

# AVALIAÇÃO DA CONSISTÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum* Schum.)<sup>1</sup>

## EVALUATION OF CULTURE MEDIUM CONSISTENCIES ON PROLIFERATION OF *IN VITRO* PROPAGATED ELEPHANTGRASS (*Pennisetum purpureum* Schum.)

MARINES MARLI GNIECH KARASAWA<sup>2</sup>, JOSÉ CARDOSO PINTO<sup>3</sup>, ANTÔNIO VANDER PEREIRA<sup>4</sup>, JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Parte integrante da Dissertação de Mestrado intitulada “Revigoração de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) submetidas à termoterapia e cultura de tecidos.

<sup>2</sup>Engenheira Agrônoma, Mestre em Zootecnia – Forragicultura e Pastagens – Av. Pádua Dias, 11 – 13418-970 – Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas – ESALQ/USP – mmgkaras@esalq.usp.br.

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo – Professor Adjunto IV – Bolsista do CNPq – 37200-000

<sup>4</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor – Embrapa de Gado de Leite – 36038-330 – Juiz de Fora, MG.

<sup>5</sup>Engenheiro Agrônomo – Professor Titular, PhD – Bolsista CNPq – 37200-000 – 37200-000.

### RESUMO

Objetivo-se com este estudo definir a consistência do meio de cultura que proporciona o maior número de brotos, raízes e altura do explante para propagação *in vitro* das cultivares Mineiro e Pioneiro de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). Foram utilizados explantes secundários, obtidos por cultura de meristemas, individualizados com 30 mm de comprimento e transferidos para o meio básico MS, suplementado com as vitaminas WPM, 3% de sacarose e 4,44 e 8,88 µM de BAP, para as cultivares Mineiro e Pioneiro, respectivamente. Os tratamentos foram diferentes consistências do meio de cultura, sendo utilizado meio de cultura líquido, com 0,7% de ágar e 0,2% de Phytigel®. As avaliações foram realizadas durante 49 dias. A evolução do número de brotações e de raízes por explante nas cultivares Mineiro e Pioneiro foram semelhantes durante as sete semanas de avaliação, sendo encontrado maior número no meio de cultura contendo Phytigel®, intermediário no meio suplementado com ágar e inferior no meio líquido. Por outro lado, o crescimento em altura, das cultivares estudadas, foi semelhante durante as sete semanas para todos os meios de cultura testados. Ao final da sétima semana, o maior número de brotações, foi no meio de cultura suplementado com 0,7% de ágar e 0,2% de Phytigel®. A maior produção de raízes foi no meio de cultura suplementado com 0,2% de Phytigel®. Para o crescimento do explante em altura, não foi verificado nenhum efeito significativo para os fatores avaliados.

**Termos para indexação:** *Pennisetum purpureum*, cultura de tecidos, micropropagação, forrageiras.

### ABSTRACT

The objective this study was to define the consistency of the culture medium that promotes the highest number of shoot and roots and explant height, for their *in vitro* propagation of “Mineiro” and “Pioneiro” elephant grass (*Pennisetum*

*purpureum* Schum.) cultivars. Secondary (30 mm long) elephant grass explants, obtained through meristem culture, were transferred to a basic MS medium, supplemented with WPM vitamins, 3% sucrose and 4.44 and 8.88 mM benzylaminopurine (BAP), for the cultivars Mineiro and Pioneiro, respectively. The treatments consisted of three different consistencies of culture medium (liquid, with 0.7% agar and 0.2% Phytigel®). The evaluations were conducted during 49 days. The number of shoots and roots per explant for both cultivars were similar during the seven weeks of evaluation. Higher number of shoots and roots were obtained in culture medium supplemented with Phytigel®, intermediate with agar and lowest with liquid medium. On other hand, for explant growth in height the studied cultivars were similar during the tested period in all used medium. At end of the seventh week of culture, higher number of shoot was observed on culture medium supplemented with 0.7% agar and 0.2% Phytigel®. The highest production of roots occurred in culture medium supplemented with 0.2% Phytigel®. For the explant growth in height, no significant effect was verified for any of the factors evaluated.

