipoclorito de sódio.

Para a variável número de folhas, foram observadas diferenças significativas entre as concentrações testadas, seguindo o mesmo comportamento do número de brotos, com valores de 1,66; 6; 4,58 e 10,83 folhas, para as concentrações de 0,4; 0,6; 0,8 e 1% de hipoclorito de sódio.

A sobrevivência dos explantes foi de 33,33%, quando foi utilizado 0,4% de hipoclorito de sódio. Estes valores foram maiores a medida que se aumentou a concentração de NaOCl, podendo essa variável ser representada por uma equação linear. O valor máximo de sobrevivência (76,66%) foi obtido quando utilizado 1% de NaOCl.

Em relação aos tempos de imersão, os de 8 e 12 minutos promoveram menor porcentagem de contaminação e maior porcentagem de sobrevivência. A menor porcentagem de sobrevivência ocorreu com o tempo de 16 minutos (TABELA 1), o que demonstra que o limite de tempo para desinfestação de explantes de *L. alba* é de 12 minutos .

TABELA 1. Contaminação (%), número de brotos, número de folhas e sobrevivência (%) de *L. alba*, em função de diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio. UFU, Uberlândia, MG. 2010.*

Tempo de imersão (minuto)	contaminação (%)	nº brotos	nº folhas	sobrevivência (%)
8	43,75 ab	1,25 a	7,62 a	56 ab
12	40,00 a	1,18 a	6,56 a	60 a
16	56,25 b	0,68 a	3,12 a	43 b
DMS:	20,33	0,89	6,12	20,33
CV:	39,88	79,02	97,15	34,90

* Valores com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

José e colaboradores (2006), trabalhando com *L. lacunosa*, utilizaram hipoclorito de sódio 0,4% para a assepsia dos explantes durante 8 min. Costa e colaboradores (2007) utilizaram hipoclorito de sódio a 0,8% durante 16 min. para desinfestação de *Lippia sidoides*.

Segundo Augusto e Biasi (2002), a contaminação dos explantes de amoreira-preta (*Rubus* sp.) foi reduzida com a imersão hipoclorito de sódio a 0,5% em diferentes tempos de imersão.

4.2 Cefotaxima sódica no estabelecimento *in vitro* de *L. alba*.

O uso do antibiótico cefotaxima proporcionou um efeito positivo no controle bacteriano dos explantes de *L. alba* (TABELA 2), sendo que a contaminação no tratamento controle foi de 60%. Já com a dose de 200 mg L⁻¹ de cefotaxima não houve contaminação.

TABELA 2. Contaminação bacteriana, oxidação e sobrevivência de explantes de *L. alba in vitro*, em função de concentrações de cefotaxima sódica no meio de cultura MS. UFU, Uberlândia, MG. 2010.

Cefotaxima (mg L ⁻¹)	Contaminação bacteriana (%)	Oxidação (%)	Sobrevivência (%)
0	60	5	35
50	5	55	40
100	10	45	45
150	5	75	20
200	0	90	10
CV (%)	79,75	26,97	38,82
Equação (Y=)	-1,08 + 1,90x - 0,81x ² + 0,10 x ³ R ² = 98.31%	2,41 - 2,57x + 1,14x ² - 0,14x ³ R ² = 99.63%	-0,11 + 1,31x - 0,58x ² + 0,07x ³ R ² = 99.47%

Resultados semelhantes com relação ao controle bacteriano foram obtidos no cultivo *in vitro* de *Heliconia pssittcorum* Sessé & Moc (SANTOS, 2000) e *Heliconia* sp. (NANNETTI, 1994).

Já em *L. sidoides* Cham., foram obtidos apenas 9,99% de contaminação bacteriana e 37,32% de sobrevivência dos explantes, utilizando-se 200 mg L⁻¹ de cefotaxima sódica (COSTA et al., 2007).

Conforme demonstrado na tabela 2, as doses de 50 mg L⁻¹ e de 150 mg L⁻¹ também proporcionaram um efeito positivo no controle da contaminação, sendo que apenas 5% dos explantes contaminaram.

