



Cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose

In vitro cultivation of pineapple seedlings using filters, artificial ventilation and sucrose

Patrícia dos Santos Mendes¹ Wellington Farias Araújo², Flávia Antunes³, Edvan Alves Chagas^{4*}, Marcio Akira Couceiro²

Resumo: Uma alternativa para a produção de mudas de qualidade é a utilização de sistemas de propagação *in vitro*. Porém, o ambiente de cultivo convencional *in vitro* é diferente do ambiente externo e comumente há razão de distúrbios fisiológicos e morfológicos na planta. Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o uso de filtros e ventilação artificial visando aumentar as trocas de ar do frasco com o ambiente e ajustar a concentração de sacarose no meio de cultura para o melhor desenvolvimento do aparelho fotossintético e estímulo do crescimento das plantas *in vitro* de abacaxizeiro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 x 3), com nove repetições. Os fatores em estudo consistiram de três concentrações de sacarose (0, 15, e 30 g L⁻¹) e três condições de ventilação do frasco (frasco sem filtro e sem ventilação, frasco com filtros sem ventilação e frascos com filtro com ventilação). O uso de frascos sem filtro e sem ventilação, acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose, proporciona maior crescimento das plantas *in vitro* de abacaxizeiro. O uso de frasco com filtro e com ventilação promove o aumento do teor de clorofila a, b, e total, bem como melhorias no sistema fotossintético das plântulas de abacaxizeiro.

Palavras-chave: Dióxido de carbono. Micropropagação. Pigmento.

Abstract: An alternative to the production of quality seedlings is the use of *in-vitro* systems of propagation. However, the conventional in-vitro environment is different from the external environment, and is often the reason for physiological and morphological disorders in the plant. To this effect, the aim of this study was to evaluate the use of filters and artificial ventilation to increase air exchange between the flask and environment, and adjust the concentration of sucrose in the culture medium for a better development of the photosynthetic apparatus, and stimulate the growth of pineapple plants *in vitro*. The experimental design was completely randomised in a 3 x 3 factorial scheme with nine replications. The factors under study consisted of three concentrations of sucrose (0, 15, and 30 g L⁻¹) and three methods for ventilating the flask (unfiltered flask with no ventilation, filtered flask with no ventilation, and filtered flask with ventilation). The use of unfiltered flasks with no ventilation and 15 g L⁻¹ of added sucrose, result in greater growth of the pineapple plants *in vitro*. The use of filtered flasks with ventilation promotes an increase in the levels of chlorophyll-a, chlorophyll-b, and total chlorophyll, as well as improvements in the system of photosynthesis of the pineapple seedlings.

Key words: Carbon dioxide. Micropropagation. Pigment.

*Autor para correspondência.

Enviado para publicação em 13/10/2014 e aprovado em 08/01/2015.

¹Eng. Agro., M.Sc., Programa de Pós-Graduação em Agronomia/UFRR. Campus Cauamé, BR 174, Km 12, Monte Cristo, Boa Vista-RR, pati_neg@hotmail.com

²Eng. Agro., Professor da Universidade Federal de Roraima, Campus Cauamé, BR 174, Km 12, Monte Cristo, Boa Vista-RR, wellington.araujo@ufrr.br, biofabrica@ufrr.br

³Bióloga, Professora da Universidade Estadual de Roraima, Rua 7 de Setembro, 231, Canarinho, Boa Vista-RR, antunes.flavia@bol.com.br

⁴Eng. Agro., Pesquisador da Embrapa Roraima, Rod. BR 174, Km 08, Distrito Industrial, Boa Vista-RR. Bolsista Produtividade em Pesquisa do CNPq, edvan.chagas@embrapa.br

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de abacaxi com 1,6 milhões de frutos e área de 64 mil ha em 2015. Os principais estados produtores são: Pará, Paraíba e Minas Gerais. Roraima possui 201 ha, contribuindo com 0,1% da produção nacional de abacaxi (IBGE, 2015).

O uso de material propagativo de boa qualidade é fundamental para se lograr êxito a qualquer atividade agrícola. A disponibilidade de mudas de abacaxi em quantidade e qualidade é um problema para os fruticultores. A demanda de material propagativo é grande, já que para o plantio de 1,0 ha são necessárias de 35.000 a 70.000 mudas, dependendo do espaçamento. Por outro lado, a taxa média de produção de mudas por planta é relativamente pequena, variando de três a seis mudas (BARBOZA *et al.*, 2004). Aliado a isso, as plantas com frutos doentes produzem mudas infectadas, o que acarreta perdas que variam de 15 a 20% do material propagativo no pré e pós-plantio (PEREIRA *et al.*, 2006).