**Index terms:** *Pennisetum purpureum*, tissue culture, micropropagation, forrage.

### INTRODUÇÃO

A micropropagação, por meio do cultivo de meristemas *in vitro*, tem sido muito utilizada na cultura de tecidos objetivando a propagação clonal, preservação de germoplasma e a eliminação de contaminações causadas por patógenos como vírus, fungos endofíticos, bactérias e micoplasmas, adquiridos durante a propagação assexuada (KARTHA, 1986; NEHRA & KARTHA, 1994).

(Recebido em 01 de outubro de 2004 e aprovado em 20 de outubro de 2005)

Para que o crescimento, a proliferação e a manutenção dos explantes *in vitro* sejam bem sucedidos, torna-se necessário o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação, em que sejam definidas as quantidades adequadas dos elementos necessários, no meio de cultura, especificamente, para cada espécie ou cultivar. O meio de cultura deve suprir os tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com macro e micronutrientes e carboidratos que forneçam energia e carbono para a biossíntese de aminoácidos, proteínas, polissacarídeos estruturais e todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células. A consistência física do meio de cultura também exerce efeito fundamental na morfogênese e no crescimento das brotações, podendo causar sérios transtornos no desenvolvimento esperado do explante se as suas exigências básicas não forem atendidas. Em geral, os explantes são mantidos em meio sólido, usualmente suplementado com 0,6 a 0,8% de ágar (CONSTABEL & SHYLUK, 1994) e gelrite, ambos polissacarídeos complexos (THORPE, 1994). No entanto, para algumas culturas, o meio líquido, com ou sem agitação, tem proporcionado melhores resultados.

Cada cultura, quando submetida a uma mesma composição de meio de cultura, alterando-se apenas a sua consistência física, pode apresentar comportamento completamente distinto sobre a taxa de crescimento de um explante (GEORGE, 1993). O meio de cultura solidificado com ágar poderá causar problemas na morfogênese de certas culturas devido à presença de substâncias inibidoras em sua composição que poderão diminuir a taxa de crescimento e aumentar a presença de exsudatos próximos aos explantes. Também pode ficar aderido às raízes, causando transtorno na lavagem dessas substâncias antes do transplante no solo. Os géis, por sua vez, são gomas que resistem à degradação enzimática, não são tóxicas e têm promovido respostas superiores em muitas culturas herbáceas, em comparação ao meio de cultura suplementado com ágar (CALDAS et al., 1990). Por outro lado, o meio de cultura

líquido pode, às vezes, ajudar a resolver alguns problemas encontrados nos meios solidificados como o acúmulo de exsudatos fenólicos, folhas marrons ou baixo crescimento. Normalmente, as culturas em meio líquido devem ser aeradas pela agitação ou outro processo, porém quando os explantes tiverem tamanho igual ou superior a 2,5 cm de comprimento a sua base pode ser imersa em meio líquido, não sendo mais necessária a agitação, pois a parte superior fica exposta ao ar (KYTE & KLEYN, 1996).

Em dados da literatura, verifica-se que o sucesso no cultivo *in vitro* pode estar condicionado à natureza física do meio de cultura. Mellor & Stace-Smith (1969) obtiveram o melhor resultado em meio de cultura líquido, em relação ao sólido, na cultura de meristemas de batata. Para Coelho (1999), o meio de cultura líquido foi mais favorável que o ágar, ágar lavado e o Phytigel® para o desenvolvimento de embriões de sucupira branca. Hammerschlag (1988) verificou crescimento superior com pêssego no meio de cultura líquido, enquanto Lee et al. (1986) obtiveram o maior número de raízes por explantes de *Liquidambar styraciflua* L. em meio líquido. Por outro lado, Bhagyalakshmi & Singh (1988) constataram maior eficiência do meio sólido no cultivo de *Zingiber officinale* Rosc.. Já Finch et al. (1992) verificaram comportamento diferenciado para espécies de arroz, dos quais o Phytigel® proporcionou os melhores resultados para *Oryza longistaminata* A. Chev. & Roehrich., *O. rufipogon* Griff. e *Leersia perrieri* (A. Camus) Launert., o meio contendo agarose apresentou melhores brotações em *Leptochloa fusca* (L.) Kunth. e *O. officinalis* Wall., e o meio suplementado com ágar mostrou resultado superior em *O. granulata* Nees.

