



ANTIOXIDANTES E AUSÊNCIA DE LUZ NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Schomburgkia crispa* Lindl

Ana Paula Rissato de Souza¹, Shara Rodrigues da Silva¹, José Carlos Sorgato²,
Jackeline Schultz Soares³, Yara Brito Chaim Jardim Rosa⁴

1. Discentes de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais/FCBA da Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD (email).
2. Discente do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias/FCA da UFGD (jc_sorgato@hotmail.com).
3. Discente do Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul/ UEMS.
4. Docente da FCA da UFGD. Caixa Postal 533, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

As técnicas de cultivo *in vitro* são amplamente utilizadas para a propagação de orquídeas visando a comercialização, a pesquisa, a conservação ou a reintrodução de espécies em seus habitat. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes antioxidantes e da exposição à ausência de luz no subcultivo de *Schomburgkia crispa*. Utilizou-se o meio de cultura MS suplementado com os antioxidantes ácido ascórbico ou ácido cítrico (0,0; 1,0; 2,0 ou 4,0 mg L⁻¹), ou ainda carvão ativado (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹). As culturas foram acondicionadas na ausência de luz por 0, 36, 72 e 108 horas, e a seguir foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo, temperatura e luminosidade controlados, permanecendo nestas condições por 75 dias. Após o período experimental, as plantas foram avaliadas quanto ao número de pseudobulbos, de raízes e de folhas, comprimento do maior pseudobulbo, da maior raiz, da maior folha e da parte aérea, largura da maior folha e massa fresca da parte aérea e do sistema radicular. Para a maioria das características avaliadas, os maiores resultados foram registrados no controle e com a utilização de carvão ativado nas concentrações de 0,5; 1,0 ou 2,0 g L⁻¹. A ausência de luz contribuiu para o aumento do número de folhas e comprimento da parte aérea da planta propiciando as melhores condições para o subcultivo *in vitro* de *S. crispa*.

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo *in vitro*, Floricultura, Orchidaceae.

ANTIOXIDANTS AND ABSENCE OF LIGHT IN DEVELOPMENT *IN VITRO* OF *Schomburgkia crispa* Lindl.

ABSTRACT

The *in vitro* cultivation techniques are broadly used for the propagation of orchids aimed to marketing, research, conservation or reintroduction of species in their habitat. The objective of this study was to evaluate the effect of different antioxidants and exposure in the absence of light on subculture of *Schomburgkia crispa*. We used the MS culture medium supplemented with the antioxidants ascorbic acid or citric acid (0.0; 1.0; 2.0 ou 4.0 mg L⁻¹), or activated carbon (0.0; 0.5; 1.0 e 2.0 g L⁻¹). The cultures were placed in the absence of light for 0, 36, 72 and 108 hours, and then

were transferred to growth room with photoperiod, temperature and light controlled, where they remained for 75 days. After the experimental period, the plants were evaluated on the number of pseudobulbs, roots and leaves, length of the longest pseudobulb, the largest root, the largest leaf and shoot, width of the largest leaf and fresh weight of shoots and root system. For most characteristics evaluated, the biggest results were recorded in the control and the use of activated carbon in the concentrations of 0.5; 1.0 ou 2.0 g L⁻¹. The absence of light contributed to the increase in the number of leaves and length of the shoot part of the plant, propitiating the best conditions for the *in vitro* subculture of *S. crispa*.

KEYWORDS: Orchidaceae; Floriculture; *in vitro* cultivation

INTRODUÇÃO

A espécie *Schomburgkia crispa* Lindl. é uma epífita, encontrada em matas de galeria e matas secas do cerrado (MENDONÇA et al., 1998). Considerada uma espécie quase ameaçada de extinção (FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 2007). Para o estado de Mato Grosso do Sul, ainda não há informações suficientes para a classificação da espécie.