A produção *in vitro* independe dos fatores do ambiente externo, o que assegura a produção em qualquer época do ano. Porém, o cultivo convencional *in vitro* (heterotrófico e fotomixotrófico) é restrito devido: ao elevado custo de produção, atribuído ao lento desenvolvimento e longo período de regeneração das plantas; ao pobre desenvolvimento do sistema radicular; à elevada porcentagem de contaminação e baixa porcentagem de sobrevivência das plantas na aclimatização *ex vitro*. Estes problemas estão diretamente relacionados com as condições convencionais do ambiente *in vitro* (KOZAI *et al.*, 2005).

O cultivo autotrófico é uma alternativa de sistemas que assegura maior eficiência técnica e econômica no cultivo *in vitro*. Assim, diversos trabalhos têm sido realizados, visando o ajuste dos sistemas para diversas culturas (AFREEN *et al.*, 2002; MORINI; MELAI, 2003; COUCEIRO *et al.*, 2006; SANTANA *et al.*, 2008). O cultivo fotoautotrófico *in vitro* é caracterizado pelo crescimento e desenvolvimento das plantas dependentes somente da fotossíntese e absorção de nutrientes inorgânicos do meio (KOZAI *et al.*, 2005). Comparado com o cultivo tradicional é possível reduzir o tempo de cultivo até 30% e resolver problemas de mau funcionamento de estômatos e hiper-hidratação (AFREEN *et al.*, 2002). Dentre as limitações para se obter um cultivo autotrófico adequado para a maioria das espécies estão o ajuste da concentração da sacarose e trocas gasosas, essas são proporcionadas pelo uso de ventiladores artificiais.

Entre as fontes de carbono, a sacarose é a mais utilizada em plantas cultivadas *in vitro* e é considerada a melhor fonte para o crescimento e diferenciação dos tecidos, além de ser absorvida com maior rapidez (FERREIRA *et al.*, 2002; SKREBSKY *et al.*, 2004). Já o aumento da ventilação nos frascos de cultura pode ser obtido por um sistema de

ventilação natural, que consiste no uso de membranas ou filtros de papel colocados sobre furos nos frascos o que possibilita a troca de gases entre frasco e sala de cultura, sem permitir a entrada de microrganismos patogênicos (KOZAI *et al.*, 2005).

Nesse contexto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o uso de filtros e ventilação artificial visando aumentar as trocas de ar do frasco com o ambiente e a concentração de sacarose no meio de cultura para o melhor desenvolvimento do aparelho fotossintético e estímulo do crescimento das plantas *in vitro* de abacaxizeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Biofábrica, localizada no Campus Cauamé/UFRR, município de Boa Vista-RR, localizado entre as coordenadas: Latitude 2° 49' 11" N, Longitude 60° 40' 24" W e altitude média de 90 m (ARAÚJO *et al.*, 2007).

O explante utilizado para o cultivo *in vitro* foi obtido de mudas do tipo filhote, provenientes de plantas matrizes de abacaxizeiro, cv. Perolera, coletadas no Campo Experimental do Cauamé. Após a coleta, as mudas foram lavadas em água corrente, retiradas as folhas externas deixando-se somente a parte interna e, em seguida, submetida ao processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar mediante a imersão em álcool 70%, por 3 minutos, seguido por imersão em solução aquosa de NaOCl 2% (hipoclorito de sódio) por 15 minutos e, posteriormente, realizou-se a tríplex lavagem com água destilada, deionizada e autoclavada (DDA). Após este processo, procedeu-se a excisão das gemas, que foram inoculadas em frascos com capacidade de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura MS, acrescidos de 7,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 6 g L⁻¹ de Agar e pH de 5,7, antes da autoclavagem a 121 °C (1 kg m⁻²) por 20 minutos. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 26 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 16 h.

Após 60 dias de cultivo, quando os explantes estavam estabelecidos, realizou-se a primeira replicagem das plântulas com o objetivo de obter a multiplicação do material propagativo para instalação do experimento. Após a replicagem, os explantes foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 30 mL de MS líquido, acrescidos de 1,0 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenacético) e pH ajustado para 5,7. Após, os frascos foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias. Esse procedimento foi realizado por três vezes, ou seja, por três ciclos de replicagem. No quarto ciclo, quando o número de explantes era suficiente, realizou-se a instalação do experimento. Nessa fase, o meio de cultura básico foi acrescido de

sacarose e os frascos vedados, conforme tratamentos e, acondicionados na sala de crescimento.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 x 3), com nove repetições, sendo o primeiro fator constituído pelas três concentrações de sacarose (0, 15, e 30 g L⁻¹), e o segundo fator compreendeu três condições de vedação e ventilação dos frascos (frasco sem filtro e sem ventilação (SF/SV), frasco com filtros sem ventilação (CF/SV) e frascos com filtro com ventilação (CF/ CV).