Objetivou-se com este trabalho, definir a consistência física do meio de cultura, com concentração pré-definida de benzilaminopurina (KARASAWA et al., 2002), que proporciona o maior número de brotações, número de raízes e altura do explantes *in vitro* das cultivares Mineiro e Pioneiro de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.).

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, no período de julho de 1999 a setembro de 2000.

Para a condução dos experimentos, utilizaram-se meristemas apicais de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cvs. Mineiro e Pioneiro, submetidas ao tratamento da termoterapia, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante (BAGCE) da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco – MG. Os colmos obtidos no BAGCE foram fracionados em estacas com 3 a 4 gemas e plantados em sacos plásticos com 5 litros de solo cada uma na segunda quinzena de julho de 1999 e conduzidos até suas brotações atingirem 20 cm. Uma vez atingida a altura mínima, foi iniciado o tratamento da termoterapia na casa-de-vegetação da Embrapa Gado de Leite, cuja temperatura ambiental foi controlada, variando em torno de 30 e 45°C (noite e dia, respectivamente). O tratamento da termoterapia, realizado para eliminação de vírus do tecido meristemático, foi conduzido por um período de 20 dias, após o qual foram coletados os 20 cm superiores da planta, contendo os meristemas apicais, que foram preparados para a desinfestação.

O preparo do material consistiu na retirada de 75% das lâminas foliares, e a sua submersão em solução de hipoclorito de sódio 1%, sendo agitado por 20 minutos e, depois enxaguado três vezes com água destilada estéril em ambiente asséptico. Com auxílio de microscópio estereoscópico, em capela de fluxo de ar laminar, os meristemas apicais foram retirados e inoculados em tubos de ensaio, de 25 x 150 mm, contendo 15 ml do meio de cultura.

Inoculado o meristema, o frasco foi fechado e levado para a sala de crescimento, onde foi mantido sob condições de iluminação de 2000 lux e temperatura constante de 25±2°C. O material que se desenvolveu em meio de cultura foi multiplicado até atingir o número de plantas necessário para uma posterior avaliação.

Explantos secundários individualizados, com 3 cm de comprimento, foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas do meio WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980) e 3% de sacarose, sendo utilizados meios de cultura líquido, sólido com 0,7% de ágar Sigma® ou com 0,2% de Phytigel® e suplementados com 4,44 e 8,88 mM de BAP, respectivamente, para as cultivares Mineiro e Pioneiro conforme definido por Karasawa (2001) e Karasawa et al. (2002), como sendo a melhor concentração para a multiplicação desses cultivares. O pH do meio foi corrigido para 5,7±0,1. Os tubos foram fechados e autoclavados a 120°C, um dia antes da inoculação. No meio líquido, os explantes tinham como suporte pontes feitas com papel de filtro.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com cinco repetições, sendo os tratamentos dispostos em um esquema fatorial 2 x 3 (PETERSEN, 1994), consistindo de duas cultivares (Mineiro e Pioneiro) e três tipos de consistências de meio de cultura (líquido, solidificado com ágar e solidificado com Phytigel®). Cada parcela foi constituída por três tubos de ensaio, com um explante/tubo.

Foram avaliados o número de brotações, raízes e altura dos explantes a cada sete dias durante sete semanas, totalizando 49 dias, sendo assim considerado o incremento do número de brotações, número raízes e altura dos explantes. Para avaliar a melhor consistência do meio de cultura foram tomados resultados das médias finais aos 49 dias para cada meio e cada cultivar estudada.

