

ARTIGO

**AUTORES:**

Zélia Terezinha
 Teixeira Rossi¹
 José Eduardo Brasil
 Pereira Pinto¹
 Suzan Kelly Vilela
 Bertolucci¹
 Lucila Elizabeth
 Fragoso Monfort¹
 Carolina Mariane
 Moreira¹

¹ Universidade Federal de Lavras
 – UFLA, 37200-000,
 Lavras, MG, Brasil

Recebido: 17/10/2011

Aceito: 08/02/2012

Autor correspondente:

José Eduardo Brasil Pereira Pinto
 E-mail: jeduardo@dag.ufla.br

PALAVRAS-CHAVE:

Meio nutritivo
 Micropropagação
 Planta medicinal
 Segmentos nodais
 Subcultivos
Mentha arvensis L.

KEY-WORDS:

Culture médium
 Micro-propagation
 Medicinal plant
 Nodal segment
 Subculture
Mentha arvensis L.

Crescimento in vitro de hortelã-japonesa em função de diferentes concentrações de sais e de número e tipo de explante

In vitro growth of Japanese mint using different salt concentration, number and explant type

RESUMO: A hortelã-japonesa (*Mentha arvensis* L., Lamiaceae) é uma planta medicinal e aromática. O óleo essencial rico em mentol é empregado nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. Este trabalho teve como objetivo determinar a influência da concentração de sais, da quantidade de explantes por frasco, do número e do tipo de explante na taxa de multiplicação *in vitro* de *M. arvensis*. As gemas foram inoculadas em diferentes concentrações de sais do meio MS e cultivadas em frascos com número diferente de explantes. O cultivo de gemas apicais em meios nutritivos com menor concentração de sais (MS/2) promoveu melhor desenvolvimento dessas gemas em plântulas e concentrações muito elevadas de sais se mostraram tóxicas à espécie. A quantidade de explantes inoculados por frasco não resultou em diferenças significativas no desenvolvimento de *M. arvensis* para o tamanho e o número de raízes (TR, NR). Segmentos nodais mais próximos ao ápice e os mais próximos à base da plântula promoveram maior crescimento *in vitro*, proporcionando maior taxa de multiplicação e aumento de subcultivos sucessivos.

ABSTRACT: Japanese mint (*Mentha arvensis* L.-Lamiaceae) is an aromatic medicinal plant. The essential plant oil, which is rich in menthol, is used in the pharmaceutical, cosmetics and food industries. The purpose of this research was to determine the influence of medium strength, type and number of explants on the growth of *Mentha arvensis*, as well as the *in vitro* multiplication rate. Shoots were cultured in media at different salt concentrations - medium strength (MS) and different amounts of explants per vial. The number of explants per vial did not result in significant differences in the development of *Mentha arvensis* and the best multiplication rate was obtained from lateral buds. The apical buds cultured in lower medium strength (MS/2) provided the best growth, while very high medium strength has proved to be toxic to this species, due to the absence of root development and low shoot development. Apical and basal nodal segments showed higher *in vitro* growth, presenting greater multiplication ratio and increased consecutive subcultures.

1 Introdução

Mentha arvensis L., Lamiaceae é popularmente conhecida como hortelã-japonesa, menta-japonesa ou hortelã-do-brasil. O óleo essencial rico em mentol é empregado como flavorizante e aromatizante na indústria (GARLET et al., 2007; CHAGAS et al., 2008).

A propagação de menta para produção agrícola é preferencialmente vegetativa, sendo realizada por estacas ou estolões (CHAGAS et al., 2008). Em se tratando de plantas medicinais, nas quais a qualidade do material genético e a homogeneidade das plantas são um dos fatores determinantes da sua qualidade, a micropropagação tem demonstrado excelentes resultados. Protocolos de micropropagação têm sido estabelecidos para espécies medicinais (SOUZA et al., 2007; PEREIRA et al., 2008). No entanto, o sucesso desse processo depende de diversos fatores, como o genótipo, o meio de cultivo, as condições de cultivo *in vitro*, a fonte, o tipo e o número de explantes por recipiente, dentre outros (DESCHAMPS; PINTO, 1995).