Para forçar a circulação do ar ao redor dos frascos foram instalados ventiladores de computador nas prateleiras da sala de cultivo. Nas tampas dos frascos, foram feitos dois furos de 10 mm de diâmetro. Para evitar a entrada de microorganismos, os furos foram cobertos com filtros de membrana (Milliseal, diâmetro do poro 0,5 µm; Millipore).

Após 60 dias de cultivo, os explantes foram retirados e avaliados quanto a massa fresca (MF), massa seca (MS), número de brotos (NB), teor de clorofila *a* (TCl*a*), *b* (TCl*b*) e total (TCl*t*). A massa fresca foi quantificada logo após a retirada dos frascos em balança analítica. Da mesma forma, foi obtida a massa seca, após serem submetidas ao processo de secagem em estufa a 60 °C por 72 horas. Para o número de brotos, realizou-se a contagem manual dos brotos emitidos.

A extração do teor absoluto de clorofila foi obtida utilizando 0,1 g de folha de cada tratamento e macerada utilizando-se acetona 80%. Em seguida, com auxílio de um funil coberto com uma camada de algodão, fez-se a filtragem dos materiais macerados e os acondicionou em tubos de ensaio com volume final de 10 ml, somando-se a acetona e o filtrado para cada tratamento. As absorvâncias

das clorofilas foram medidas a 646,8 nm (A₁) e 663,2 nm (A₂) utilizando espectrofotômetro de absorção molecular. As concentrações absolutas de clorofila *a*, *b* e total foram obtidas de acordo com as equações 1, 2 e 3:

Equação 1: Clorofila *a* (µg cl⁻¹ g MF=12,25 x A₂ - 2,79 x A₁ x FD)

Equação 2: Clorofila *b* (µg cl⁻¹ g MF=21,5 x A₂ - 5,10 x A₁ x FD)

Equação 3: Clorofila total (µg cl⁻¹ g MF=7,15 x A₂ - 18,71 x A₁ x FD)

onde, FD: é o fator de diluição que leva em conta o volume de solução cloroplastídica e a área da amostra foliar, que neste experimento foi igual a 100.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que houve interação significativa para os fatores em estudo. Maior massa fresca (MF) foi obtida quando os explantes foram cultivados em frasco sem filtro e sem ventilação (SF/SV) e com 15 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 1). Também se verificou que o segundo melhor resultado para massa fresca foi obtido na mesma concentração de sacarose, porém utilizando-se frasco com filtro e sem ventilação (CF/SV). Dessa forma, observou-se que o uso da ventilação forçada não foi benéfico para o incremento da massa seca de gemas de abacaxi cultivadas *in vitro*. Esses resultados diferem dos encontrados por Zobayed *et al.* (2000) em cultivos de *Eucalyptus camaldulensis*. Esses autores verificaram que maior matéria seca da parte aérea

Tabela 1 - Massa fresca (MF), massa seca (MS) e número de brotos (NB) de plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) cultivadas por 60 dias nos seguintes sistemas *in vitro*: frasco sem filtro e sem ventilação (SF/ SV); frasco com filtros e sem ventilação (CF/SV) e frascos com filtro e com ventilação (CF/CV), combinados com três concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹)

Table 1 - Fresh weight (MF), dry weight (MS) and number of buds (NB) in pineapple seedlings (*Ananas comosus*) grown for 60 days under the following systems *in vitro*: unfiltered flask with no ventilation (SF/ SV); filtered flask with no ventilation (CF/ SV) and filtered flask with ventilation (CF/ CV), combined with three concentrations of sucrose (0, 15 and 30 g L⁻¹)

Sacarose (g L ⁻¹)	Frascos								
	MF (g)			MS			NB		
	SF/ SV	CF/ SV	CF/ CV	SF/ SV	CF/ SV	CF/ CV	SF/ SV	CF/ SV	CF/ CV
0	C2,04 c	A2,81 c	B2,40 b	B0,14 b	B0,16 b	A0,21 b	A0,02 c	A0,06 c	A0,01 c
15	A4,06 a	B3,14 a	C2,84 a	A0,28 a	A0,27 a	A0,29 a	B2,98 b	A3,12 b	B1,23 b
30	A3,27 b	B2,97 b	C2,80 a	A0,25 a	A0,30 a	A0,26 ab	A5,02 a	B4,22 a	C2,96 a

*As médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, dentro de cada variável, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

*Mean values followed by the same lowercase letter in a column and uppercase letter on a line, within each variable, do not differ statistically by Tukey's test at 5% probability.

e das raízes foram obtidas quando tubos de ensaio foram aerados (com ventilação forçada).