Os dados dos parâmetros avaliados foram analisados pelo programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2000), utilizando-se os esquemas tradicionais de análise de variância. Quando houve efeito significativo de consistência de meio, usou-se o teste de F para comparar as cultivares e, quando houve efeito para os tipos de consistências do meio de cultura, utilizou-se o teste de Scott-Knott.

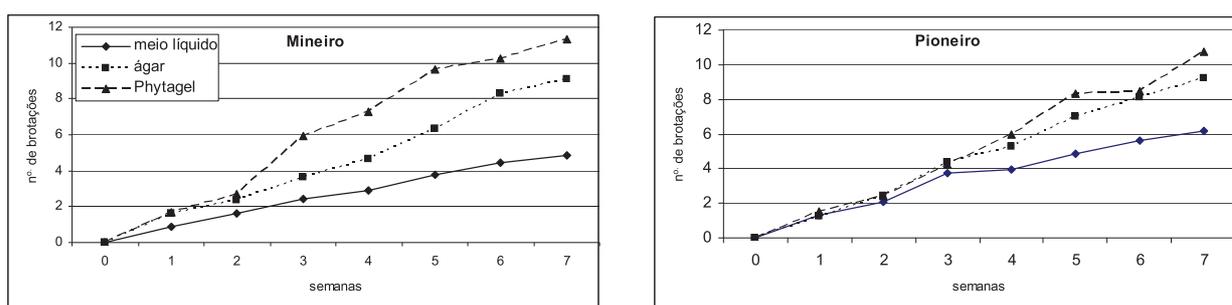
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento no número de brotações (Figura 1) ocorreu de forma gradual, para ambas as cultivares estudadas, ao longo de 49 dias, não sendo possível prosseguir o estudo após esse período devido à senescência do material. Verificou-se que o meio de cultura contendo Phytigel® apresentou um número de brotações superior para todas as avaliações a partir da segunda avaliação na cv. Mineiro, e a partir da quarta avaliação na cv. Pioneiro. O meio de cultura suplementado com ágar mostrou-se intermediário ao passo que o meio líquido apresentou os menores valores em todo o período de avaliação.

Ao final das avaliações, o meio de cultura líquido apresentou número de brotos por explante inferior ( $P < 0,05$ ) aos meios contendo ágar e Phytigel®, nas cvs. Mineiro e Pioneiro, dos quais os dois últimos não diferiram entre si (Tabela 1). As cultivares Mineiro e Pioneiro apresentaram 9,13 e 11,33, e 9,20 e 10,73 brotos/explante, após 49 dias, respectivamente, em ágar e Phytigel® na concentração de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP para a cv. Mineiro e de 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP para a cv. Pioneiro. Pelos resultados deste estudo, verificou-se uma melhor adaptação do capim-elefante ao meio de cultura sólido, em relação ao meio líquido. Esse comportamento pode ser explicado com base em um possível excesso de umidade do meio de cultura líquido em relação aos meios sólidos, ou pelo potencial osmótico

menos negativo do meio líquido em relação aos meios solidificados com ágar e Phytigel®, ocasionando maior perda de água da célula e promovendo assim um estresse osmótico (GEORGE, 1993) ou ainda por excesso de macro e micronutrientes, já que o meio líquido possuía a mesma quantidade do meio sólido. Caldas et al. (1990) alertam que, possivelmente, o meio de cultura líquido necessita menores quantidades de macro e micronutrientes pelo fato de o gradiente desses elementos se estabelecer mais facilmente em relação às necessidades nutricionais da planta. Os valores obtidos para o número de brotações ao final deste estudo foram superiores aos de Zanette et al. (1988) que, utilizando a técnica da micropropagação por cultura de meristemas no capim-elefante variedade Napier, obtiveram apenas oito brotos de capim-elefante na concentração de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP após 25 e 35 dias.