Os métodos para a rápida multiplicação de orquídeas são essenciais para suprir a demanda comercial, conservar e reintroduzir populações de orquídeas em seu habitat (FERREIRA & SUZUKI, 2008). As técnicas de cultivo *in vitro* propiciam a obtenção de grande número de mudas em curto período de tempo (AVILA-DIAZ et al., 2009), entretanto a oxidação dos meios de cultura é um dos fatores responsáveis pelo lento desenvolvimento ou mortalidade das plântulas de *Schomburgkia crispa* Lindl. cultivadas *in vitro* no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Universidade Federal da Grande Dourados.

O subcultivo é usual em cultivos *in vitro* devido ao esgotamento dos nutrientes contidos nos meios de cultura utilizados ou para evitar que as plantas sejam expostas à oxidação dos mesmos. Entretanto a sua prática tem apresentado limitações ao rápido desenvolvimento *in vitro* de *S. crispa* mencionadas, uma vez que, segundo PASCAL (2001), as plantas demoram a se recuperar das injúrias causadas pelo processo.

Uma forma de evitar a oxidação dos meios, prolongando sua utilização, seria a sua suplementação com antioxidantes aliado a diferentes condições de luminosidade nas salas de crescimento. Estes procedimentos poderiam propiciar maior intervalo entre os subcultivos, melhor recuperação e desenvolvimento *in vitro* das plantas e menor período de permanência em sala de crescimento, reduzindo o custo de produção (TEIXEIRA, 2005; COSTA et al., 2006; MELO & VILAS BOAS, 2006; CAMOLESI et al., 2007). A adição de antioxidantes como cisteína, ácido ascórbico, ácido cítrico e carvão ativado entre outros, pode ser decisiva na prevenção à oxidação, a qual é mais acentuada nas fases iniciais de cultivo (TEIXEIRA, 2005).

Segundo RIBAS & ZANETTE (1992), os ácidos cítrico e ascórbico são agentes redutores que podem servir como substratos para enzimas oxidativas diminuindo a produção de substâncias tóxicas para as plantas cultivadas *in vitro*. Por outro lado a cisteína, quando associada ao EDTA, ácido ascórbico e cloreto de cálcio, tem sido eficiente para contenção do aumento da atividade da polifenoloxidase e peroxidase em banana maçã minimamente processada (MELO & VILAS BOAS, 2006). O carvão ativado, por sua vez, caracteriza-se por aumentar a área de adsorção das partículas sólidas ou gasosas e possivelmente adsorver

compostos fenólicos liberados pela oxidação dos tecidos lesionados durante o cultivo *in vitro* (COSTA et al., 2006).

Em vista do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes antioxidantes e da exposição a ausência de luz no subcultivo de *Schomburgkia crispera*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados – MS. Foram utilizadas plantas de *Schomburgkia crispera*, com 180 dias, 1,5 cm de altura e providas de duas a cinco folhas, oriundas de sementeira *in vitro* em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), cultivadas em sala de crescimento com temperatura média 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossinteticamente ativa de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

Utilizou-se o meio de cultura MS suplementado com os antioxidantes ácido ascórbico ou ácido cítrico (0,0; 1,0; 2,0 ou 4,0 mg L⁻¹), ou ainda carvão ativado (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹) e todos os tratamentos receberam 30 g L⁻¹ de sacarose e 6,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico. O pH foi ajustado $5,8 \pm 0,1$ (KOH - 1M). Foram utilizados como frascos de cultivo, recipientes de polipropileno transparente, providos de tampa rosqueável, com capacidade para 50 mL que, após receberem 10 mL de um dos 12 meios nutritivos estudados, foram esterilizados em autoclave a 120°C e pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$, por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios, em ambiente asséptico, cada frasco recebeu uma planta, sendo a seguir, as culturas acondicionadas, na ausência de luz por 0, 36, 72 e 108 horas, sob temperatura de 25 ± 2 °C. Após o período no escuro, os frascos foram transferidos para sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossinteticamente ativa de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada, permanecendo nestas condições por até 75 dias.

