

GERMINAÇÃO, AVALIAÇÃO DO ÁCIDO GIBERÉLICO E POSIÇÃO DO EXPLANTE NO ALONGAMENTO *IN VITRO* DE *Uncaria guianensis* (AUBLET) GMELIN RUBIACEAE (UNHA-DE-GATO)¹

Germination, avaluation of giberelic acid and position of explants *in vitro* of *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (cat's claw)

Rita de Cassia Alves Pereira², José Eduardo Brasil Pereira Pinto³, Suzan Kely Vilela Bertolucci³, Evaristo Mauro de Castro⁴, Fabiano Guimarães Silva⁵

RESUMO

Na Amazônia existe uma diversidade vegetal, onde se encontram muitas plantas com propriedades medicinais e, que durante milênios são utilizadas pelas comunidades nativas. Uma dessas plantas é a unha-de-gato (*Uncaria guianensis*), cujo valor medicinal se atribui a efeitos imuno-estimulantes, anti-inflamatório e inibidores de crescimento de células cancerígenas. Atualmente, a espécie vem sendo submetida a uma extração indiscriminada e intensiva, podendo levá-la a sua extinção. A micropropagação permite solucionar problemas dessa natureza. Objetivou-se com este trabalho identificar um protocolo de propagação *in vitro* desta espécie. O melhor meio para germinação dos embriões foi ¼ de MS independente da presença ou não de sacarose. A posição de inoculação do explante da espécie *Uncaria guianensis* demonstrou exercer influência no número médio de brotações/explante original, assim como no número de gemas iniciais. Presença ou ausência de ácido giberélico não exerceu efeito nesta característica, exceto quando explantes com uma única gema foram inoculados na horizontal.

Termos para indexação: Micropropagação, planta medicinal, embriões, unha-de-gato.

ABSTRACT

In the Amazon Rain Forest there are a great botanical diversity where can be found a lot of plants with medicinal properties, and for ages it has been used by the native people. One of those plants is *Uncaria guianensis* known as Cat's Claw to which is believed to have antiinflammatories, immunostimulating and growth inhibitors effects on cancerigenic cells. Nowadays, those species have been under uncontrolled and long extraction that could take to extinction. The micropropagation can solve these problems. The purpose of this work was to identify in vitro propagation protocol from these specie. The best medium for embryo germination was ¼ MS independent from presence or absence of saccarose. The explant inoculation position from *Uncaria guianensis* specie influenciated the shoots average number/original explant, as well as, the initial buds numbers. The giberelic acid presence or absence had not effect on this characteristics, except when explants with only one bud were inoculated in the horizontal position.

Index terms: Micropropagation, medicinal plant, embryos, Cat's Claw.

(Recebido para publicação em 26 de janeiro de 2005 e aprovado em 27 de junho de 2005)

INTRODUÇÃO

Uncaria guianensis, conhecida popularmente como unha-de-gato, é uma trepadeira lenhosa de ocorrência na Amazônia peruana, parte da Amazônia brasileira e também no Mato Grosso. O nome popular está associado aos espinhos encontrados na base de cada par de folhas. Essa planta tem sido usada tradicionalmente pelos indígenas peruanos e brasileiros há centenas de anos e os rumores de suas curas milagrosas despertaram, nos últimos trinta anos, o interesse científico e comercial (SILVA et al., 2002).

O interesse medicinal é decorrente da indicação popular como imuno-estimulante e anti-inflamatório. Atualmente, a espécie vem sendo submetida à extração

indiscriminada e intensiva, o que poderá levá-la à diminuição da variabilidade genética ou até mesmo a sua extinção (CAROTENUDO, 1997).

A propagação da unha de gato pode ser feita por sementes, que em geral apresenta boa germinação. No entanto, plantas advindas de sementes apresentam grande variabilidade quanto à morfologia e ao teor de metabólitos. O problema principal da unha de gato, é a diversidade genética dentro da espécie por ser muito variada, devido a cruzamentos ou por ecótipos ligados à distribuição geográfica, gerando heterogeneidade das características químicas desejadas (TORREJÓN, 1997).

Para a micropropagação em plantas duas estratégias têm sido utilizadas: a regeneração de calos e a multiplicação

¹Parte da Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras/MG, pelo primeiro autor.

²Pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical – R. Dra. Sara Mesquita – Cx.P.3761 – 60511-110 – Fortaleza/CE – cassia@cnpat.embrapa.br

³Professor do Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras/MG.

⁴Professor do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras/MG.