Ferreira e colaboradores (2009) avaliaram a contaminação em diferentes tipos de explantes de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçuzeiro) inoculados em meio MS com e sem cefotaxima (100 mg L⁻¹), e verificaram que, na ausência de antibiótico, a contaminação variou de 20 a 73%.

A oxidação dos explantes ocorreu em todas as doses utilizadas de cefotaxima, sendo que, para a dose de 200 mg L⁻¹, houve uma taxa de oxidação de 90 %. De maneira geral, a utilização de 100 mg L⁻¹ de cefotaxima proporcionou menor taxa de oxidação. Modgil e colaboradores (1999) relataram que a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, e segundo Grattapaglia e Machado (1998), esse problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina.

O que se observou com relação a sobrevivência é que a maior porcentagem ocorreu com a dose de 100 mg L⁻¹ (45%), e com a dose de 50 mg L⁻¹ chegou a 50% (Tabela 2). Este resultado está diretamente relacionado à oxidação e contaminação bacteriana que, de maneira geral foram maiores utilizando-se as doses de 150 e 200 mg L⁻¹ de cefotaxima. Consequentemente, nestes tratamentos, menos explantes sobreviveram (20 e 10%). Em gemas axilares de mandioca *in vitro*, a dose de 100 mg L⁻¹ de cefotaxima sódica também controlou a contaminação bacteriana (CID; DURZAN, 2003).

4.3 Cultura de ápices caulinares

Verificou-se que o regulador de crescimento foi eficaz na regeneração dos ápices caulinares. Para a variável contaminação, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Para o número de brotos, o melhor resultado foi obtido quando se utilizou 1,5 mg L⁻¹ de BAP (FIGURA 2), verificando-se que quanto maior a dose de BAP, maior o número de brotos.

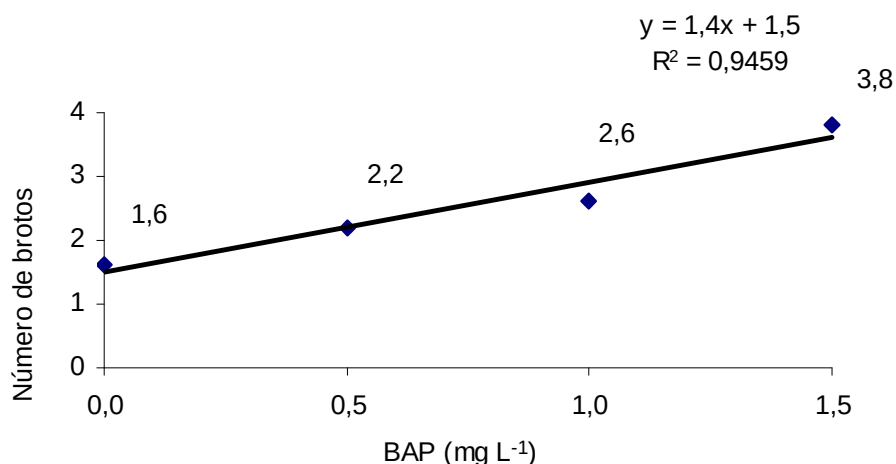


FIGURA 2. Número de brotos em ápices caulinares de *L. alba* inoculados em meio MS suplementado com diferentes doses de BAP. UFU, Uberlândia, MG. 2010.

López e Rodríguez (2001) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de BAP no desenvolvimento *in vitro* de *Ginkgo biloba* L. e observaram que o maior número de brotos ocorreu quando utilizaram 20 mg L⁻¹ de BAP.

Em relação à sobrevivência, esta variável seguiu a mesma tendência do número de brotos, sendo maior utilizando 1,5 mg L⁻¹ de BAP (FIGURA 3). No estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de *Passiflora alata* a maior sobrevivência dos explantes (100 %) foi obtida em meio MS adicionado 2 mg L⁻¹ de BAP (JUNGHANS et al., 2008).