A cada 15 dias, os meios de cultura foram submetidos à leitura colorimétrica por meio do aparelho Minolta Chroma Meter, modelo CR-410, utilizando o sistema CIELab (Comissão Internacional de Iluminantes) onde “L” representa a luminosidade que varia de 0 (preto) a 100 (branco) e “a” e “b” as coordenadas de croma (-a = verde; +a = vermelho; -b = azul; +b = amarelo), ambos variando de -60 a 60, sendo utilizada para avaliação da oxidação a coordenada croma “b”

Após o período de cultivo, os frascos foram abertos e as plantas foram avaliadas quanto ao número de pseudobulbos, de raízes e de folhas, quanto ao comprimento do maior pseudobulbo, da maior raiz, da maior folha e da parte aérea (distância em milímetros entre a base do pseudobulbo e o ápice da maior folha) e quanto à largura da maior folha (medida em milímetros da porção mais dilatada do limbo foliar). A seguir, as plantas foram separadas em parte aérea e sistema radicular, sendo calculadas as massas frescas destas duas porções.

Para avaliação colorimétrica, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjos em esquema de parcelas sub-subdivididas, sendo as parcelas constituídas pelos três antioxidantes, em suas diferentes concentrações, as subparcelas pelos quatro períodos de exposição dos explantes à ausência de luz e as sub-subparcelas pelos tempos de cultivo (0, 15, 30, 45, 60 e 75 dias), com três repetições constituídas de dois frascos cada.

Para avaliação das características vegetais, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema de parcelas subdivididas, sendo as parcelas constituídas pelos três antioxidantes, em suas diferentes concentrações e as subparcelas pelos quatro períodos de exposição dos explantes à ausência de luz, com seis repetições constituídas de uma planta cada.

Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância e os fatores avaliados, quando significativos, foram comparados por teste de médias (Scott-knott até 5 % de probabilidade) ou por regressão com o auxílio do programa computacional SISVAR 5.3 (FERREIRA 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A significância ou não dos fatores estudados sobre as características vegetais analisadas, assim como suas médias gerais são apresentadas na Tabela 1. Os antioxidantes estudados em suas diferentes concentrações influenciaram a maioria das variáveis, sendo exceção a massa fresca da parte aérea e do sistema radicular. Houve efeito do período de permanência no escuro sobre o número e o comprimento das folhas e interação entre os fatores estudados apenas sobre o número de folhas (Tabela 1).

TABELA 1. Resumo das análises de variância do número de brotos (NB), de raízes (NR) e de folhas (NF), comprimento do maior pseudobulbo (CMPB), da maior raiz (CMR), da parte aérea (CPA), da maior folha (CMF), largura da maior folha (LMF), massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR) de *Schomburgkia crispera*. Dourados-MS, UFGD, 2014.

F.V.	G.L.	Quadrados médios				
		NB	NR	NF	CMPB	CMR
Ant.	9	1,34**	2,66**	4,96**	5,15**	13,83**
Erro 1	50	0,13	0,26	0,58	0,71	1,69
Escuro	3	0,26ns	0,16ns	6,21**	0,41ns	0,18ns
Ant. * Esc.	27	0,28ns	0,26ns	1,12*	0,94ns	1,18ns
Erro 2	150	0,22	0,17	0,70	0,62	0,95
CV(%)		34,34	26,11	24,26	41,73	44,14
M. geral		1,12	1,88	11,84	3,40mm	5,47mm

F.V.	G.L.	CPA	CMF	LMF	MFPA	MFR
Ant.	9	1,91**	4,60**	0,38**	0,02ns	0,01ns
Erro 1	50	0,11	0,33	0,06	0,02	0,01
Escuro	3	0,44*	0,06ns	0,07ns	0,02ns	0,01ns
Ant. * Esc.	27	0,20ns	0,23ns	0,05ns	0,02ns	0,01ns
Erro 2	150	0,14	0,37	0,05	0,02	0,01
CV(%)		11,01	21,39	14,51	9,22	2,48
M. geral		11,14mm	6,91mm	1,79mm	0,07g	0,01g

** significativo, no nível de 1% de probabilidade, pelo teste F

* significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F

ns não significativo

O número de folhas de *S. crispera* aumentou à medida que as plantas permaneceram por mais tempo no escuro, quando cultivadas na ausência dos

antioxidantes (controle) ou em meio nutritivo contendo 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado (Figura 1).