Fonseca et al. (2008) avaliaram diferentes tipos de explantes de *M. arvensis* em meio MS contendo diversas combinações de auxinas e citocininas, e concluíram que os segmentos nodais foram os mais efetivos na micropropagação, podendo ser utilizado o meio MS na ausência de reguladores de crescimento.

A produção de fitoterápicos depende da qualidade das plantas matrizes, que devem apresentar baixa variabilidade genética e homogeneidade. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de multiplicação de *M. arvensis* e as condições mais adequadas para o cultivo *in vitro* dessa espécie, em relação à concentração de sais do meio MS, ao número de explantes por frasco e ao tipo de explante.

2 Material e Métodos

A excisada de *Mentha arvensis* L. está depositada no herbário ESAL do Departamento de Biologia/UFLA, sob o registro nº 3636. As plantas matrizes foram cultivadas no Horto Medicinal da Universidade Federal de Lavras.

Experimento I: influência do meio de cultura no crescimento de plântulas. Avaliou-se o desenvolvimento de segmentos nodais em quatro diferentes concentrações dos sais do meio MS

(MURASHIGE; SKOOG, 1962): MS completo; 2 × MS (dobro dos sais); MS; MS/2 (metade dos sais), e MS/4 (um quarto dos sais). Os meios de cultura foram suplementados com 30 g L⁻¹ sacarose, 6 g L⁻¹ ágar, pH 5,7 ± 0,1 e autoclavados. Explantes de aproximadamente 1,0 cm foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio e mantidos sob 25 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa, temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 h de luz.

Após 45 dias, foram avaliados os seguintes aspectos: altura da parte aérea (cm), biomassa seca da parte aérea e da raiz (g), e número e tamanho (cm) de raízes. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), composto por quatro tratamentos, com quatro repetições e cinco tubos por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o software *Sisvar*. A fim de realizar uma análise exploratória dos dados, foi realizada uma Análise de Componente Principal (PCA-Principal Component Analysis). A PCA foi aplicada aos valores médios das variáveis de respostas de cada tratamento. Foi tratada uma matriz 4 × 5 (quatro tratamentos × cinco variáveis de respostas). Os dados foram pré-processados empregando-se autoescalamamento; os resultados estão demonstrados pelos gráficos dos escores e dos pesos, com dois componentes principais (PC) explicados pelas suas variâncias. Os cálculos foram feitos no software "MATLAB® 7.5".

Experimento II: influência do número de explantes por frasco no crescimento de plântulas. Para avaliar a influência do número de explantes por frasco, foram inoculados segmentos nodais obtidos a partir de plântulas pré-estabelecidas *in vitro* em frascos de vidro (com capacidade de 250 mL) com meio MS sem regulador de crescimento, contendo 40 mL de meio com 4, 6 e 8 explantes/frasco, totalizando três tratamentos. Após 30 dias, avaliaram-se a altura da parte aérea (cm) e o número e o tamanho de raízes (cm). O delineamento foi em DIC composto por 20 frascos, sendo quatro repetições com cinco frascos por repetição. As condições de cultivo e as análises estatísticas foram as mesmas aplicadas no Experimento I.

Experimento III: influência do tipo de explante no crescimento de plântulas. Os explantes utilizados foram: segmento apical e 1º, 2º, 3º, 4º e 5º segmentos nodais, contendo duas gemas axilares cada. Esses explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS semissólido, sem a presença de reguladores de crescimento. Após 45 dias, as plântulas foram avaliadas quanto à altura (cm), à biomassa seca da parte aérea e da raiz (g), ao número e ao tamanho (cm) de raízes. O delineamento experimental foi em DIC, com 6 tratamentos contendo 4 repetições e 5 tubos por repetição. As condições de cultivo e as análises estatísticas foram as mesmas aplicadas no Experimento I.

Experimento IV: taxa de multiplicação *in vitro* de *M. arvensis*. A taxa de multiplicação foi obtida após três repicagens de segmentos apicais e nodais. Na repicagem inicial (R_0), foram seccionados cem segmentos apicais e cem segmentos laterais (1,0 cm), e inoculados em tubos de ensaio com 10 mL de meio MS sólido, com 30 g L⁻¹ de sacarose e sem reguladores de crescimento. As condições de cultivo foram as mesmas utilizadas no Experimento I. Após 30 dias, realizou-se a primeira repicagem (R_1). Os segmentos obtidos na primeira repicagem foram, então, inoculados em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 40 mL de meio, com cinco segmentos por frasco, separando-se os segmentos apicais dos laterais. Após 45 dias, foram realizadas a segunda (R_2) e a terceira (R_3) repicagens, mantendo os segmentos laterais e apicais em frascos separados, com 5 segmentos por frasco. Após cada repicagem, foi avaliado o número total de gemas e foram determinadas as taxas de multiplicação, mediante a razão entre o número de explantes final e inicial, para cada repicagem.