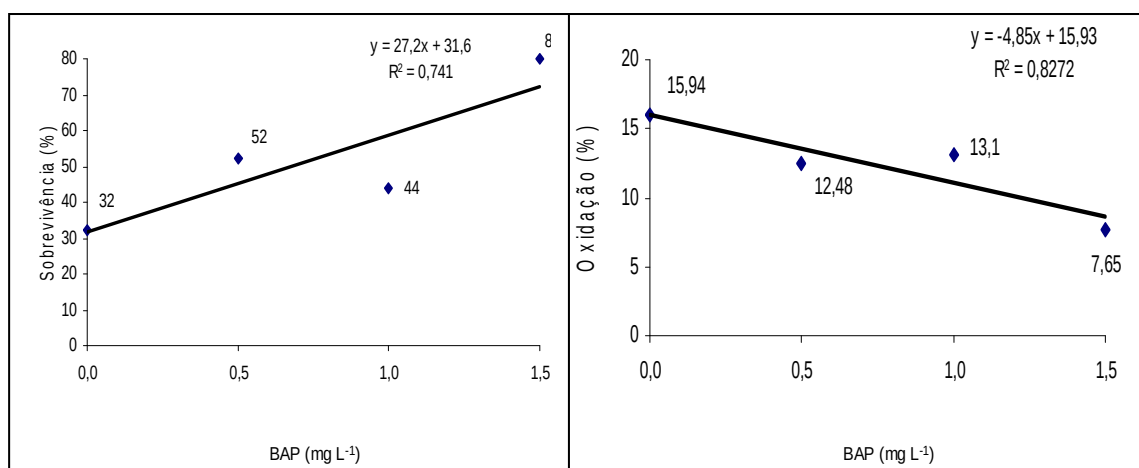


FIGURA 3. Sobrevivência (%) e oxidação (%) de ápices caulinares de *L. alba* inoculados em meio MS suplementado com diferentes doses de BAP. UFU, Uberlândia, MG. 2010.

Santa Catarina e colaboradores (2001) obtiveram 30% de ápices meristemáticos de macieira desenvolvidos em meio de cultura MS suplementado com 4,4μM de BAP.

Albuquerque e colaboradores (2000), testando diferentes meios de cultura para a regeneração de ápices caulinares de abacaxi, verificaram que o meio MS com BAP, foi um dos mais indicados, resultando em 32% dos ápices caulinares regenerados.

Um protocolo de regeneração de meristemas apicais de *Melia azedarach* L. foi desenvolvido utilizando-se meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP o qual promoveu maior proliferação de gemas (VILA et al., 2002).

Na propagação *in vitro* de cana-de-açúcar, os meios de cultura suplementados com BAP (0,1 e 0,2 mg L⁻¹) proporcionaram melhor desenvolvimento de brotações do que o meio sem adição de BAP (VIEIRA et al., 2009).

Quanto a oxidação, esta foi inversamente proporcional à sobrevivência. No tratamento com 1,5 mg L⁻¹ de BAP ocorreu 7 %, sendo essa a menor dentre os tratamentos; a maior oxidação ocorreu no tratamento sem adição de BAP, 15,94% (FIGURA 3).

4.4 Aclimatização de mudas de *L. alba*

Para a variável comprimento de raiz, não houve diferença significativa entre os substratos. A maior porcentagem de sobrevivência foi obtida quando se utilizou o substrato comercial Plantmax®, 80%, e a menor porcentagem foi obtida quando se utilizou o substrato pó de coco, 40% (TABELA 3).

TABELA 3. Sobrevivência, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e número de folhas de mudas de *L. alba* aclimatizadas com diferentes substratos. UFU, Uberlândia, MG. 2010*.

Substrato	Sobrevivência (%)	Comprimento parte aérea (cm)	Comprimento raiz (cm)	Número de folhas (cm)
Pó de coco	40 b	5,32 b	2,68 a	1,8 b
Plantmax®	80 a	15,43 a	5,40 a	7,56 a
Vermiculita	60 ab	11,48 ab	3,87 a	6,68 a
Pc; Pl; V ¹	64 ab	12,32 a	4,00 a	6,32 a
CV (%)	26,94	32,71	40,68	32,75

* Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05). ¹Pc; Pl; V: Pó de coco; Plantmax® e Vermiculita (1:1:1)

Almeida (2009), trabalhando com Gerânio (*Pelargonium graveolens* L.) obteve as maiores porcentagens de sobrevivência, utilizando os substratos pó de coco + Biosafra® + calcário e pó de coco + Biosafra® + calcário + vermiculita (1:1).

