



## **MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* EM CONDIÇÕES FOTOAUTOTRÓFICAS DO PORTA-ENXERTO DE PEREIRA SELEÇÃO '21714'**

### ***IN VITRO* MULTIPLICATION IN PHOTOAUTOTROPHIC CONDITIONS OF PEAR ROOTSTOCK SELECTION '21714'**

Samila Silva Camargo<sup>1</sup>, Aline Meneguzzi<sup>2</sup>, Mariana Mendes Fagherazzi<sup>3</sup>, Leo Rufato<sup>4</sup>

#### **RESUMO**

O uso de ferramentas biotecnológicas no melhoramento genético é importante para obtenção de novos porta-enxertos para a cultura da pereira. Dessa forma, a micropropagação é uma técnica que possibilita a obtenção de materiais vegetais com qualidade e de forma mais rápida e é facilitada se aliada com componentes adequados ao meio de cultivo que auxiliem no crescimento dos explantes, ou ainda, com a alteração do local de cultivo tradicional (sala de crescimento com luz artificial) pela propagação *in vitro* em casa de vegetação, com luz natural. Diante do exposto, busca-se com esse trabalho, verificar a influência do cultivo *in vitro* fotoautotrófico aliado a presença de sacarose ao meio de cultura durante a multiplicação de explantes de um porta-enxerto de pereira ('21714'). O estudo foi realizado no Centro de Ciências Agroveterinárias, pertencente a Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado e compreendeu um fatorial 2 x 3, com dois locais de cultivo (sala de crescimento e casa de vegetação) e três concentrações de sacarose ao meio de cultivo QL modificado (0, 15 e 30 g.L<sup>-1</sup>), totalizando seis tratamentos de cinco repetições e cinco explantes cada, com quatro folhas e de aproximadamente 3 ± 0,5 cm de comprimento. Explantes do porta-enxerto de pereira '21714', em condições *in vitro*, apresentam maior taxa de multiplicação quando cultivados em sala de crescimento e em meio de cultura com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Entretanto, em condições fotoautotróficas, sem adição de sacarose, explantes do porta-enxerto de pereira '21714', apresentam incremento no comprimento da maior brotação, comprimento médio de brotos e número de folhas.

**Palavras-chave:** micropropagação, casa de vegetação, sacarose.

## **Abstract**

*The use of biotechnologies tools in genetic improvement is important to obtain new rootstocks for pear tree cultivation. Thus, micropropagation is a technique that makes it possible to obtain plant materials with quality and in a faster way and is facilitated if allied with components suitable to the culture medium that aid in the growth of the explants, or even with the change of the location of traditional cultivation (room of growth with artificial light) by the propagation in vitro in greenhouse, with natural light. In view of the above, this work aims to verify the influence of photoautotrophic in vitro cultivation and the presence of sucrose in the culture medium during the multiplication of explants of pear tree rootstock ('21714'). The study was carried out at the College of Agriculture and Veterinary, belonging to the Santa Catarina State University (CAV-UDESC). The experiment was carried out in a completely randomized design with a 2 x 3 factorial, with two cultivation sites (growth room and greenhouse) and three concentrations of sucrose to the modified QL culture medium (0, 15 and 30 g.L<sup>-1</sup>). Totalling six treatments of five replicates and five explants each, with four leaves and approximately 3 ± 0.5 cm in length. Explants of the '21714' pear tree rootstock, under in vitro conditions, present a higher multiplication rate when cultivated in a growth room in a culture medium with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose. However, under photoautotrophic conditions, without addition of sucrose, explants of '21714' pear rootstock, present an increase in the length of the highest sprout, average length of shoots and number of leaves.*

**Keywords:** *micropropagation, greenhouse, sucrose.*

## **INTRODUÇÃO**

A utilização de mudas com elevado padrão de qualidade morfofisiológica e fitossanitária na implantação de pomares é decisiva para viabilização do sistema de produção de frutas, sobretudo em culturas em expansão, como exemplo a pereira (*Pyrus* spp.) no Sul do Brasil (HAWERROTH et al., 2010).

