

## Micropropagação de *Tournefortia cf paniculata* Cham.

Bertolucci, Suzan K. V.<sup>1</sup>; Pinto, José Eduardo B. P.<sup>2\*</sup>; Cardoso, Maria das Graças<sup>1</sup>; Gavilanes, Manuel L.<sup>3</sup>; Santiago, Edson J. A.<sup>2</sup>; Lameira, Osmar A.<sup>4</sup>

Dept<sup>o</sup> de Química<sup>1</sup>/Dept<sup>o</sup> de Agricultura<sup>2</sup>/Dept<sup>o</sup> de Biologia<sup>3</sup>, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil, EMBRAPA (CPATU)<sup>4</sup>

**RESUMO:** *Tournefortia cf paniculata* Cham., é pertencente a família Boraginaceae. Conhecida como marmelinho, a decocção de suas folhas é utilizada como potente diurético e antibiótico das vias urinárias. *Tournefortia cf paniculata* foi propagada "in vitro" usando como explante o segmento nodal. A multiplicação dos brotos foi feita no meio WPM suplementado com 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP). O enraizamento dos brotos individuais no meio WPM sem regulador de crescimento. As plântulas foram aclimatadas com 100% de sobrevivência em substrato comercial.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, plantas medicinais, cultura de tecidos.

**ABSTRACT:** Micropropagation of *Tournefortia cf paniculata* Cham. *Tournefortia cf paniculata* Cham. belongs to the family Boraginaceae. It is known as "marmelinho", the decoction of its leaves is used as potent diuretic and urinary tract antibiotic. The *Tournefortia cf paniculata* were propagated in vitro using nodal segments as explants. Shoot proliferation was initiated on WPM medium supplemented with 0.5 e 1.0 mg.L<sup>-1</sup> of benzilaminopurine (BAP). Excised shoots initiated roots when cultured on WPM without growth regulators. Plantlets were successfully transferred to substrate with 100% survival.

**Key words:** Biotechnology, medicinal plants, tissue culture.

## INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos tem sido vista como uma possível fonte de produtos naturais, e um vasto número de revisões tem sido escrito discutindo o seu potencial. Muitas destas revisões têm se concentrado em substâncias com atividades farmacológicas com alto valor comercial. Neste sentido, a regeneração de plântulas "in vitro" através da cultura de gemas é freqüentemente utilizada para obtenção de clones, que mantêm todas as características da planta-matriz. Esta é uma técnica especialmente vantajosa para a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais (Caldas, 1986; Scragg, 1994 e França, 1999), a qual representa uma alternativa de produção de princípios ativos úteis e economicamente viáveis (Pletsch, 1998).

*Tournefortia cf paniculata* Cham., conhecida popularmente por marmelinho é um arbusto pertencente a família Boraginaceae. Esta família compreende, aproximadamente, 100 gêneros com mais de 2000 espécies, distribuídas em todo o planeta (Joly, 1993). Segundo a medicina popular suas folhas são usadas na forma de decocto como diurético e para infecções urinárias. É utilizada também, por pacientes com litíase renal, responsável por muitas urgências hospitalares. O

presente trabalho teve como objetivo avaliar as condições biotecnológicas para cultivo "in vitro" de *Tournefortia cf paniculata*, visando um protocolo de clonagem.

## MATERIAL E MÉTODO

A identificação botânica da espécie em estudo foi efetuada pela professora Dra. Neusa Taroda<sup>1</sup> do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus São José do Rio Preto e colaboração do professor Manuel Losada Gavilanes do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Exsicatas estão depositadas no Herbário SJRP (UNESP-São José do Rio Preto), sob registro nº 20601 e no Herbário ESAL do Departamento de Biologia da UFLA, sob registro nº 15818.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Em todos os experimentos, os explantes foram cultivados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. Igualmente, para todos os experimentos os meios de cultura foram solidificados com ágar a

<sup>1</sup> Segundo a Dra. Neusa Taroda não existem estudos agrônomicos e fitoquímicos com o gênero *Tournefortia* no Brasil.