3 Resultados e Discussão

A concentração de sais no meio MS influenciou o crescimento do explante de *M. arvensis* (Tabela 1). Na concentração mais elevada, obtiveram-se menor altura e menor biomassa seca da parte aérea em relação aos demais tratamentos. Além disso, não se desenvolveram raízes nas plantas desenvolvidas nesse meio de cultura (2MS). Tal resultado demonstra que *M. arvensis* foi afetada pelas concentrações elevadas de sais no meio de cultura. A elevada concentração de sais pode ter afetado o processo morfogênico da espécie, resultando em menor desenvolvimento das plântulas. Efeitos negativos da elevada concentração de sais no meio MS já foram registrados sobre a micropropagação em outras espécies, como em acácia negra (*Acacia mearnsii*); nesta, a elevação na concentração dos macronutrientes conduziu à senescência e à morte dos tecidos (DISARZ; CORDER, 2009).

Os meios MS, MS/2 e MS/4 não diferiram estatisticamente quanto à altura da parte aérea, ao número e à biomassa seca de raízes primárias. Em relação à biomassa seca da parte aérea (BSPA), os meios MS e MS/2 apresentaram maiores acúmulos. Já para o tamanho médio das raízes (TR), os meios MS/2 e MS/4 proporcionaram maior comprimento das raízes. Portanto, os meios de cultivo com menores concentrações de sais promoveram, em geral, melhor desenvolvimento das plântulas de *M. arvensis*. O suprimento dos nutrientes minerais no meio de cultura varia conforme a espécie vegetal e o processo de cultivo. Essa variação ocorre por causa da influência das espécies nas respostas *in vitro*, uma vez que cada espécie possui características únicas, determinadas por fatores genéticos e fisiológicos; portanto, as condições para o cultivo *in vitro* são diferenciadas.

Tabela 1. Médias da altura da parte aérea (APA), biomassa seca da parte aérea (BSPA) e tamanho médio (TR), número médio (NR) e biomassa seca (BSR) das raízes de plântulas de *M. arvensis* cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações dos sais do meio MS.

Meio de cultura	APA (cm)	BSPA (g)	TR (cm)	NR	BSR (g)
2MS	0,58 b	0,024 c	-	-	-
MS	0,97 a	0,049 a	2,77 b	5,00 a	0,011 a
MS/2	0,97 a	0,041 ab	3,78 a	4,75 a	0,012 a
MS/4	0,88 a	0,028 bc	4,04 a	4,75 a	0,016 a
CV (%)	21,59	26,02	10,46	18,35	32,48

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

É possível reduzir a concentração de sais do meio MS para diversas espécies, visando o melhor desenvolvimento das plantas e a redução nos custos (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Meios de cultura MS com 50% da concentração de sais resultaram em bom desenvolvimento vegetativo de *Sinningia speciosa* (PAIVA et al., 1997) e *Oncidium varicosum* (REGO-OLIVEIRA; FONSECA; SACONATO, 2003). Em *Lychnophora pinaster*, a diminuição da concentração dos sais do MS para MS/4 também proporcionou maior desenvolvimento das plântulas (SOUZA et al., 2007).