⁵Professor do CEFET – Laboratório de Cultura de Tecidos – Cx. P. 66 – Rio Verde, GO – fabiano@cefetrv.edu.br

de brotos. A regeneração de calos resulta em alta porcentagem de variação somaclonal, sendo questionável para a multiplicação clonal em larga escala. Por outro lado, a multiplicação de broto, é um método que pode ser utilizado na propagação clonal de diversas espécies (EINSET, 1986).

A regeneração de plantas *in vitro* tem obtido sucesso a partir de gemas apicais e axilares e explantes nodais para várias espécies da família Morácea (HOSSAIN et al., 1992; MHATRE et al., 1985; PATTNAIK et al., 1996).

As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos são regulados pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (SKOOG & MILLER, 1957). O efeito desses reguladores pode está relacionado com os fatores genéticos próprios de cada espécie (MORALES, 1990).

As giberelinas têm como principal efeito estimular o crescimento de órgãos já formados, mas podem inibir a iniciação de outros processos de formação de órgãos (GEORGE & SHERRINGTON, 1984; MURASHIGE, 1974). As giberelinas incrementam tanto a divisão celular quanto o alongamento das células formadas (TAIZ & ZEIGER, 1991).

Objetivou-se com este trabalho estudar a propagação *in vitro* de unha-de-gato por meio de germinação *in vitro* de embriões e avaliar o efeito do ácido giberélico (GA_3) e segmentos nodais pela adição de ácido giberélico ao meio de cultivo MS.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes utilizadas de unha-de-gato (*Uncaria guianensis*) são provenientes da Embrapa Acre (AC), coletadas de plantas adultas de populações naturais do município de Boca do Acre-AM.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para análise estatística de todos os experimentos utilizou-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2002).

Germinação *in vitro*

Inicialmente as sementes foram lavadas em água corrente por 10 minutos e posteriormente desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com solução de hipoclorito de sódio (1,25%) durante 15 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada e autoclavada para remoção do excesso da solução desinfestante.

Os embriões foram excisados e inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio de cultura

Murashige & Skoog (1962), em duas concentrações: MS completo e ¼ de MS, solidificado com 6,0 g.L⁻¹ de ágar em combinação com 0,0 e 15 g.L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado em 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, nível de irradiância de 15 mmol.m⁻².s⁻¹, e temperatura de 25 °C, durante 34 dias, quando se avaliou a porcentagem de germinação e comprimento das plântulas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e cinco repetições de 4 tubos cada uma constituindo um fatorial 2 x 2 sendo duas as concentrações do meio de cultivo (MS completo ¼ de MS) suplementados (15 g.L⁻¹) ou não (0,0 g.L⁻¹) com sacarose. Utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% para a comparação das médias dos tratamentos.

Avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de unha-de-gato

Segmentos nodais de plântulas estabelecidas *in vitro* oriundos com 1, 2 e 3 gemas, foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) na concentração padrão dos sais, vitaminas e inositol e 30 g.L⁻¹ de sacarose, acrescido de 6 g.L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem.

Os tratamentos consistiram na combinação de duas posições de inoculação (horizontal e vertical) presença ou ausência de GA_3 (0 ou 0,5 g.L⁻¹) com 1, 2 e 3. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 15 mmol.m⁻².s⁻¹, e temperatura de 25°C.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 2 x 3), totalizando 12 tratamentos com três repetições (8 tubos/repetição). Após 45 dias, foram avaliados número e comprimento das brotações, fitomassa fresca e seca das plântulas e presença de raízes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação *in vitro* de unha-de-gato

As sementes de *Uncaria guianensis* apresentaram porcentagem média de germinação de 90% uma semana após a inoculação dos embriões. Não houve efeito significativo da adição de sacarose e concentração do meio de cultura na germinação dos embriões de unha-de-gato. Percentuais de germinação de 100% ocorreram na presença de 15 g.L⁻¹ de sacarose, independente da concentração do meio de cultivo MS. O meio contendo ¼ de MS na presença de sacarose proporcionou maior comprimento da parte aérea das plântulas (Tabela 1).

Estes resultados encontram suporte semelhante aos relatados por Pinheiro et al. (2001), que verificaram que as maiores taxas de germinação em sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez) foram encontradas quando se utilizaram baixas concentrações de sacarose. Souza (2003), trabalhando com *Lychnophora pinaster* Mart., obteve melhor porcentagem de embriões germinados e maior comprimento da parte aérea em meio contendo ¼ de MS. Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que em alguns casos para espécies lenhosas, o meio MS em 100% de sua concentração não mostrou melhores resultados. George (1996) admite que as soluções de sais orgânicos e açúcares que compõem os meios de cultura de tecidos não possuem efeito puramente nutritivo, mas influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas.