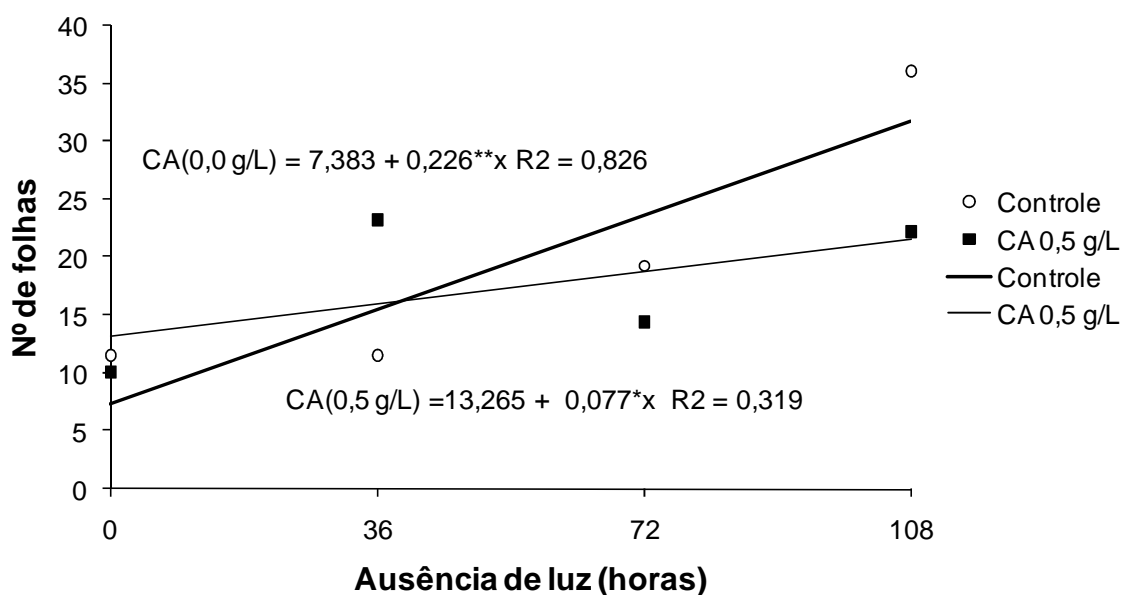


FIGURA 1 Número de folhas de *Schomburgkia crisper* observado em função do período de permanência na ausência de luz nos tratamentos controle e 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado (CA). Dourados-MS, UFGD, 2014.

Quando as plântulas foram submetidas a até 36 horas de ausência de luz, o maior número de folhas foi registrado no meio de cultura com 0,5 g L⁻¹ de carvão, a partir deste período, o controle proporcionou os melhores resultados.

Para os demais tratamentos, independentemente do período de permanência no escuro, o número de folhas não foi significativamente influenciado apresentando os seguintes valores médios de: ácido ascórbico (AA) (1,0 mg L⁻¹) = 12,74; AA (2,0 mg L⁻¹) = 9,87; AA (4,0 mg L⁻¹) = 8,41; ácido cítrico (AC) (1,0 mg L⁻¹) = 10,91; AC (2,0 mg L⁻¹) = 7,47; AC (4,0 mg L⁻¹) = 8,70; e carvão ativado (CA) (1,0 g L⁻¹) = 11,83; CA (2,0 g L⁻¹) = 11,49.

Os valores registrados para número de folhas no controle ou no meio enriquecido com 0,5 g L⁻¹ de CA foram de 32 e 22 folhas, respectivamente, quando as plantas permaneceram 108 horas na ausência de luz (Figura 1). Estes resultados são, em média, três e duas vezes maiores aos observados nos demais tratamentos.

Independentemente das concentrações e dos antioxidantes utilizados, houve uma tendência no aumento do número de folhas e no comprimento da parte aérea das plantas de *S.crispa* à medida que as plântulas permaneceram por mais tempo na ausência de luz (Figura 2). Segundo os modelos propostos, cada período de 19h30' ou de 83h18' no escuro, propiciam a produção de uma nova folha e o acréscimo de 1mm no comprimento da parte aérea da planta.