Silva e colaboradores (2007) relataram maior taxa de sobrevivência de *Aloe vera* L., ao final do período de aclimatização (60 dias), para os substratos areia, substrato comercial Plantmax® e casca de arroz carbonizada + Substrato comercial Plantmax® (1:1), os quais apresentaram respectivamente, 80, 95 e 75% de sobrevivência.

Em relação ao comprimento da parte aérea, os maiores valores foram obtidos quando se utilizou o substrato comercial Plantmax®, a mistura de todos os substratos (Pc; Pl; V) e a vermiculita.

Para o número de folhas, o menor valor foi obtido quando se utilizou o pó de coco como substrato (9 folhas), diferindo dos demais resultados (TABELA 3).

Quanto à massa fresca da parte aérea (TABELA 4), os melhores resultados foram obtidos utilizando o substrato comercial Plantmax®, a vermiculita e a mistura de todos os substratos (Pc; Pl; V).

TABELA 4. Massa fresca da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz de mudas de *L. alba* aclimatizadas com diferentes substratos. UFU, Uberlândia, MG. 2010*.

Substrato	Massa fresca parte aérea (g ⁻¹)	Massa fresca raiz (g ⁻¹)	Massa seca parte aérea (g ⁻¹)	Massa seca raiz (g ⁻¹)
Pó de coco	0,72 b	0,30 a	0,41 a	0,24 a
Plantmax®	3,54 a	0,65 a	0,94 a	0,47 a
Vermiculita	2,75 a	0,69 a	0,71 a	0,36 a
Pc; Pl; V ¹	3,46 a	0,38 a	0,67 a	0,20 a
CV (%)	40,50	45,41	53,32	47,81

* Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). ¹Pc; Pl; V: Pó de coco; Plantmax® e Vermiculita (1:1:1)

Segundo Hoffmann (1999), o Plantmax® apresenta características que favorecem o crescimento das mudas após emissão das raízes adventícias: porosidade, textura, drenagem, baixa compactação, presença de nutrientes e pH adequado ao crescimento e desenvolvimento da muda.

Para a massa fresca da raiz, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz, não houve diferenças significativas entre os diferentes substratos (TABELA 4).

4.5 Estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro* de *L. Alba*

Não houve efeito significativo da interação meio de cultura x dias de avaliação. A sobrevivência foi de 100%, para os tratamentos com MS + 4% de sorbitol, com MS/2 + 4% de sorbitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio e com MS/2 + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio.

Lemos e colaboradores (2002) relataram que explantes de cana-de-açúcar sobreviveram melhor em baixas temperaturas em meios de cultura contendo sorbitol, quando comparados com aqueles que continham apenas sacarose.

Utilizando meio MS suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e 20 g L⁻¹ de sorbitol, Faria e colaboradores (2006) verificaram que é possível conservar *Passiflora giberti* sob crescimento reduzido com um bom desenvolvimento radicular.

Segundo Pereira e colaboradores (2003), plântulas de catuaba [*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld ex de Souza], cultivadas em meio MS suplementando com 3% de sacarose e 4% de sorbitol, mantidas a temperatura de 18°C e fotoperíodo de 12 horas, podem permanecer no mesmo frasco por seis meses, sem substituição do meio de cultura.

Com exceção dos tratamentos T3 (MS + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio) e T6 (MS/2 + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio), em todos os outros tratamentos houve aumento da porcentagem do número de explantes com brotação no decorrer das avaliações.

Silva e colaboradores (2009) avaliaram a interação dos reguladores osmóticos manitol e sacarose no meio de cultura na conservação *in vitro* de germoplasma de *Pfaffia glomerata* e verificaram que os tratamentos com 29,2 mM de sacarose e manitol, 7,3 mM de manitol e 29,2 mM de manitol apresentaram os melhores resultados.