Na Figura 1 mostra-se o efeito das diferentes concentrações do meio MS na ausência e presença de sacarose na germinação de embriões de *Uncaria guianensis*.

Avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de unha-de-gato

A posição de inoculação do explante demonstrou exercer influência no número médio de brotações alongadas/explante original, assim como o número de gemas iniciais. Presença ou ausência de GA₃ não exerceu efeito nesta característica, exceto quando explantes com uma única gema

foram inoculados na horizontal, proporcionando números reduzidos de brotações finais, comparado aos explantes inoculados na vertical, independente do número de gemas iniciais ou GA₃ (Tabela 2).

Explantes inoculados na horizontal em meios com GA₃ respondem ao acréscimo de gemas iniciais, aumentando o número de brotações finais, fato não observado quando estes foram inoculados em ausência de GA₃. Yui et al. (1990), trabalhando com macieira cv. "Golden Delicious", observaram que não houve diferença significativa para os níveis de 0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹ de GA₃. Os mesmos autores concluíram que o GA₃ é dispensável nos trabalhos de multiplicação da macieira *in vitro*, estando de acordo com as informações de Melo-Farias et al. (1998) e Ochatt & Caso (1983); George (1996) afirma que o efeito do GA₃ na proliferação de brotações varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo da espécie que está sendo micropropagada.

Maior comprimento de plantulas originais foi observado em explantes inoculados na horizontal, independente da suplementação com GA₃ e do número de gemas iniciais. Explantes inoculados na vertical com uma gema inicial e na presença de GA₃ apresentaram comprimento comparável aos melhores tratamentos, ou seja, aos inoculados na horizontal (Tabela 3).

TABELA 1 – Porcentagem de germinação de embriões e comprimento de brotações de *Uncaria guianensis* inoculados em diferentes concentrações de meio MS na ausência e presença de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2004.

| Tratamentos | Germinação (%) | Comprimento de brotações (cm) |
|-------------|----------------|-------------------------------|
| A | 92,50 a | 0,5 b |
| B | 92,50 a | 0,6 b |
| C | 100,00 a | 0,5 b |
| D | 100,00 a | 1,2 a |

Médias seguidas pela mesma letra na posição vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (A= MS; B=¼ MS; C= MS + sacarose; D= ¼ MS + sacarose).

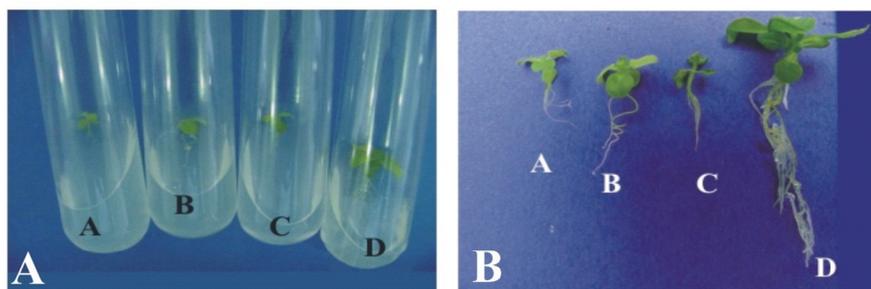


FIGURA 1 – (A) Plântulas obtidas *in vitro* a partir de sementes de *Uncaria guianensis* e (B) após 34 dias de inoculação em meio MS com diferentes concentrações na ausência e presença de sacarose. (A= MS; B=¼ MS; C= MS + sacarose; D= ¼ MS + sacarose).

TABELA 2 – Número médio de brotações em segmentos nodais de unha-de-gato com diferentes números de gemas (G), inoculados em posições horizontal e vertical em meio MS suplementado ou não com de GA₃, UFLA, Lavras-MG, 2004.

| | Posição de inoculação | Número de brotos | | |
|---------------------------------|-----------------------|------------------|---------|---------|
| | | 1G | 2G | 3G |
| Presença de GA ₃ (+) | Horizontal | 1,25 Bb | 1,83 Aa | 2,25 Aa |
| | Vertical | 1,08 Bb | 1,08 Bb | 1,20 Bb |
| Ausência de GA ₃ (-) | Horizontal | 2,17 Aa | 2,00 Aa | 2,08 Aa |
| | Vertical | 1,00 Bb | 1,17 Bb | 1,17 BA |