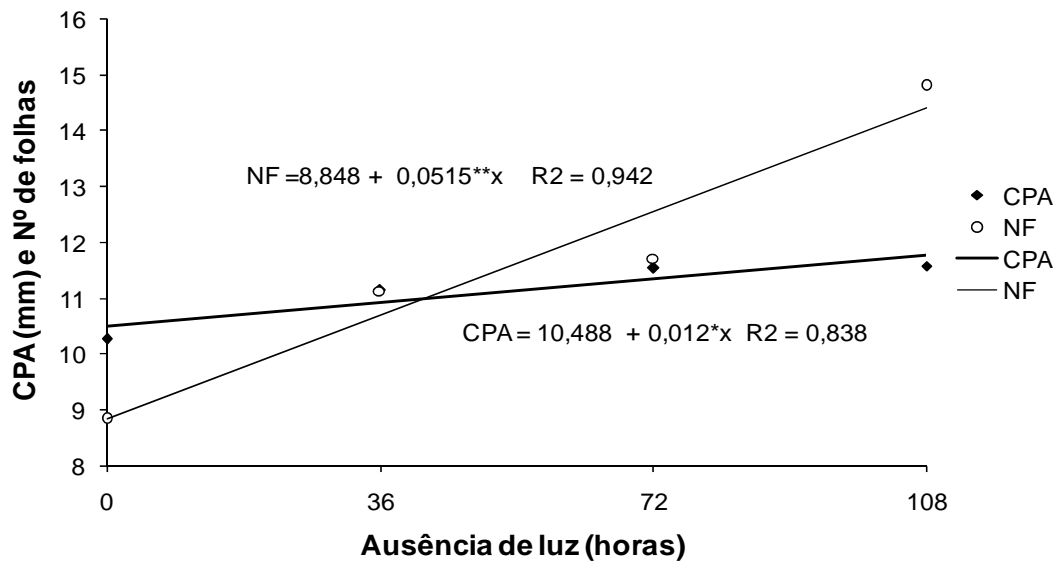


FIGURA 2. Comprimento da parte aérea (CPA) e número de folhas (NF) de *Schomburgkia crisper* observados em função do período de permanência em ausência de luz. Dourados-MS, UFGD, 2014.

Para a maioria das características avaliadas, os maiores resultados foram registrados no controle ou com a utilização de 0,5 g L⁻¹ de carvão, sendo que para comprimento da parte aérea (CPA) todas as doses de carvão foram estatisticamente iguais ao controle e para número de raízes (NR) as doses de 0,5 g L⁻¹ de CA e de 1,0 mg L⁻¹ de ácido ascórbico também foram iguais ao controle (Tabela 2).

TABELA 2. Número de brotos (NB), de raízes (NR) e de folhas (NF), comprimento do maior pseudobulbo (CMPB), da maior raiz (CMR), da parte aérea (CPA), da maior folha (CMF), largura da maior folha (LMF), massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR) de *Schomburgkia crisper*. Dourados-MS, UFGD, 2014.

Antioxidantes	NB	NR	NF	CMPB (mm)	CMR (mm)
Controle	2,58a	4,37a	10,58a	5,60a	13,83a
Ac. Ascórbico (1,0 mg L ⁻¹)	1,25b	3,00a	12,75b	3,12b	4,10b
Ac. Ascórbico (2,0 mg L ⁻¹)	0,58c	1,08c	9,87b	1,83c	1,56c
Ac. Ascórbico (4,0 mg L ⁻¹)	0,25c	0,70c	8,41c	1,00c	1,37c
Ac. cítrico (1,0 mg L ⁻¹)	1,37b	1,41b	10,91b	3,72b	3,95b
Ac. cítrico (2,0 mg L ⁻¹)	0,34c	0,68c	7,47c	1,27c	1,74c
Ac. cítrico (4,0 mg L ⁻¹)	0,41c	0,66c	8,70c	2,70b	2,81c
Carvão ativado (0,5 g L ⁻¹)	2,58a	3,12a	17,41a	7,33a	11,37a
Carvão ativado (1,0 g L ⁻¹)	0,91b	1,41b	11,82b	3,39b	7,47b
Carvão ativado (2,0 g L ⁻¹)	0,91b	2,04b	11,50b	4,04b	6,54b