A produção de raízes (Figura 2) até a quarta semana foi semelhante para ambas as cultivares. A partir de então foram verificados incrementos expressivos no meio contendo Phytigel®, indicando uma possível escassez de nutrientes minerais, pois ao se analisarem o aumento do número de brotações e o crescimento em altura, verificou-se crescimento constante. Esse comportamento fisiológico de estimular a produção de raízes é comum em plantas sempre que ocorre algum tipo de escassez no substrato. Os meios líquido e suplementado com ágar apresentaram uma mesma tendência para número de brotos



**FIGURA 1** – Evolução do número de brotações de capim-elefante cvs. Mineiro e Pioneiro, durante os 49 dias, em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

e para o crescimento em altura, no entanto o estímulo para o sistema radicular do meio de cultura líquido foi muito menor, para ambas as cultivares, possivelmente isso foi devido ao estresse pelo excesso de umidade, no caso do meio líquido, e à presença de produtos tóxicos para a raiz, no caso do meio contendo ágar (CALDAS et al., 1990). Esse fato é importante, pois demonstra que a propagação *in vitro* poderá ser seriamente afetada quanto à proliferação de brotações laterais pela inibição do sistema radicular o qual impede a absorção dos nutrientes minerais do meio de cultura.

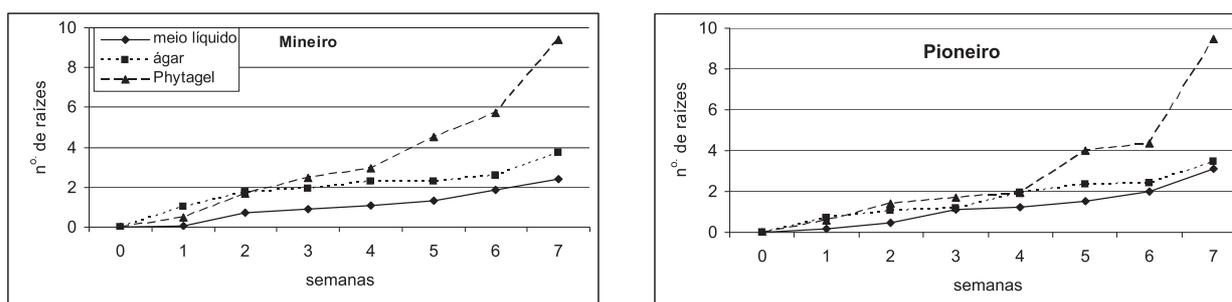
Ao final das avaliações, a produção de raízes nas cvs. Mineiro e Pioneiro foi semelhante, e os meios de cultura líquidos e o suplementado com ágar tiveram produção bastante inferior em relação ao meio de cultura contendo Phytigel® (Tabela 2). Houve diferença significativa entre

os números de raízes dos meios de cultura líquido e suplementado com ágar, em relação ao meio de cultura suplementado com Phytigel®. Como o Phytigel® é uma goma que não contém substâncias tóxicas em sua composição (CALDAS et al., 1990), justifica-se a obtenção dos melhores resultados na produção de raízes. Uma vantagem verificada nesse processo é que, mesmo quando submetido a concentrações de BAP, ocorre a formação de número satisfatório de raízes. Sabe-se que o BAP é uma citocinina cujas principais características são a quebra da dominância apical e a inibição da formação de raízes, tornando necessário, para a maioria das culturas, a sua eliminação do meio de cultura e, às vezes ainda, a inclusão de reguladores de crescimento que estimulem a formação de raízes. Zanette et al. (1988) também avaliaram a emissão

**TABELA 1** – Número de brotações por explante de capim-elefante, provenientes das cvs. Mineiro e Pioneiro em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

Consistência do meio de cultura	Número de Brotações/Explante	
	Cv. Mineiro	Cv. Pioneiro
Líquido	4,86 Ba	6,20 Ba
Ágar	9,13 Aa	9,20 Aa
Phytigel®	11,33 Aa	10,73 Aa
CV (%)	23,80	

Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna, (Teste de Scott-Knott, 5%) e minúscula na linha, (Teste de F, 5%) diferem entre si.