Os resultados do teste de médias demonstrado na Tabela 1 explicam os resultados entre os tratamentos isoladamente, em cada variável de resposta. Porém, não é possível estabelecer a discriminação entre o conjunto de dados e definir a relação entre os tratamentos e as variáveis de respostas. Para tanto, aplicou-se análise de componentes principais. O resultado obtido a partir do autoescalamento indicou que a variância cumulativa foi de 99,47%, sendo que a primeira componente principal explica 84,24% e a segunda, 15,23% (Figura 1). A partir do gráfico de escores, pode-se observar a separação entre as concentrações de sais no meio de cultura MS (Figura 1). O meio contendo o dobro da concentração de sais do MS mostrou ser o mais distante entre as concentrações de sais avaliadas, confirmando a sensibilidade de *M. arvensis* a altas concentrações de sais. Os meios MS e MS/2 apresentaram maior similaridade entre si, o que, comparando-se com o gráfico de pesos, indicou serem estes os melhores meios para o crescimento e o acúmulo

de biomassa da parte aérea. No entanto, os meios MS/2 e MS/4 proporcionaram maiores crescimento, desenvolvimento e acúmulo de biomassa das raízes e de crescimento da parte aérea. Os resultados dos gráficos de escores e pesos corroboram com aqueles discutidos anteriormente, segundo os quais o meio MS/2 demonstrou ser o melhor meio para a micropropagação de *M. arvensis*.

Número menor de explantes por frasco resultou em plântulas com maior altura (Tabela 2), o que pode ter ocorrido, provavelmente, em função da competição por nutrientes do meio de cultura e luminosidade entre os tratamentos.

Com relação ao número e ao tamanho de raízes primárias, estes não diferiram significativamente entre os tratamentos.

Não houve diferença estatisticamente significativa para os números de 4 e 6 explantes/frasco, os quais proporcionaram incrementos de 29 e 18% na APA em relação ao maior número de explante por frasco (8 explantes/frasco). Na prática, a diferença observada no tamanho de 6 explantes/frasco não é crítica para a produção de mudas *in vitro* de *M. arvensis*, mesmo porque os tratamentos correspondentes a 6 e 8 explantes/frasco não apresentaram diferenças significativas. Portanto, considerando-se que para a produção de 24 mudas de *M. arvensis* seriam necessários quatro frascos com 6 explantes/frascos ou 3 frascos com 8 explantes/frasco, recomenda-se a utilização de 8 segmentos nodais por frasco para a micropropagação da *M. arvensis*, a fim de reduzir custos e espaço na produção das mudas. Avaliando-se o crescimento de *Cattleya percivaliana*, quando

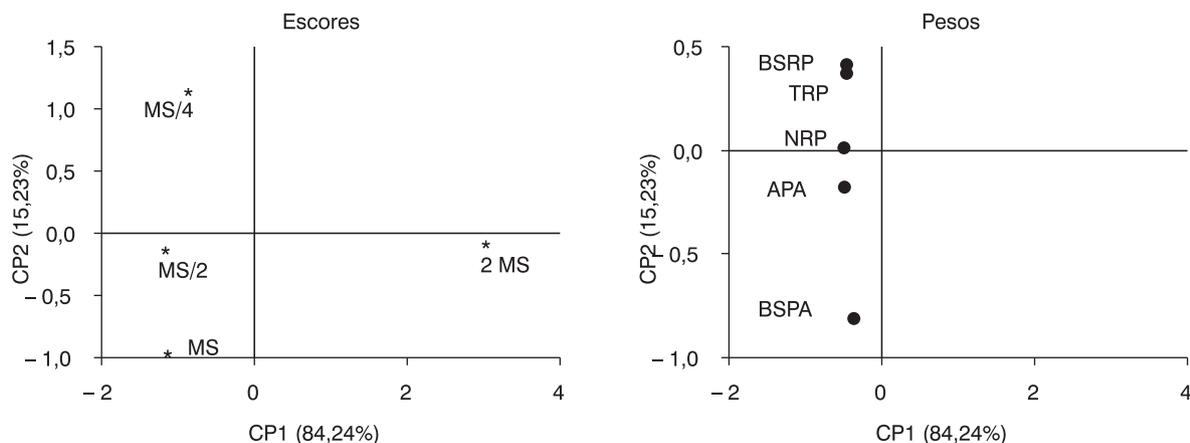


Figura 1. Análise de componentes principais da avaliação de crescimento *in vitro* de *M. arvensis* cultivada em diferentes concentrações de sais do meio de cultura (2MS, MS, MS/2 e MS/4).

cultivada em diferentes números de explantes por frasco (3, 6, 9 e 12), Soares et al. (2008) também observaram melhores resultados para número de raízes com a utilização de nove e 12 plântulas por frasco, embora plântulas desenvolvidas no menor número de explantes por frasco tivessem apresentado maior crescimento da parte aérea. Esses autores também sugeriram o uso de maior quantidade de explantes por frasco na micropropagação dessa espécie de orquídea, para economizar os custos.