O estudo por novos genótipos de pereira tem crescido em função das condições edafoclimáticas do sul do país, isso ocorre porque se busca, além da adaptação destes, os que apresentem boa compatibilidade de enxertia e aliado a isso, o uso de ferramentas biotecnológicas no melhoramento genético atua como uma forma importante na obtenção de novos porta-enxertos para a cultura da pereira (RUFATO et al., 2011).

Para atender essas exigências e oferecer aos produtores mudas com maior qualidade fitossanitária, a micropropagação vem sendo uma técnica utilizada

com eficientes resultados e em comparação às técnicas de propagação tradicional, apresenta significativas vantagens, entre as quais, a possibilidade de propagar rapidamente em larga escala novos genótipos, obter plantas livres de doenças e propagar vegetativamente espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (DAMIANI & SCHUCH, 2008).

Entretanto, apesar de todas as vantagens obtidas com o uso da técnica de cultivo *in vitro*, um dos grandes entraves é o investimento inicial necessário, com reagentes, componentes ao meio de cultura e equipamentos, principalmente com a estrutura na sala de crescimento. Dentre os avanços obtidos para diminuição dos custos de produção na micropropagação, a substituição das lâmpadas fluorescentes comumente utilizadas nas salas de crescimento pela luz natural, associado ou não a redução nos níveis exógenos de sacarose, é uma das estratégias (KODYM & ZAPATA-ARIAS, 2001).

Pesquisas com níveis de sacarose são de extrema importância, pois segundo Grattapaglia & Machado (1998), esse componente atua como fonte de carbono e as plantas cultivadas *in vitro* requerem uma forma de energia exógena, pois não dispõem de condições adequadas para a realização da fotossíntese, entretanto, em algumas situações, como condições fotoautotróficas, tem sido considerada dispensável, pois os propágulos apresentam maior desempenho na ausência desse composto orgânico (DAMIANI & SCHUCH, 2008).

Os benefícios da luz natural têm sido demonstrados em cultivos fotoautotróficos para muitas espécies, como batata (KOZAI et al., 1988), arroz (SEKO & NISHIMURA, 1996), meloeiro (ALDEBERG et al., 1999), eucalipto (KHAN et al., 2003), café (NGUYEN et al., 2001), mirtileiro (DAMIANI & SCHUCH, 2008), bananeira (COSTA et al., 2009a), crisântemo (BRAGA et al., 2010) e abacaxizeiro (COUTO et al., 2014; MENDES et al., 2015). Segundo Erig & Schuch (2005) e Mendes et al. (2015), o desenvolvimento de um sistema de micropropagação fotoautotrófica surge com o objetivo de potencializar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução de seus custos, viabilizando-a comercialmente.

Contudo, a existência de informações e de entendimento sobre os efeitos advindos das modificações no ambiente de cultivo *in vitro*, em casa de vegetação, especialmente pelo uso da luz natural, sobre as plantas micropropagadas ainda são incipientes (COSTA et al., 2009b).

Diante do exposto, busca-se com esse trabalho, verificar a influência do cultivo *in vitro* fotoautotrófico, aliado a presença de sacarose ao meio de cultivo, durante a multiplicação de explantes do porta-enxerto de pereira seleção '21714'.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi realizado no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), localizado na cidade de Lages/SC, durante os meses de junho e julho de 2016, no Laboratório de Micropropagação Vegetal e em casa de vegetação, ambos pertencentes e localizados na universidade. Foram utilizados explantes do porta-enxerto de pereira '21714', já estabelecidos e cultivados *in vitro* e afim de manter a homogeneidade dos tratamentos estudados, durante a instalação do experimento, foram mantidas quatro folhas nos explantes, padronizados com aproximadamente  $3 \pm 0,5$  cm de comprimento.

A pesquisa compreendeu um delineamento inteiramente casualizado, com um fatorial  $2 \times 3$ , sendo dois locais de cultivo dos explantes e três concentrações de sacarose no meio de cultura QL modificado (LEBLAY et al., 1991), totalizando seis tratamentos de cinco repetições com cinco explantes cada.