**FIGURA 2** – Evolução do número de raízes dos explante de capim-elefante cvs. Mineiro e Pioneiro, durante os 49 dias, em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

de raízes na variedade Napier e obtiveram 85% de enraizamento, entretanto não citam o número de raízes por explante. O resultado foi inferior ao obtido neste trabalho, no qual 100% dos explantes apresentaram raiz de morfologia e ramificação normais.

O crescimento em altura dos explantes das cvs. Mineiro e Pioneiro de capim-elefante (Figura 3) mostrou-se semelhante durante todas as avaliações, para os três tipos de meio de cultura. Aparentemente a forma física do meio não afetou o crescimento em altura dos cultivares.

Na avaliação final as alturas dos explantes das cvs. Mineiro e Pioneiro de capim-elefante mostraram-se semelhantes ( $P < 0,05$ ) em todos os tipos de substratos estudados (Tabela 3). Pode-se observar que os explantes da cv. Mineiro cresceu, em média, 1,80 cm e os da cv. Pioneiro, 1,54 cm, em 49 dias, o que foi considerado pouco, pois o material foi inoculado com 3,0 cm. Possivelmente,

isso ocorreu pela presença da citocinina BAP nas concentrações de 4,44 e 8,88 M, para as cvs. Mineiro e Pioneiro, respectivamente. As concentrações utilizadas foram determinadas em estudo anterior e consideradas ideais para se obter um maior rendimento de brotações para cada uma dos cultivares (KARASAWA, 2001; KARASAWA et al., 2002).

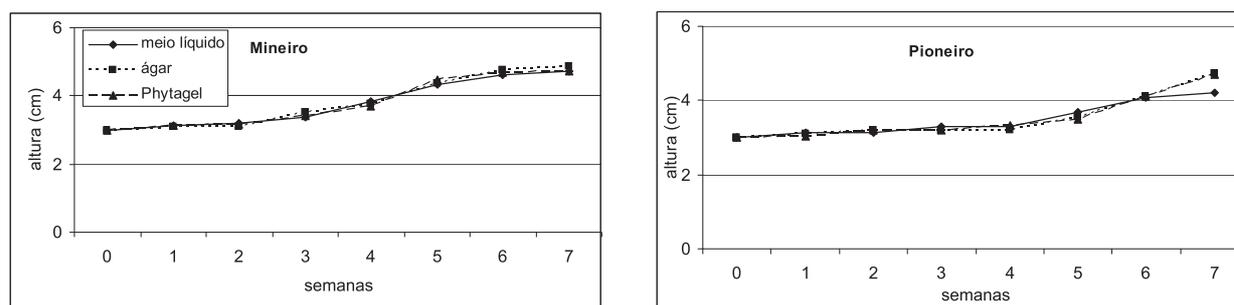
As citocininas pertencem ao grupo de fitorreguladores que atuam na quebra da dominância apical, inibindo o crescimento apical, e estimulando a divisão celular promovendo a proliferação de brotações laterais, o que justifica o pequeno crescimento em altura dos explantes.

Os propágulos obtidos no final desse processo apresentaram excelente qualidade fitossanitária e vigor, com 100% de pegamento ao serem transferidos para a aclimatização, não sendo detectado variação entre os tratamentos.

**TABELA 2** – Número de raízes dos explantes das cvs. Mineiro e Pioneiro em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

Consistência do meio de cultura	Número de Raízes/Explante	
	Cv. Mineiro	Cv. Pioneiro
Líquido	2,39 Ba	3,13 Ba
Ágar	3,73 Ba	3,46 Ba
Phytigel®	9,40 Aa	9,46 Aa
CV (%)	37,80	

Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna, (Teste de Scott-Knott, 5%) e minúscula na linha, (Teste de F, 5%) diferem entre si.