A posição do explante na plântula é um fator importante a ser considerado no crescimento *in vitro* em razão das concentrações endógenas de fitormônios nos tecidos.

Plântulas desenvolvidas a partir de segmentos apicais apresentaram maior altura da parte aérea (APA) do que as desenvolvidas a partir de segmentos nodais. Com relação aos segmentos nodais, verificou-se que entre o segundo e o quinto segmentos não houve diferenças estatísticas; estes apresentaram maior altura da parte aérea em relação aos primeiros segmentos, que apresentaram menor desenvolvimento (Tabela 3). Os resultados observados podem estar relacionados aos níveis endógenos de fitormônios. Segundo Faria et al. (2007), a auxina é um hormônio vegetal produzido principalmente em regiões apicais de órgãos aéreos e é transportada para as raízes de célula a célula ou através do floema, formando assim um gradiente de concentração ao longo do

caule. Uma maior concentração desse hormônio nos segmentos nodais mais distantes do ápice poderia, então, explicar a maior altura da parte aérea das plântulas desenvolvidas a partir desses segmentos do que naquelas desenvolvidas de segmentos nodais mais próximos do ápice.

Observou-se também que as médias de biomassa seca da parte aérea (BSPA) foram maiores para as plântulas desenvolvidas a partir do segmento apical, dos quarto e quinto segmentos nodais, os quais não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3).

Em plântula de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) cultivada *in vitro*, o segmento basal (nodal) proporcionou a maior taxa de multiplicação e maiores biomassa, altura e número de raízes e brotações (NICOLOSO; ERIG, 2002). Em batata, também verificou-se maior altura média de brotações regeneradas de explantes oriundos das posições basal e apical do caule (PEREIRA et al., 2005).

O segmento apical, portanto, apresentou o melhor resultado para o crescimento *in vitro* de *M. arvensis*. Entretanto, sugere-se também o uso dos segmentos nodais, por estes apresentarem bom crescimento e tornarem a produção de mudas *in vitro* mais viável economicamente, uma vez que, a partir de cada segmento nodal, se desenvolvem duas brotações laterais, o que resulta em um maior número de brotações.

Tabela 2. Médias da altura da parte aérea (APA), tamanho das raízes (TR) e número de raízes (NR) de plântulas de *M. arvensis* cultivadas *in vitro* com diferentes números de explantes inoculados por frasco.

Explantes/frasco	APA (cm)	TR (cm)	NR
4	1,98 a	6,65 a	4,10 a
6	1,64 ab	5,80 a	4,35 a
8	1,41 b	5,96 a	3,90 a
CV (%)	14,71	20,50	18,66

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Médias da altura da parte aérea (APA), biomassa seca da parte aérea (BSPA), tamanho das raízes (TR), número de raízes (NR) e biomassa seca das raízes (BSR) de plântulas de *M. arvensis* cultivadas *in vitro* oriundas de diferentes posições do explante.

Posição do explante	APA (cm)	BSPA (g)	TR (cm)	NR	BSR (g)
Apical	2,76 a	0,054 a	3,39 a	2,25 ab	0,008 ab
1º segmento axilar	0,42 c	0,020 c	1,93 b	3,50 a	0,004 b
2º segmento axilar	0,73 bc	0,024 bc	3,01 a	2,00 ab	0,008 ab
3º segmento axilar	0,87 b	0,028 bc	3,31 a	2,25 ab	0,012 a
4º segmento axilar	0,95 b	0,041 ab	3,27 a	2,25 ab	0,010 a
5º segmento axilar	1,03 b	0,043 ab	3,24 a	1,50 b	0,008 ab
CV (%)	16,74	27,97	19,98	19,27	29,73

Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Tabela 4. Taxa de multiplicação (TM) e número de segmentos apicais e nodais obtidos na multiplicação *in vitro* de *M. arvensis* após três repicagens e estimativa após oito meses.