Malosso (2007) verificou que, para conservação de *A. oleracea in vitro*, o meio de cultura mais indicado é o meio MS acrescido de 2% de sacarose e 4% de sorbitol, uma vez que este apresentou 100% de explantes com brotação, vivos e enraizados, e maior número de brotos por gema (2,0 ± 0,3).

Em relação ao número de brotos, o tratamento T6 (MS/2 + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio) e o tratamento T3 (MS + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio) proporcionaram os melhores resultados, chegando a 8,25 e 8,75 brotos, respectivamente.

O número de raiz foi maior no tratamento T3 (MS + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio), variando de 0,5 a 0,75.

Para a variável altura dos brotos, não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém podemos verificar que com o tratamento T6 (MS/2 + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio) o crescimento foi mais etável no decorrer das avaliações (FIGURA 4).

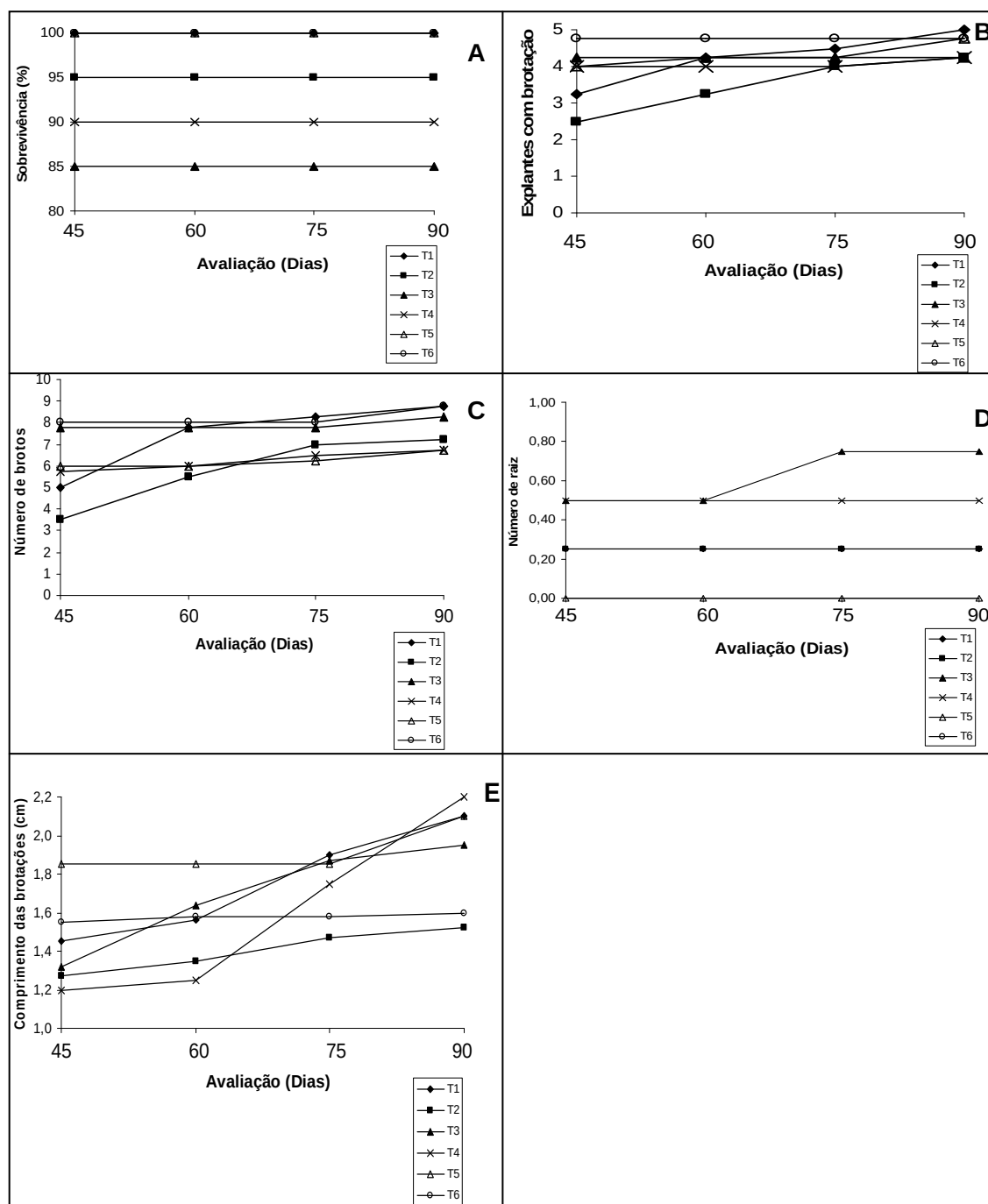


Figura 4. A- sobrevivência (%), B- explantes com brotação, C- número de brotos, D- número de raiz e E- comprimento das brotações (cm) na conservação *in vitro* de *L. alba* em diferentes reguladores osmóticos. **T1**- MS + 2% sacarose + 4% de sorbitol; **T2**- MS + 2% sacarose + 4% de sorbitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio; **T3**- MS + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio; **T4**- MS/2 + 2% sacarose + 4% de sorbitol; **T5**- MS/2 + 2% sacarose + 4% de sorbitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio; **T6**- MS/2 + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio. UFU, Uberlândia, MG. 2010.

5 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A concentração de 1% de hipoclorito de sódio promove uma melhor desinfestação dos explantes de explantes de *L. alba*.
- Os tempos de imersão de 8 e 12 minutos mostraram os melhores resultados para a assepsia de *L. alba*.
- A dose de 100 mg L⁻¹ do antibiótico cefotaxima proporcionou uma maior porcentagem de sobrevivência e menor taxa de oxidação dos explantes.
- Para o estabelecimento de ápices caulinares de *L. alba in vitro* é necessário utilizar o meio MS suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de BAP.
- O uso do substrato comercial Plantmax® promove maior sobrevivência, maior comprimento da parte aérea, maior número de folhas e maior massa fresca da parte aérea na aclimatização de *L. alba*.