Antioxidantes	CPA (mm)	CMF (mm)	LMF (mm)	MFPA (g)	MFR (g)
Controle	14,12a	11,45a	2,67a	1,05a	1,02a
Ac. Ascórbico (1,0 mg L ⁻¹)	10,66b	6,62c	2,16b	1,05a	0,96a
Ac. Ascórbico (2,0 mg L ⁻¹)	9,85b	5,00c	1,45c	1,01a	1,00a
Ac. Ascórbico (4,0 mg L ⁻¹)	9,47b	4,43c	1,33c	0,99a	1,03a
Ac. cítrico (1,0 mg L ⁻¹)	9,58b	5,16c	2,10b	1,01a	1,01a
Ac. cítrico (2,0 mg L ⁻¹)	8,09c	3,76c	1,27c	1,00a	1,00a
Ac. cítrico (4,0 mg L ⁻¹)	11,37b	4,87c	1,33c	1,41a	0,98a
Carvão ativado (0,5 g L ⁻¹)	12,72a	9,00b	1,95b	1,07a	1,01a
Carvão ativado (1,0 g L ⁻¹)	13,14a	8,08b	1,83b	1,04a	1,00a
Carvão ativado (2,0 g L ⁻¹)	12,87a	10,72b	1,83b	1,03a	1,01a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Scott-Knott 5% de probabilidade).

A adição de carvão ativado no meio de cultura é uma prática reconhecida, e sua influência na diferença de altura média das plântulas pode ser atribuída à sua capacidade de adsorção de substâncias inibitórias do meio ou à de produtos tóxicos liberados pelos explantes, pela manutenção do pH em valor ótimo para morfogênese (THOMAS, 2008; SOARES et al., 2012). Esses autores também salientam que o carvão ativado poderia atuar na adsorção de vitaminas, íons metálicos e reguladores de crescimento, resultando em efeitos positivos ou negativos para o desenvolvimento, dependendo da espécie estudada.

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), o escurecimento do meio de cultura promovido pelo carvão ativado simula uma condição de escuro, promovendo o desenvolvimento do sistema radicular, o que foi constatado em *S. crispa* com a utilização de 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado e para *Brassavola tuberculata*, em que a utilização de 4,35 g L⁻¹ de carvão propiciou maior desenvolvimento do sistema radicular (SOARES et al., 2012). Entretanto, CHAPLA et al. (2009) obtiveram maior comprimento de raiz de *Miltonia flavescens* na ausência deste componente, demonstrando que diferentes respostas podem ser observadas, dependendo da espécie vegetal utilizada.

O resumo da análise de variância para a avaliação colorimétrica dos meios de cultura utilizados é apresentado na Tabela 3. Houve efeito isolado e conjunto dos fatores estudados, exceto para o período de permanência no escuro e para a combinação deste fator com o tempo de cultivo (Tabela 3)

TABELA 3 Resumo da análise de variância da coordenada de croma b (INTB). Dourados-MS, UFGD, 2014.

F.V.	G.L.	INTB
Antioxidantes	9	262,84**
Erro 1	20	0,19
Escuro	3	0,10 ^{ns}
Antioxidantes * Escuro	27	0,90**
Erro 2	80	0,28
TC	5	30,55**
Antioxidantes*TC	45	4,06**
Escuro*TC	15	0,13 ^{ns}
Antioxidantes*Escuro*TC	135	0,38**
Erro 3	380	0,11
CV(%)		3,11
Média geral		1,07

** significativo, no nível de 1% de probabilidade, pelo teste F

* significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F

^{ns} não significativo

Os resultados decorrentes da atuação conjunta dos três fatores estudados são apresentados na Figura 3. Os meios contendo carvão ativado, independentemente do período de exposição ao escuro e do tempo de cultivo foram os que apresentaram os menores valores da coordenada de croma “b” (INTB), o que indica menor coloração amarelada e, conseqüentemente, menor oxidação. Os maiores valores de INTB foram registrados para o meio enriquecido com 4,0 mg L⁻¹ de ácido ascórbico (Figura 3).