Médias seguidas na linha pela mesma letra maiúscula (tipo de explante) e minúscula na coluna (posição de explante) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3 – Comprimento médio de brotações em explantes foliares de unha-de-gato com diferentes números de gemas (G), inoculados em posições horizontal e vertical em meio MS suplementado ou não com GA₃, UFLA, Lavras-MG, 2004.

| | Posição de inoculação | Comprimento das brotações (cm) | | |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------|---------|
| | | 1G | 2G | 3G |
| Presença de GA ₃ (+) | Horizontal | 2,25 Aa | 2,47 Aa | 3,08 Aa |
| | Vertical | 2,33 Aa | 1,34 Bb | 1,24 Bb |
| Ausência de GA ₃ (-) | Horizontal | 2,81 Aa | 2,64 Aa | 2,67 Aa |
| | Vertical | 1,38 Bb | 1,58 Bb | 1,28 Bb |

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (tipo de explante), e minúscula na mesma coluna (posição de explante) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De modo semelhante, Oliveira et al. (2001), trabalhando com (*Averrhoa bilimbi* L.) em meio de cultura contendo 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃, verificaram que a presença de giberelina pouco contribuiu para o crescimento dos explantes, significando que as giberelinas não promovem respostas positivas.

Mishra et al. (1999) descreveram o alongamento dos internódios de *Emblica officinalis* Gaertn., quando utilizaram 1 mg.L⁻¹, enquanto 3 mg. L⁻¹ causou desfolhamento de alguns explantes. Deccetti (2000) relatou o efeito prejudicial do GA₃ no desenvolvimento de brotações de *Annona glabra* L., além da ocorrência de necrose apical e abscisão foliar. No entanto, Figueredo et al. (2001) relataram a necessidade do GA₃ para o alongamento das brotações de *Rollinia mucosa* Jacq.

Presença de GA₃ no meio de cultura não produziu efeito benéfico ao acúmulo de fitomassa. Na maioria em explantes inoculados na horizontal, o número de gemas iniciais influenciou apenas em presença de GA₃, quando explantes com uma única gema revelaram fitomassa inferior. Já, nos explantes inoculados na vertical, verificou-se menor

acúmulo de fitomassa em explantes com uma única gema na ausência de GA₃ (Tabela 4).

Plântulas com maiores acúmulos de fitomassa foram observadas em: explantes inoculados na horizontal sem GA₃ independente do número de gemas com peso entre 30 a 40 mg. Resultados semelhantes foram encontrados por Fráguas (2003) em plantas micropropagadas de figueira, quando o maior peso da matéria fresca dos explantes inoculados foi de 43 mg, na ausência de giberelina. Quando se utilizou duas e três gemas na ausência de GA₃, também ocorreu formação de raízes semelhante aos explantes inoculados na vertical. Kochba et al. (1974) citam que a presença de ácido giberélico no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona radicular existente, mas quando aplicado em concentrações elevadas, impede a formação de raízes. Alto percentual de enraizamento e maior número de raízes em *Annona glabra* foram observados por Deccetti (2000) na ausência de regulador de crescimento. Brum (2001), trabalhando com enraizamento de brotações de *Ficus carica* L., também afirma que não é necessário utilizar reguladores de crescimento para o enraizamento.

TABELA 4 – Média de fitomassa seca de brotações em explantes foliares de unha-de-gato com diferentes números de gemas (G), inoculados em posições horizontal e vertical em meio MS suplementado ou não com GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2004.

| | Posição de inoculação | Fitomassa seca de brotações (mg) | | |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------|----------|
| | | 1G | 2G | 3G |
| Presença de GA ₃ (+) | Horizontal | 22,3 Bb | 34,1Aa | 33,73 Aa |
| | Vertical | 18,33 Cc | 17,61Cc | 25,18 Bb |
| Ausência de GA ₃ (-) | Horizontal | 30,10 Aa | 37,60Aa | 34,18 Aa |
| | Vertical | 16,58 Cc | 23,46Bb | 25,48 Bb |

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (tipo de explante) e minúscula na mesma coluna (posição de explante) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Desse modo, o comportamento observado no desenvolvimento de *Uncaria guianensis* cultivada *in vitro*, sugere que a metodologia apresentada pode ser considerada para estudos do desenvolvimento vegetal. Os resultados demonstram que o uso de segmentos nodais com três brotações e inoculados na horizontal são de relevante importância na fase de multiplicação. Esse comportamento corrobora com as observações de Murashige (1974) com *Nicotiana tabacum* L. e na *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (MARTINS et al., 2000).