Recebido para publicação em 18.04.00 e aceito para publicação em 24.11.00.

0,6% e o pH ajustado em  $5,7 \pm 1$  antes da autoclavagem, sendo os explantes cultivados em fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro sob uma intensidade luminosa de  $25 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os explantes foram excisados em tamanhos de 15 a 20 mm e inoculados verticalmente no meio de cultura. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Segmentos nodais provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação com idades de 6 meses, propagadas por estaquia foram lavados em água corrente e desinfestados com solução de hipoclorito de sódio a 40% sob agitação mecânica, por 10 minutos e inoculados em meio básico MS (Murashigue & Skoog, 1962) nos seguintes tratamentos: T1= MS + 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de ácido cítrico + 1,0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  + 0,5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de ANA; T2 = MS + 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de ácido cítrico; T3 = MS/2 + 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de ácido cítrico; T4=MS/2 + 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de ácido cítrico + 1,0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  + 0,5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de ANA. A avaliação foi realizada aos 28 dias quanto as variáveis de resposta: desenvolvimento de brotações, altura média das brotações, formação de calos, matéria fresca, desenvolvimento foliar, formação de raízes e oxidação.

Com base nos dados deste experimento avaliamos o efeito dos diferentes meios de cultura básicos MS, MS/2 e WPM (Lloyd e McCown, 1980) no estabelecimento do explante secundário do marmelinho. Foram utilizados segmentos nodais de plântulas cultivadas em meio básico WPM ausente de regulador de crescimento. Neste avaliou-se o número, altura e matéria fresca e seca da brotação e raiz, os quais foram avaliados em duas épocas, aos 30 e 45 dias após a instalação do experimento. Foram aplicadas às médias o teste de Tukey.

Após o estabelecimento "in vitro" dos segmentos nodais de marmelinho, avaliou-se o efeito da suplementação de BAP no meio básico WPM nas concentrações de 0; 0,5 e 1,0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Este experimento foi avaliado aos 55 dias quanto ao número e altura da brotação e matéria seca da parte aérea. As médias foram ajustadas por equações de regressão polinomial. Seguindo os estágios da micropropagação, individualizou-se as rosetas obtidas no experimento anterior e inoculou-as em meio básico WPM ausente de regulador de crescimento, para alongamento e enraizamento. O parâmetro avaliado foi apenas a formação completa da plântula. Após o estabelecimento das plântulas no meio básico WPM, estas foram transferidas das condições "in vitro" para "ex vitro", as quais foram transferidas para copos plásticos com capacidade de 100 mL, contendo substrato comercial Plantimax®. Após 30 dias as mudas foram

transplantadas para vasos plásticos com capacidade para 5 litros contendo o mesmo substrato. A irrigação foi feita com sistema de nebulização automático para manter a umidade em 90%. A manutenção do nível de luz na casa de vegetação foi feita com sombrite à 70%. A avaliação foi realizada aos 30 e 150 dias, quanto a sobrevivência da planta.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

O estabelecimento "in vitro" do explante proveniente de material "in vivo", é uma das fases mais críticas em culturas de tecidos. Nesta fase o índice de sobrevivência costuma ser baixo em função da resistência do explante aos procedimentos de desinfestação, contaminação, oxidação e sua adequação às condições de cultivo estabelecidas.

Conforme já mencionado, é a primeira vez que se estuda o marmelinho "in vitro". Portanto, em um estudo preliminar, observou-se que a desinfestação dos segmentos nodais inoculados no meio básico MS foi 85% eficiente, entretanto, houve 100% de oxidação. Para controlar a oxidação dos explantes, os segmentos nodais foram cultivados em meios MS com a concentração normal dos sais e MS com a metade da concentração dos sais suplementados com um antioxidante, o ácido cítrico. Observou-se que, a concentração dos sais do meio MS foi determinante na indução da oxidação. Resultados semelhantes foram encontrados por Caldas e Taketomi (1993), em testes iniciais com a cultura "in vitro" da casca e câmbio vascular de jabuticabeira, *Myrciaria cauliflora* Berg. (Myrtaceae), os quais observaram morte em todos os explantes devido a uma intensa oxidação e alta porcentagem de contaminação. A eliminação da oxidação foi conseguida pela exclusão de FeEDTA dos meios nutritivos estudados, isto justifica-se pelo fato que o ferro é cofator enzimático.