Para a massa seca, verificou-se que as doses 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose não se diferenciaram e determinaram maior MS, em relação ao tratamento sem sacarose (0 g L⁻¹), independentemente do uso de filtro ou ventilação. Exceção foi observada no tratamento com uso de filtro e de ventilação na dose 0 g L⁻¹ de sacarose.

O maior número de brotos (5,02) foi obtido quando os explantes foram cultivados em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e em frascos SF/SV, sendo estatisticamente superiores aos demais tratamentos. O número de broto nos frascos CF/SV ou CF/CV, na dose 30 g L⁻¹ de sacarose, foram superiores aos das doses 0 e 15 g L⁻¹ de sacarose. O uso da sacarose foi, portanto, importante, pois praticamente não houve formação de brotos nos tratamentos com ausência de sacarose, independentemente das condições de vedação e ventilação. Na ausência de sacarose, os poucos brotos formados apresentaram-se pequenos e mal formados, independentemente do tipo de vedação e ventilação. Resultados semelhantes foram observados por Souza *et al.* (2011), os quais trabalhando com micropropagação de *Dioscorea multiflora*, observaram que o número de brotações aumentou com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura.

Por outro lado, Afren *et al.* (2002), enfatizam que em meio de cultura sem açúcar a contaminação pode ser facilmente controlada e as plântulas são forçadas a desenvolver seu aparelho fotossintético durante o cultivo *in vitro*, o que facilitaria a sua aclimatização *ex vitro* e a sobrevivência ao ambiente externo. Além disso, a presença

de sacarose ao meio de cultura e o emprego de frascos fechados, que não permitem trocas de ar com o ambiente externo, são responsáveis por anomalias na fisiologia e morfologia das plantas *in vitro*. Porém para abacaxi, os melhores resultados foram obtidos quando os explantes foram submetidos ao cultivo em frascos sem filtro e sem ventilação.

Neste contexto, constata-se por meio dos resultados que a concentração de sacarose foi importante para o incremento de massa e formação de número de brotos (Tabela 1), logo, houve incorporação de carboidrato, aumentando, assim, a energia disponível para as plântulas *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos em cultivos de *Pfaffia glomerata* por Skrebsky *et al.* (2004), quando utilizaram concentrações mais altas de sacarose. Faria *et al.* (2004) também verificaram que concentrações mais altas de sacarose influenciaram o crescimento e o acúmulo de biomassa das plântulas de *Dendrobium* cultivadas *in vitro*. Os carboidratos adicionados no meio de cultura forneceram energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como celulose e todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento.

Houve interação significativa entre os fatores em estudo para clorofilas *a* (TCLa), *b* (TCLb) e total (TCt). De modo geral, quando se utilizou 15 g L⁻¹ de sacarose, verificou-se que os maiores teores de clorofila foram obtidos quando os explantes foram cultivados em frascos com filtro e com ventilação (Tabela 2). Quando se utilizou 30 g L⁻¹ de sacarose, os maiores teores de clorofila *a*, *b* e total foram obtidos nos explantes cultivados em frascos com

Tabela 2 - Teores de clorofila *a* (TCLa), *b* (TCLb) e total (TCt) em µg cl g⁻¹ MF (micrograma de clorofila por grama de massa fresca) de plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) cultivadas por 60 dias nos seguintes sistemas *in vitro*: frasco sem filtro e sem ventilação (SF/ SV); frasco com filtros e sem ventilação (CF/SV) e frascos com filtro e com ventilação (CF/CV), combinados com três concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹) combinados com três concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹)

Table 2 - Levels of chlorophyll-*a* (TCLa), chlorophyll-*b* (TCLb) and total chlorophyll (TCt) in µg cl g⁻¹ MF (microgram of chlorophyll per gram of fresh weight) in pineapple seedlings (*Ananas comosus*) grown for 60 days under the following systems *in vitro*: unfiltered flask with no ventilation (SF/ SV); filtered flask with no ventilation (CF/ SV) and filtered flask with ventilation (CF/ CV), combined with three concentrations of sucrose (0, 15 and 30 g L⁻¹)