CONCLUSÕES

Embriões de *Uncaria guianensis* são excelentes fontes de explantes para o estabelecimento de cultura *in vitro*. Os melhores percentuais de germinação ocorrem na presença de 15 g.L de sacarose, independente da concentração do meio de cultivo MS.

A posição de inoculação do explante demonstrou exercer influência no número médio de brotações/explante original de *Uncaria guianensis*, assim como o número de gemas iniciais. Explantes inoculados na horizontal em meios com GA₃ respondem ao acréscimo de gemas iniciais, aumentando o número de brotações finais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUM, G. R. **Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) ‘Roxo de Valinhos’**. 2001. 41 p. Dissertação (Mestrado em Fitoquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

CAROTENUDO, D. ***Uncaria tomentosa* (Willd) DC**. San Marino: Poliedro, 1997. 35 p. (ZETA. Caderno, 1).

DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

EINSET, J. W. A practical guide to woody plant micropropagation. **Arnoldia**, Jamaica Plain, v. 46, p. 36-44, 1986.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistemas de análises de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Versão 4.3. Lavras: UFLA, 2002.

FIGUEREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 37, n. 4, p. 471-475, July/Aug. 2001.

FRAGUAS, C. B. **Micropropagação e aspecto da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**: handbook and directory of commercial Laboratories. Eversley: Exegetics, 1984. 593 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: part 1: the technology. 2. ed. Edington: Exergetics, 1996. 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A. M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 83-260.

HOSSAIN, M.; RAHMAN, S. M.; ZAMAN, A.; JOARDER, O. I.; ISLAM, R. Micropropagation of *Morus laevigata* Wall from mature trees. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n. 10, p. 522-524, Sept. 1992.

- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H.; KOCHABA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acids and adenine sulphate. **Annals of Botany**, London, v. 38, n. 157, p. 795-802, 1974.
- MARTINS, C. F.; NICOLOSO, F. T.; RUSSOWSKI, D.; FORTUNATO, R. P. Micropropagação de ginseng brasileiro (*Paffia tuberosa* (Spreng) Hicken): II. efeito da posição do segmento nodal na brotação. In: CONGRESSOS NACIONAIS DE BOTANICA, 51., 2000, Brasília. **Resumos...** Brasília: SBB, 2000.
- MELO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de Pereira "Old Home" x Farmingdale". **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 2, n. 2, p. 71-78, 1998.
- MHATRE, M.; BAPAT, V. A.; RAO, P. S. Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 4, n. 2, p. 78-80, 1985.
- MISHRA, M.; SAXENA, R. P.; PATHAK, R. K.; SRIVASTAVA, A. K. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture**, Chambattia, v. 31, n. 3/4, p. 116-122, Dec. 1999.
- MORALES, G. C. F. **Influência do AIB e da presença de folhas no enraizamento de estacas de laranjeira "Valencia" e tangerineiras Montenegrinas**". 1990. 125 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 1335-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PINHEIRO, C. S. R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gómez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.
- OCHATT, S. J.; CASO, O. H. In vitro propagation of peach: II. a medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars. **Fruit Varieties Journal**, [S.l.], v. 40, n. 2, p. 39-48, 1983.
- OLIVEIRA, A. K. D. de; ROCHA, R. H. C.; OLIVEIRA, O. F. de; CÂMARA, F. A. A.; Multiplicação *in vitro* do Bilimbi utilizando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Caatinga**, [S.l.], v. 14, n. 1/2, p. 37-41, 2001.
- PATTNAIK, S. K.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree *Morus australis* Poir. syn *M. acidosa* Griff. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, n. 11, p. 841-845, Aug. 1996.
- SILVA, S. R.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; SIANI, A. C.; VALENTE, L. M. M. Estudo comparativo da extração e caracterização do perfil em CLAE dos alcalóides de espécies do gênero *Uncaria*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 25., 2002. **Anais...** [S.l.]: SBQ, 2002.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, New York, v. 11, p. 118-131, 1957.
- SOUZA, A. V. de. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) Mart.** 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: The Benjamin Cummings, 1991. 559 p.
- TORREJÓN, G. D. **Uña de gato y produccion sostenible**. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, 1997. 138 p.
- YUI, E.; CORREA, D. M.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Micropropagação *in vitro* da macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivar "Golden Delicious". **Ciência e Prática**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 56-61, 1990.