- O tratamento com MS/2 + 2% sacarose + 3% de manitol + 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio (T6) é indicado para a conservação e manutenção de *L. alba in vitro* por um período de 90 dias.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N.de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K.V.; MORAIS, A. R.de; GEROMEL, C.; LADEIRA, A; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides* uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n.1, p. 1-7, 2003.
- ALBUQUERQUE, C. C. et al. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, Piracicaba [online]. v.57, n.2, p. 363-366, 2000.
- ALMEIDA, J. R. DE, MARTINS C. R. E DUTRA L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro* **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.15, n.1, p. 54-60, 2008.
- ALMEIDA, S. A. de. **Micropropagação, teor e constituição química do óleo essencial de Gerânio (*Pelargonium graveolens* L.)**. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.
- AMARAL, C. L. F., SILVA, A. B. da. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 30, p. 55-59, 2003.
- ANDRADE, M.W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A S.; MELO, P. R. A.de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.
- ANJOS, D. C. DOS, HERNANDEZ, F. F. F., NETO, A. A. M., DINIZ, J.D. N. Aclimatização de mudas micropropagadas de minirosa, *rosa Chinensis* ‘minima’ em diferentes substratos. In: Encontro nacional sobre substratos para plantas, 6, 2008, Fortaleza. **Reumos...** Fortaleza: Embrapa Agroindustria Tropical, 2008.
- AUGUSTO, C. S. S.; BIASI L. A. Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos. **Scientia Agrária**, Curitiba, n.3, p.114-114, 2002.
- BENNETT, I. J.; McCOMB, J.A., TONKIN, C.M.; McDAVID, D.A.J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of Labill. **Annals of Botany**, London, v. 74, p. 53-58, 1994.
- BERTOLOTI, G.; GONÇALVES, A.N. **Produção de mudas de essências florestais em tubo de ensaio**. Piracicaba, ESALQ-USP, 1979. 8p. (Circular técnica, n. 69)
- BIASI, L. A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *L. alba*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.33, n.3, maio/Jun., 2003.
- BIASI, L.A.; KOLLER, O.C.; KAMPF, A.N. Micropropagação do abacateiro “ouro verde” a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 7, p. 1051-1058, 1994.