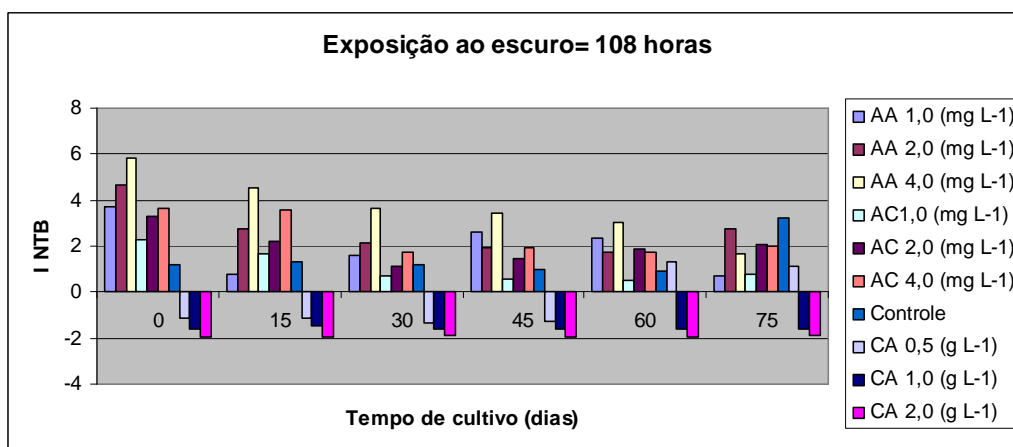
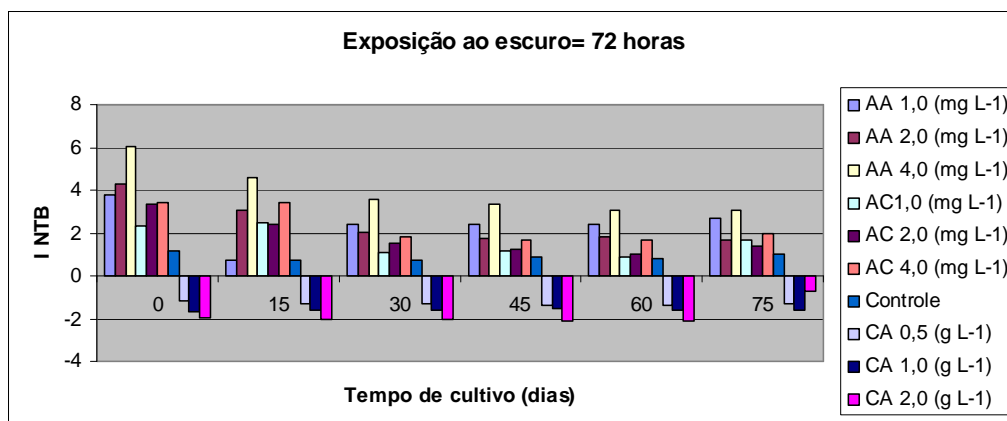
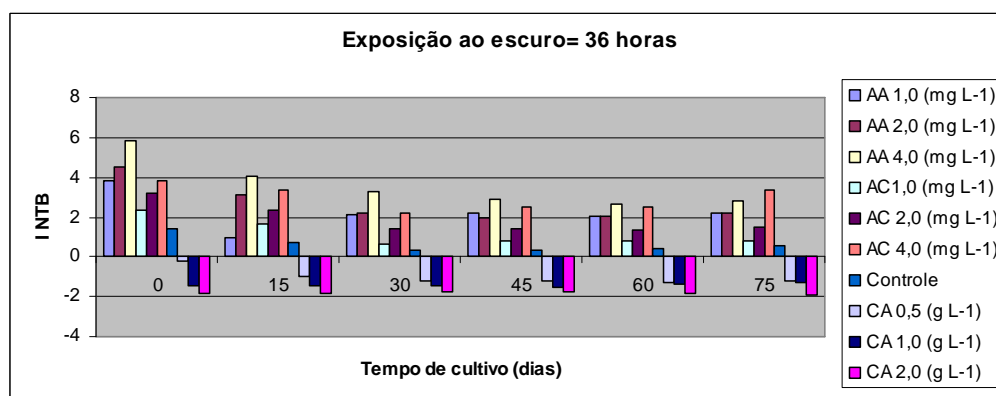
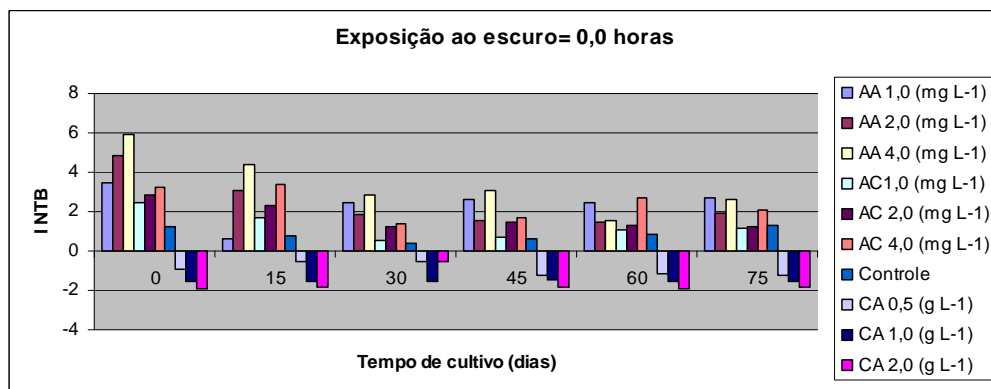