O meio de cultura (QL modificado), foi composto por 100% dos sais e nutrientes protocolados para a cultura, com a adição de sacarose conforme os tratamentos (0, 15 e 30 g.L<sup>-1</sup>), 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e o pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de 6 g.L<sup>-1</sup> do agente solidificante ágar. Foram utilizados frascos de 250 mL com 30 mL de meio de cultura e posteriormente, foi realizada a autoclavagem a 120°C e 1,5 atm, por 20 minutos.

Os distintos ambientes para multiplicação dos explantes foram: sala de crescimento, em laboratório de micropropagação, com condições controladas de

fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e intensidade luminosa de  $27 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e casa de vegetação com luz natural e temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , obtida através do uso de ventilador acoplado a um sensor de temperatura que promove o aquecimento ou resfriamento do ambiente.

Após dois meses de cultivo, as variáveis analisadas foram: comprimento da maior brotação e comprimento médio de brotações (cm), número de brotações e folhas e intensidade de calos, com uma escala de 0 a 2, onde 0: ausência de calos, 1: presença de calos pequenos e 2: presença de calos grandes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias, quando significativas, foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), sendo os dados numéricos transformados em raiz quadrada de  $x+0,5$  e a escala referente a intensidade de calos, em  $\log(x+K)$ , onde  $x$ , é a média obtida de cada variável e  $K$  é igual a 1.

#### Resultados e discussão

Para todas as variáveis estudadas na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto '21714', houve interação entre os fatores local de cultivo e concentração de sacarose ao meio de cultura.

Na tabela 1 são demonstradas as variáveis comprimento da maior brotação e número médio de brotações. Para o comprimento do broto, o tratamento que se destacou aos demais foi a multiplicação em sala de crescimento, com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose (4,55 cm), porém, não diferiu estatisticamente dos explantes cultivados em casa de vegetação, na ausência de sacarose ou com  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , com médias de 3,09 e 3,24 cm, respectivamente. Esses resultados contrariam aos estudos com bananeira de Costa et al. (2009), onde a maior média de brotações foi obtida sob ambiente artificial nas diferentes cultivares utilizadas, independente da concentração de sacarose avaliada, assim como, Hawerth et al. (2010), que observaram que não houve efeito das concentrações de sacarose presentes no meio de cultura sobre o número de brotações e número de folhas de explantes de pereira 'Abate Fetel'.

**Tabela 1.** Comprimento da maior brotação (cm) e número de brotações, em explantes do porta-enxerto de pereira '21714' multiplicados *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e locais de cultivo. Lages - SC, 2017.

Sacarose	Comprimento maior brotação				Número de brotações			
	Casa		Sala crescimento		C		sa	
Sala crescimento	-	vegetação	vegetação	Sala crescimento	a	vegetação	vegetação	
0 g	3,00	Ab*	3,09	Aa	1,71	Ab	1,71	Ab
15 g	3,33	Ab	3,24	Aa	3,49	Aa	2,12	Ba
30 g	4,55	Aa	3,29	Ba	3,68	Aa	1,98	Bab
CV (%)	9,76				8,05			

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, dentro de cada tratamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Como visualizado na tabela 1, nos explantes cultivados em sala de crescimento, com luz artificial, ocorreu uma maior formação de brotações novas, independentemente da concentração de sacarose (15 ou 30 g.L<sup>-1</sup>), sendo estes tratamentos superiores aos com ausência do açúcar ou em casa de vegetação. Isso pode ser justificado pelo fato dos carboidratos adicionados no meio de cultura fornecerem 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 (MENDES et al., 2015).

Aliado a esses resultados, em estudos com abacaxizeiro, Silva et al. (2012) concluíram que a luz natural na fase de multiplicação reduziu o número de brotações para a espécie e não mostrou efeito positivo para essa variável e, em relação a presença da sacarose, Souza et al. (2011), os quais trabalharam com micropropagação de *Dioscorea multiflora*, observaram que o número de brotações aumentou com as concentrações mais altas no meio de cultura. Corroborando também, em pesquisas com multiplicação fotoautotrófica de pereira 'Abate Fetel', Hawerroth et al. (2010) verificaram que o número médio de brotações apresentou

resposta quadrática ao aumento da sacarose no meio de cultura e a concentração de 23,3 mg.L<sup>-1</sup> proporcionou máxima resposta para essa variável.