BRAINERD, K.E.; FUCHIMGAMI, L.H. Acclimatization of asptically cultured plants to low relatively humidity. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.4, p.515- 518, july. 1981.

CAPOTE, A.; FUENTES, V.; BLANCO, N.; PEREZ, O. Micropropagacion y regeneration de plantas *in vitro* de oreganillo *Lippia micromera* Schau. **Revista del Jardin Botanico Nacional**, La Habana, n.20, p.139-142,1999.

CARRICONDE, C. et al. **Plantas medicinais**; plantas alimentícias. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1996. 153p.

CARVALHO, G. et al. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arábica* L.) propagadas “*in vitro*”. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.483-490, 1999.

CID, L. P.; DURZAN D. J. **Efeito da cefotaxima na germinação, crescimento e brotação de gemas axilares, sob condições *in vitro***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 17 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 49).

CORRÊA, R.M. Contaminação em cultura de tecidos. **ABCTP Notícias**, n. 50, p. 6-18, 2004.

COSTA, S.; ARRIGONI-BLANK M. F.; BLANK A. F.; MENDONÇA A. B.; AMANCIO V. F.; LEDO A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, n. 25, p. 68-72, 2007.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: review. **Euphytica**, Wageningen, n. 57, p. 227-243, 1991.

ENGELMANN, F. M.; Ex situ conservation of plant germoplasm using botecnology. **Word Jornal of Microbiology ; Biotecnology**. v. 11, p. 375 - 382, 1995.

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. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

FARIA, G. A.; COSTA M A P DE C; JUNGHANS T G; LEDO C A DA S; SOUZA A DA S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 267-270, ago. 2006.

FERREIRA, M. DAS G. R.; SANTOS M. R. A. DOS; BRAGADO A. C. R. Desinfestação de explantes florais de cupuaçuzeiro. **Saber científico**, Porto Velho, v. 2, n. 2, p. 37-44, 2009.

FERREIRA, D.F. **Sisvar 5.0**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: CURSO SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS, Brasília, 1997. **Anais** Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1997, p.71-115.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, AC.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPH, 1998, p.183-260.

GUPTA, S.K.; KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **Current Science Bangalore**, Bangalore, v.81, n.2, p.206-10, 2001.

HENSHAW, G. G. Tissue culture methods and germoplasm storage. In: Proceedings of the 5th international congress on plant tissue culture. Ed. Fujiwara. Tokyo Japan: Abe Photo Printing Co. LTd. P. 789-792, 1982. In: VILLASLOBOS, V. M.; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. **Word Jornal of Microbiology**; Biotechnology. v. 11, p. 375 - 382, 1995.

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’**. 1999. 240 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

IBPGR. Elsevier’s dictionary of plant genetic resources. Roma, 1991. 187p.

JOLY, A. B. **Botânica** – Introdução à taxonomia vegetal. 7. ed. São Paulo: Nacional, 1985.

JOSÉ, D. P.; TAVARES, L. S.; MAZZOCCOLI, L.; VICCINI, L. F.; SANTOS, M. DE O. Multibrotação *in vitro* de *Lippia lacunosa* induzida por BAP. In: SEMANA DE BIOLOGIA, 24., 2006, Juiz de Fora; MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2006, Juiz de Fora. **Resumos...** Juiz de Fora: UFJF, 2006. p. 166-168.

JUNGHANS, T. G.; CALDAS C. DOS S.; SIMÕES, K. DA S.; SOUZA, A. DA S.; ANDRADE, S. R. M. de. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares provenientes de plantas adultas de *Passiflora alata* curtis visando limpeza clonal. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 20., 2008, Vitória; Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 54., 2008, Vitória. **Resumos...** Vitória, 2008.