Segmentos	Inicial	1ª Repicagem (30 dias)	2ª Repicagem (45 dias)	3ª Repicagem (45 dias)	6ª Repicagem (estimativa)
Apicais	100	191	468	1992	-
Nodais	100	312	982	3955	-
Total	200	503	1450	5947	409.873
TM	-	2,51	2,88	4,10	

A utilização de segmentos apicais e nodais para a multiplicação de *M. arvensis in vitro* mostrou notável viabilidade em relação ao número de plântulas obtidas (Tabela 4). A segunda e a terceira repicagens resultaram em um aumento do número de plântulas de cerca de 13 e 43%, respectivamente. Com base na taxa de multiplicação da terceira repicagem (4,10), estima-se que, na sexta repicagem, um valor da ordem de 409.870 plântulas seria obtido num período de 8 meses.

Ao estudarem a taxa de multiplicação *in vitro* de erva cidreira (*Melissa officinalis*), Reis et al. (2008) demonstraram que, em plântulas presentes no meio MS sem a presença de BAP, pode-se obter um total de 1024 plântulas ao final de seis meses de cultivo, sendo que essa taxa de multiplicação é cerca de 2,1 vezes maior para plântulas cultivadas em meio MS do que para aquelas subcultivadas em meio MS na presença de BAP.

4 Conclusões

Os meios contendo menores concentrações de sais promovem melhores respostas para o crescimento e o desenvolvimento de *M. arvensis in vitro*. O meio com a metade da concentração dos sais MS (MS/2) constitui o melhor meio para a micropropagação da espécie através do cultivo de gemas apicais e segmentos nodais mais distantes do ápice (4º e 5º). Para economia de custos e espaço, recomenda-se a utilização de maior número de explantes por frasco. A taxa de multiplicação da espécie aumenta nos subcultivos sucessivos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq, pela concessão de Bolsas de Estudos, Bolsa de Produtividade (JEBPP) e suporte financeiro à pesquisa.

Referências

- CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; NALON, F. H. Produção de mudas de hortelã-japonesa em função da idade e de diferentes tipos de estaca. *Ciência Rural*, v. 38, n. 8, p. 2157-2163, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000800011>
- DESCHAMPS, C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de microestacas e micropropagação de gemas axilares de sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.). *Ciência Rural*, v. 25, p. 389-393, 1995. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781995000300010>
- DISARZ, R.; CORDER, M. P. M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* Wild. sob diferentes meios de cultura. *Revista Árvore*, v. 33, p. 599-606, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622009000400002>
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; LEDO, C. A. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; CUNHA, M. A. P. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, v. 4, p. 535-546, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052007000400002>
- FONSECA, V. O.; COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; SANTANA, T. H. B. Micropropagação, aclimatização e composição química do óleo essencial de hortelã japonesa (*Mentha arvensis* L.). *Plant Cell Culture and Micropropagation*, v. 4, p. 8-14, 2008.
- GARLET, T. M. B.; SANTOS, O. S.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; GARCIA, D. C.; FLEIG, E. B. V. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. *Ciência Rural*, v. 37, p. 956-962, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000400006>
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. *Plant propagation by tissue culture*. 3. ed. Springer: Netherland, 2008. 501 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-479,

1962. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, p. 1499-1506, 2002. Edição Especial.

PAIVA, P. D. O.; MAYER, M. B. D.; CAMPOS, R. J. C.; RODRIGUES, V. A.; PASCOAL, M. Propagação in vitro de gloxinia. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 3, p. 29-41, 1997.

PEREIRA, J. E. S.; FRANÇA, R. B.; DANTAS, A. C. M.; FORTES, G. R. L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. *Horticultura Brasileira*, n. 1, p. 86-89, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362005000100018>

PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; RODRIGUES, H. C. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; LAMEIRA, A. O. Micropropagation of the fiber-rich Amazonian species *Ananas erectifolius*

(Bromiliaceae). *HortScience*, v. 43, p. 2134-2137, 2008.

REGO-OLIVEIRA, F. R. T.; FONSECA, I. C. B.; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). *Semina*, v. 24, p. 265-272, 2003.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. *Revista Ceres*, v. 55, p. 160-167, 2008.

SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A. Crescimento *in vitro* de orquídeas: densidade de meio e número de explantes. *Revista Ceres*, v. 55, p. 49-53, 2008.

SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; COSTA, L. C.; DYER, W. E. *In vitro* propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): a threatened endemic medicinal plant. *HortScience*, v. 42, p. 1665-1669, 2007.