Tanto para a variável comprimento médio dos brotos como para o número de folhas, a presença de luz artificial em sala de crescimento proporcionou um maior comprimento médio de brotos, assim como, número de folhas, nas concentrações de sacarose 15 e 30 g.L<sup>-1</sup>, entretanto, não diferindo do tratamento sem sacarose em casa de vegetação, para as duas variáveis (Tabela 2). Em estudos com a cv. Abate Fetel, Hawerth et al. (2010), concluíram também, que tanto para o comprimento médio de brotações e conseqüentemente, para a massa fresca total dos brotos, a concentração de sacarose apresentou efeito significativo na multiplicação destes explantes.

**Tabela 2.** Comprimento médio de brotos (cm) e número de folhas, em explantes do porta-enxerto de pereira '21714' multiplicados *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e locais de cultivo. Lages - SC, 2017.

	Comprimento médio brotos		Número de folhas					
	Sacaro se o	Sala cresciment o	Casa vegetação	Sala cresciment o	Casa vegetaçã o			
0 g	1,00	Ab*	1,00	Aa	3,19	Ab	3,31	Aa
15 g	2,60	Aa	1,33	Ba	8,56	Aa	3,57	Ba
30 g	2,86	Aa	1,21	Ba	9,02	Aa	3,65	Ba
CV (%)	8,05			8,54				

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, dentro de cada tratamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Assim como os resultados encontrados nesse estudo, Damiani & Schuch (2008) ao trabalharem com mirtilheiro, verificaram que a multiplicação dos explantes em condições fotoautotróficas (luz natural e ausência de sacarose) não alterou o comprimento médio das brotações, pois os resultados obtidos não diferiram estatisticamente daqueles obtidos pelo método convencional (presença de sacarose e luminosidade controlada).

Assim como verificado no presente estudo, para as variáveis comprimento médio de brotos e número de folhas, a sacarose é um fator limitante e importante

fonte de carbono para o cultivo *in vitro*, em condições de luz artificial (DAMIANI & SCHUCH, 2008; SILVA et al., 2012). Faria et al. (2006) observaram maior crescimento *in vitro* na presença de sacarose, já que favorece um maior desenvolvimento das brotações *in vitro*, já que é uma fonte de carbono prontamente disponível, entretanto, em cultivos fotoautotróficos, tem sido considerada dispensável, pois, os propágulos apresentam maior desempenho na ausência desse composto orgânico (SILVA et al., 2012). De acordo com Haverroth et al. (2010), tais condições podem maximizar a produção de fotoassimilados pela fotossíntese, o que favorece a diminuição da sacarose do meio de cultura que atua como fonte de carboidratos para a formação de novos explantes.

A interação entre ambos os fatores estudados também foi verificada para as variáveis intensidade de calos e contaminação fúngica dos explantes (Tabela 3).

**Tabela 3.** Intensidade de calos (escala de 0 a 2) e contaminação fúngica, em explantes do porta-enxerto de pereira '21714' multiplicados *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e locais de cultivo. Lages - SC, 2017.

Sacarose	Intensidade de calos			Contaminação fúngica		
	Sala crescimento	Casa vegetação	Casa vegetação	Sala crescimento	Casa vegetação	Casa vegetação
0 g	1,00 Ac*	1,00 Ab	1,00 Ab	1,71 Ba	2,86 Ab	2,86 Ab
15 g	1,46 Ab	1,07 Bab	1,07 Bab	1,70 Ba	2,87 Ab	2,87 Ab
30 g	1,60 Aa	1,19 Ba	1,19 Ba	1,68 Ba	2,93 Aa	2,93 Aa
CV (%)	8,81			1,29		

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, dentro de cada tratamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

A partir da escala de 0 a 2, verificou-se uma maior intensidade calogênica na base dos explantes na presença de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose na luz artificial, em sala de crescimento. Essa é uma variável de importância durante a avaliação, pois de acordo com Santana et al. (2008), quando não há formação calogênica, em termos de qualidade, há uma tendência em produzir um sistema radicular mais completo e funcional, com formação inclusive de raízes secundárias, já que os calos podem dificultar a conexão do sistema vascular entre o caule e raiz.