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

MALOSSO, M. G. **Micropropagação de *acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen e estabelecimento de meio de cultura para a conservação desta espécie em de banco de germoplasma *in vitro***. 2007. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade Federal do Amazonas, Coari, 2007.

MANTOVANI, N.C., FRANCO, E.T.H., GUERRA, M.P., HOPPE, J. M. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.9, n.1, p. 47-61, 1999.

- MARTINS, E. R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000.
- MING, L.C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Verbenaceae**. 1992. 206 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.
- MODGIL, M; SHARMA, D. R; BHARDW, A. J. S. V. Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 81, p.179-188. 1999.
- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp.** 1994. 106 f. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.
- PASSERA, C. B.; AMBROSETTI, J. A. *In vitro* propagation of "Incauyo", *Lippia intergrifolia* (Gris.) Hier. (Verbenaceae), a medicinal and aromatic plant of Monte Phytogeographical Province, Argentina. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.502, p.319-324, 1999.
- PEREIRA, A. M. S. et al. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: conservation of an endangered medicinal plant. **Planta Medica**, Stuttgart, v.69, p.571-3, 2003.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* de batata em meios semi-sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1273-1279, 2003.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Desfolhamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada de crescimento durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.12, n.2, p.135-145, 2000.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. da. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.1, p.89-95, 2001.
- PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

ROCA, W. M. El Cultivo de Tejidos Vegetales para la Conservación y el Intercambio Internacional sobre Métodos de cultivo de Tejidos Vegetales Y sus aplicaciones em Agricultura. Tucuman, Argentina. Universidade de Tucuman, 1983. In: VILLASLOBOS, V. M.; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germoplasm using botecnology. **Word Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 11, p. 375 - 382, 1995.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos y aplicaciones. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697-712.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S. da C.; DENARDI, F., PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto de macieira 'Seleção 69' tolerante à podridão do colo (*Phytophthora cactorum*). **Cienc. Rural** [online]. v.31, n.5, p. 757-762, 2001.

SANTOS, M. H. L. C. **Avaliação do efeito de bactérias promotoras de crescimento *in vitro* e em casa-de-vegetação de Heliconia psittacorum** Sessé & Moc. 116 f, 2000. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

SILVA, R. DE C., LUIS, Z. G., PEREIRA, J. E. S.. Regulação do crescimento *in vitro* de germoplasma de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) pela interação de carboidratos In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 12. 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2009.

SILVA, C.G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de Aloe vera L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.9, n.1, p.29-35, 2007.

SILVEIRA E. B.; RODRIGUES V. J. L. B.; GOMES A. M. A.; MARIANO R. L. R.; MESQUITA J. C. P. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 211-216, 2002.

SOUZA JÚNIOR, E. E.; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimatização de plântulas de abacaxizeiro (*Ananás comosus* L. Merr) cv. Pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 31, n. 2, p. 147-151, jul./dez. 2001.

TEIXEIRA, J. B., **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. 2001. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20%20Jo%E3o%20Batista%20Teixeira.pdf> Acesso em: 04 abr. 2009.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1998. v. 1, p. 133-145.

TOWILL, L. E. Germoplasm preservation. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J.: **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2 ed. Boca Raton. CRC Press, 2000. p. 337-353.

VIEIRA, R. A.; SILVA, C. M. DA; SOUTO, E. R. DE; HATA, F. T., MACHADO, M. DE F. P. DA S.; MARCUZ, F. S. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades rb867515 e rb855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v.4, n.1, p. 122-126, jan/dez. 2009.

VILA, S., SCOCCHI, A. MROGINSKI L. Plant regeneration from shoot apical meristems of *Melia azedarach* L. (*Meliaceae*). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 24. n. 2, p.195-199. 2002

VILLALOBOS, V. M.; ENGELMANN, F.: Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. **Word Jornal of Microbiology; Biotecnology**. v. 11, p. 375 - 382, 1995.

ZIV, M. ; HALEVY, A.H. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. **HortScience**, Alexandria, v. 18, p.434-436, 1983.