**FIGURA 3** – Evolução da altura dos explante de capim-elefante cvs. Mineiro e Pioneiro, durante os 49 dias, em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

**TABELA 3** – Altura do explante principal (cm) das cvs. Mineiro e Pioneiro em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

Consistência do meio de cultura	Altura do Explante Principal	
	Cv. Mineiro	Cv. Pioneiro
Líquido	4,72 Aa	4,73 Aa
Ágar	4,95 Aa	4,22 Aa
Phytigel	4,72 Aa	4,68 Aa
CV (%)	14,86	

Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna, (Teste de Scott-Knott, 5%) e minúscula na linha, (Teste de F, 5%) diferem entre si.

### CONCLUSÕES

Maior número de brotações, nas cultivares Mineiro e Pioneiro de capim-elefante são obtidas nos meios de cultura suplementados com ágar e Phytigel®.

Para maior produção de raízes, recomenda-se o uso de Phytigel® no meio de cultura.

Para se obter maior proliferação de brotos e boa produção de raízes, nas cultivares Mineiro e Pioneiro, recomenda-se utilizar meio de cultura preparado com Phytigel®.

O crescimento em altura não é afetado pela consistência do meio de cultura.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHAGYALAKSHMI, G.; SINGH, N. S. Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with a high yield oleoresin. **Journal of Horticultural Science**, London, n. 63, p. 321-327, 1988.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos**. Brasília, DF: ABC/TP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 37-70.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação in vitro de sucupira branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.)**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CONSTABEL, F.; SHYLUK, J. P. Initiation, nutrition, and maintenance of plant cell and tissue culture. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 3-15.

FERREIRA, D. F. **Programa de análise estatística SISVAR**. [S.l.: s.n.], 2000.

FINCH, R. P.; BASET, A.; SLAMET, I. H.; COCKING, E. C. *In vitro* shoot culture of wild oryzae and other grass species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 31-39, 1992.

GEORGE, F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. London: Exegetics, 1993. 574 p.

HAMMERSCHLAG, F. Factors affecting establishment and growth of peach shoots in vitro. **Horticultural Science**, London, n. 17, p. 85-86, 1988.

KARASAWA, M. M. G. **Revigoroamento de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) submetidas a termoterapia e cultura de tecidos**. 2001. 130 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

KARASAWA, M. M. G.; PINTO, J. E. B. P.; PINTO, J. C.; PEREIRA, A. V. Proliferação de capim-elefante em diferentes concentrações de reguladores de crescimento e consistências de meio de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1243-1251, nov./dez. 2002.

- KARTHA, K. K. Production and indexing of disease free plants. In: WHITHERS, L. A.; ANDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1986. p. 219-238.
- KYTE, L.; KLEYN, J. **Plants from test tubes**: an introduction to micropropagation. 3. ed. Hong Kong: Timber, 1996. 240 p.
- LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. The effect of agar vs. liquid medium on rooting in tissue-cultured sweetgum. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 2, p. 317-318, Feb. 1986.
- LLOYD, G. B.; McCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **Proceedings of the international Plant Propagators Society**, Boulder, v. 30, p. 421-437, 1980.
- MELLOR, F. C.; STACE-SMITH, R. Development of excised potato buds in nutrient medium. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, n. 47, p. 1617-1621, 1969.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with *tabacco* tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.
- NEHRA, N. S.; KARTHA, K. K. Meristem and shoot tip culture: requirements and applications. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 37-70.
- PETERSEN, R. G. **Agricultural fields experiments**: design and analysis. New York: M. Dekker, 1994. 409 p.
- THORPE, T. A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 17-36.
- ZANETTE, F.; PAILO, W. N.; MORAES, A. Obtenção de mudas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. var. napier) por cultura de meristemas. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 10, n. 1/2, p. 175-177, 1988.