E em função das condições não controladas, como existem em um laboratório com sala de crescimento, a maior ocorrência de contaminações fúngicas foi constatada em casa de vegetação, na concentração de sacarose mais alta (30 g.L<sup>-1</sup>). Silva et al. (2008) explicam que em casa de vegetação pode haver maior crescimento e desenvolvimento *in vitro*, diminuindo o nível de contaminação, o que simplifica os meios de cultura, uma vez que permite a retirada de certos reguladores de crescimento e compostos orgânicos e promove rápido e vigoroso desenvolvimento das plantas durante a aclimatização. Com isso, se compreende o porquê da maior contaminação em casa de vegetação nos tratamentos com a concentração mais alta da fonte de açúcar, pois de acordo com Damiani & Schuch (2008) se pode reduzir o índice de contaminação microbiana dos explantes, com a remoção da sacarose do meio de cultura.

Afrren 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.

Em suma, de acordo com os dados obtidos nesse estudo e com outros relacionados a outras espécies, a micropropagação fotoautotrófica, ou seja, na ausência de sacarose e aumento de irradiação, tem apresentado algumas vantagens, quando comparada aos sistemas convencionais de micropropagação (ROCHA et al., 2007; COSTA et al., 2009b; BRAGA et al., 2009).

## CONCLUSÕES

Explantes do porta-enxerto de pereira '21714', em condições *in vitro*, apresentam maior taxa de multiplicação quando cultivados em sala de crescimento em meio de cultura com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Em condições fotoautotróficas, sem adição de sacarose, explantes do porta-enxerto de pereira '21714', apresentam

incremento no comprimento da maior brotação, comprimento médio de brotos e número de folhas.

## REFERÊNCIAS

ADELBERG, J. et al. Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, n. 2, p. 95-104, 1999.

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.

BRAGA, F. T. et al. Luz natural e sistemas de vedação na propagação *in vitro* de crisântemo cv. Rage: alterações anatômicas e fisiológicas. **Plant Cell Culture Micropropagation**, v. 6, n. 2, p. 83-89, 2010.

BRAGA, F. T. et al. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 502-508, 2009.

COSTA, F. H. S. et al. Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 303-311, 2009a.

COSTA, F. H. S. et al. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, v. 39, p. 742-748, 2009b.

COUTO, T. R. et al. Eficiência fotossintética e crescimento de genótipos de abacaxizeiro cultivados *in vitro* em diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 459-466, 2014.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 482-487, 2008. ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Plassiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 02, p. 267-270, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. p.183-260.

HAWERROTH, F. J. et al. Multiplicação fotoautotrófica *in vitro* de pereiras 'Abate Fetel'. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1439-1443, 2010.

KHAN, S. V. et al. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 67-71, 2001.

KOZAI, T.; KOYAMA, Y.; WATANABE, I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. **Acta Horticulturae**, v. 230, p. 121-127, 1988.

LEBLAY, C. et al. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, p. 99- 105, 1991.

MENDES, P. S. et al. Cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 9, n. 2, p. 202- 207, 2015.

NGUYEN, Q. T. et al. Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, n. 3, p. 215-225, 2001.

ROCHA, H. S. et al. Propagação *in vitro* de bananeira 'Prata anã (AAB)': intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 3, n. 1, p. 10-17, 2007.

RUFATO, A. R. et al. Manual cross-pollination, fruit set and development in pear. **Acta Horticulturae**, n. 918, p. 749-751, 2011.

SANTANA, J. R. F. et al. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008.

SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effect of CO<sub>2</sub> and light on survival and growth of rice regenerants growth *in vitro* on sugar-free medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, n. 3, p. 257-264, 1996.

SILVA, A. B. et al. Luz natural, sacarose e fitorreguladores na anatomia foliar e crescimento *in vitro* de abacaxizeiro micropropagado. **Plant Cell Culture Micropropagation**, v. 8, n. 1-2, p. 1-9, 2012.

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