FIGURA 3. Valores da coordenada de croma “b” (INTB). Dourados-MS, UFGD, 2014.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados pode-se concluir que:

- 1 - Dos três antioxidantes utilizados, recomenda-se o carvão ativado, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹, para inibir a oxidação do meio de cultivo MS;
- 2 – A exposição das plantas a um período de ausência de luz foi benéfica para o aumento do número de folhas e do comprimento da parte aérea no subcultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispera*.

AGRADECIMENTOS

À FUNDECT-MS, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AVILA-DIAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n.3, p 335-343, 2009.
- CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C. G.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. J. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira 'Maçã'. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.4, p.1237-1241, 2007.
- CHAPLA, P. I.; BESSON, C. F.; OLIVEIRA, L. K.; SILVA, J. M.; ROCHA, A. C. S.; STEFANELLO, S. 2009. PH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.
- COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-Benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n.2, p. 280-283.2006.
- FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. **O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção**. In: Loiola MIB, Baseia IG & Lichston JE (Org.) Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil. Natal, Imagem Gráfica, p.67-68.2008.
- FERREIRA, D. F. 2010. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de Experimentos – SISVAR 5.3**. Universidade Federal de Lavras.
- FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. 2007. **Lista das espécies presumivelmente ameaçadas de extinção da flora do estado de minas gerais**. Belo Horizonte, MG. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/listasmg/MG-especies-presumivelmente-ameacadas.pdf>. Acesso em: 14/02/2014.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: **EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPQ**, v. 1, p. 183-260. 1998.

MELO, A. A. M; VILAS BOAS, E. V. B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maça minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.110-115. 2006.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds), Cerrado: ambiente e flora. **EMBRAPA-CPAC**, Planaltina, Brasília. p. 289-556.1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497.1962.

PASQUAL, M. 2001. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações - meios de cultura**. Meios de cultura. Lavras-MG: UFLA/FAEPE. 74p.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F. Propagação da macieira cv gala através da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, n.1, p.39-43.1992.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; ROSA, C. B. C. J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, v. 24, n. 3, p. 226-233.2012.

TEIXEIRA, J. B. 2005. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Brasília: **Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia**.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v.26, n.6, p.618-631.2008.