Sacarose (g L ⁻¹)	Frascos								
	TCLa			TCLb			TCt		
	SF/ SV	CF/ SV	CF/ CV	SF/ SV	CF/ SV	CF/ CV	SF/ SV	CF/ SV	CF/ CV
0	C665,9 a	A716,9 b	B708,9 b	C417,9 a	B490,9 c	A527,9 c	C1.083,9 a	B1.207,9 c	A1.236,9 c
15	A593,9 c	B721,9 b	A767,9 a	C361,9 c	A521,9 b	A675,9 a	C955,9 c	B1.244,9 b	A1.443,9 a
30	B660,9 b	A790,9 a	B706,9 c	C406,9 b	A729,9 a	B568,9 b	C1.067,9 b	A1.520,9 a	B1.275,9 b

*As médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, dentro de cada variável, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

*Mean values followed by the same lowercase letter in a column and uppercase letter on a line, within each variable, do not differ statistically by Tukey's test at 5% probability.

filtro e sem ventilação. Assim, verificou-se que a presença de filtros em frascos submetidos à ventilação estimulou o aumento do teor de clorofilas, provavelmente ocasionado pelo aumento nas trocas gasosas. Zobayed *et al.* (2002), relatam a importância da troca de ar entre ambiente e frasco e ressalta a capacidade das plântulas *in vitro* de desenvolver o aparelho fotossintético e crescerem dependentes somente da fonte de carbono endógena (ZOBAYED *et al.*, 2002). Assim, o aumento do teor de clorofila em plântulas de abacaxizeiro, no presente trabalho, pode estar associado a utilização dos filtros, uma vez que este possibilita trocas gasosas entre meio externo e interior dos frascos de cultivo.

Dignart *et al.* (2009) observaram em *Cattleya walkeriana* interações significativas entre uso de luz natural e concentrações de sacarose para teores de clorofila *a*, *b* e total. Os autores obtiveram maiores teores de clorofilas na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose em sala de crescimento, resultado que corrobora os obtidos no presente trabalho. Por outro lado, Khan *et al.* (2002) relatam que baixos níveis de sacarose no meio de cultura podem ser correlacionados com alto potencial na produção de carboidratos pelas vias fotossintéticas. Essa constatação também é importante, uma vez que os maiores teores de clorofilas também foram observados quando os explantes de abacaxizeiro

foram cultivados em frascos com filtro e com ventilação, demonstrando que é possível reduzir a quantidade de sacarose do meio de cultura, caso haja melhoria do sistema de propagação *in vitro*.

Esses resultados são relevantes e indicam que houve incorporação de carboidrato ao meio, aumentando, assim, a energia disponível para as plântulas *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos em cultivos de *Pfaffia glomerata* por Skrebsky *et al.* (2004), quando utilizaram concentrações mais altas de sacarose. Faria *et al.* (2004) também verificaram que concentrações mais altas de sacarose influenciaram o crescimento e o acúmulo de biomassa das plântulas de *Dendrobium* cultivadas *in vitro*.

CONCLUSÕES

O uso de frascos sem filtro e sem ventilação, acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose, proporcionou maior crescimento das plantas *in vitro* de abacaxizeiro;

O uso de frascos com filtro e ventilação promoveu o aumento do teor de clorofila *a*, *b*, e total, promovendo melhorias no sistema fotossintético das plântulas de abacaxizeiro.

LITERATURA CIENTÍFICA CITADA

AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOSAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, v. 90, p. 11-19, 2002.

ARAÚJO, W. F.; COSTA, S. A. A.; SANTOS, A. E. Comparação entre métodos de estimativa da evapotranspiração de referência (eto) para. **Revista Caatinga**, v. 20, n.4, p. 84-88, 2007.

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n. 3, p. 417-423, 2004.

COUCEIRO, M. A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 42, p. 278-282, 2006.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M. DE; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p.780-787, 2009.

FARIA, R. T. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 4, p. 780-783, 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, M. G. R. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 246-248, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201502.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2015.

KHAN, P. S. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of

Eucalyptus tereticornis Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 141-146, 2002.

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system**. Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2005, 315p.

MORINI, S.; MELAI, M. CO₂ dynamics and growth in photoautotrophic and photomixotrophic apple cultures. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 167-172, 2003.

PEREIRA, F. A.; CARNEIRO, M. R.; ANDRADE, L. M. **A propagação do abacaxizeiro**. 2. ed. rev. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica : Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 59 p. : il. (Coleção Plantar ; 52).

SANTANA, J. R. F de; PAIVA, R.; PEREIRA F. D.; OLIVEIRA, L. M. de. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L. **Ciência Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5 p. 1471-1477, 2004.

SOUZA, A. V. et al. Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Griseb. **Ciência Agrotecnica**, v. 35, n. 1, p. 92-98, 2011.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, v. 85, p. 587-592, 2000.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of *in vitro* tabaco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v. 161, p. 537-548, 2002.