Observando-se a Tabela 1 nota-se que a concentração de sais no meio de cultura foi importante para o crescimento e desenvolvimento das brotações. Nos tratamentos onde havia metade da concentração dos sais, houve considerado desenvolvimento de brotações. Foram utilizados no meio de cultura uma auxina (ANA) e uma giberelina ( $\text{AG}_3$ ) para auxiliar na sobrevivência e crescimento do explante, entretanto, a suplementação de regulador de crescimento não foi eficiente na sobrevivência e qualidade destas brotações. A auxina e a giberelina induziram vitrificação (estado hiperhídrico) das folhas nestes brotos, as quais se apresentaram estreitas em relação a folha normal do marmelinho que possui uma folha larga. Em

gemas apicais e basais de *Solidago microglossa* D.C. (Compositae) oriundas de casa de vegetação, Faria, *et al* (1993) também observaram que a utilização de reguladores de crescimento mesmo em baixas concentrações, não apresentaram vantagens, ao contrário causaram fitotoxidez ao tecido. Através dos resultados obtidos com o marmelinho, os melhores tratamentos foram

aqueles que utilizaram a metade da concentração dos sais do meio MS, isento de regulador de crescimento. Quando os segmentos nodais foram cultivados na concentração normal de sais do MS, com e sem reguladores de crescimento induziu a formação de calos e não houve desenvolvimento das brotações, justificando-se os maiores pesos da matéria fresca apresentados na Tabela 1.

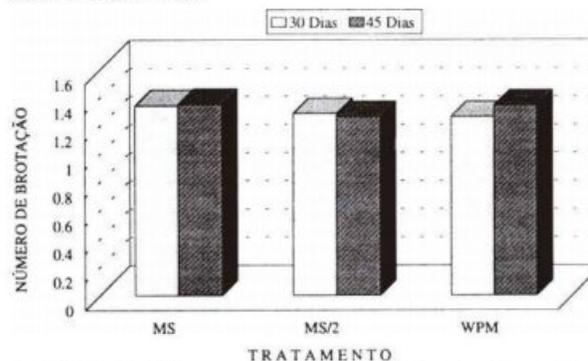
**TABELA 1-** Desenvolvimento de brotações; altura das brotações (cm); formação de calos; matéria fresca (g); aspectos das folhas e raízes e oxidação nos segmentos nodais provenientes de *Tournefortia cf paniculata* cultivadas em casa de vegetação. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

Variáveis de respostas	T1	T2	T3	T4
Desenvolvimento de brotações	-	-	100%	86%
Altura média das brotações (cm)	-	-	0,96	0,58
Formação de calos	100%	100%	-	-
Matéria Fresca (g)	1,55	1,17	0,55	0,42
Folhas normais cor verde intenso	-	-	100%	-
Folhas estreitas vitrificadas	-	-	-	100%
Raízes grossas	100%	-	-	-
Oxidação	severa (-)	severa (+)	ausente	ausente

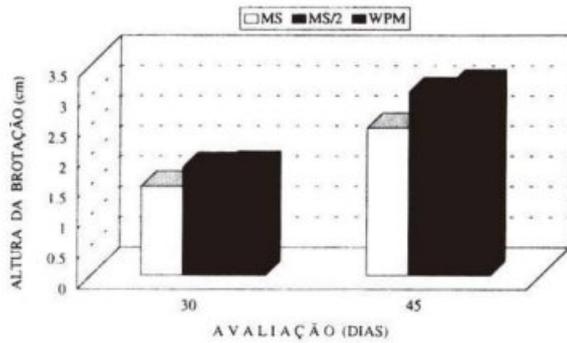
T1= MS+100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico+1,0 mg.L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>+ 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA; T2 = MS+100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico; T3 = MS/2+100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico; T4=MS/2+100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico+1,0 mg.L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>+ 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA

Os segmentos nodais oriundos de explante "in vitro" tiveram um crescimento e desenvolvimento diferente em relação aos meios MS completo e metade da força dos sais, quando comparados com os explantes provenientes de casa de vegetação, mostrando o quanto o explante interfere nas culturas "in vitro". Os segmentos nodais inoculados em meio MS; MS/2 e WPM, avaliados após 30 e 45 dias não apresentaram diferenças significativas quanto ao número de brotos entre os tratamentos e épocas de avaliação, conforme mostra a Figura 1. Entretanto, observando-se a Figura 2, a altura das brotações apresentaram diferenças significativas quanto ao fator época de avaliação. A melhor época de repicagem foi aos 45 dias, pois se observam um desenvolvimento significativo a nível de 5% na parte aérea. Por outro lado, as médias das alturas das brotações calculadas pelo teste de Tukey entre os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas. Entretanto, comparando-se o meio WPM com o meio básico completo do MS em relação a altura das brotações, observou-se um incremento de 30% nesta característica. Notou-se, também que o meio WPM em qualidade da plântula foi melhor dentre os três meios estudados, pois os demais tratamentos apresentaram plântulas com amarelamento em algumas folhas, o que foi

exacerbado no meio MS completo. O meio de cultura MS é o meio mais concentrado em termos de micro e macronutrientes, este comportamento das plântulas pode ter ocorrido em função de uma fitotoxidez, causada pela alta concentração de sais deste meio. A mesma resposta foi encontrada em estudos com *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae) realizados por Coelho (1999), em que os segmentos nodais foram melhor estabelecidos em meio WPM quando comparados com o meio MS.

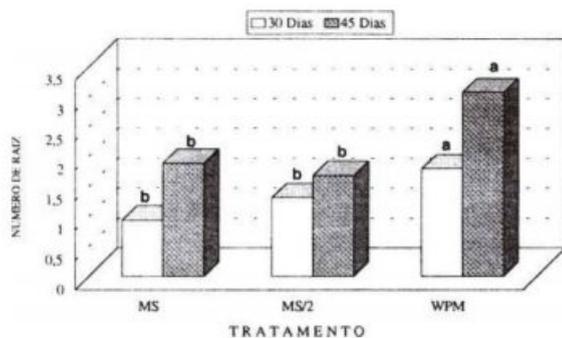


**FIGURA 1-** Número médio das brotações formadas a partir de segmentos nodais de marmelinho cultivados "in vitro" em meios de cultura MS; MS/2 e WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

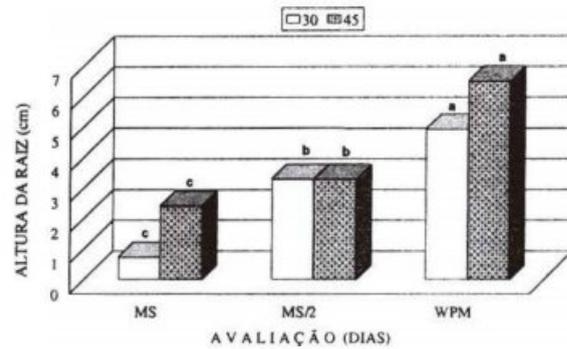


**FIGURA 2-** Altura média das brotações formadas a partir de segmentos nodais de marmelinho cultivados "in vitro" em meios de cultura MS; MS/2 e WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000

Quanto ao número e altura média das raízes observou-se a superioridade do meio WPM. Ao analisar as médias do número e altura das raízes entre os tratamentos observou-se que o meio WPM diferiu dos demais a nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey (Figuras 3 e 4). Com isto, podemos inferir que não só os reguladores de crescimento afetam a indução e crescimento das raízes, mas também a concentração dos sais. Resultados semelhantes foram encontrados por Ishida *et al.* (1993), quando observaram que as concentrações dos sais do MS também influenciaram no enraizamento "in vitro" de brotações adventícias do porta-enxerto de macieira 'M-7'.

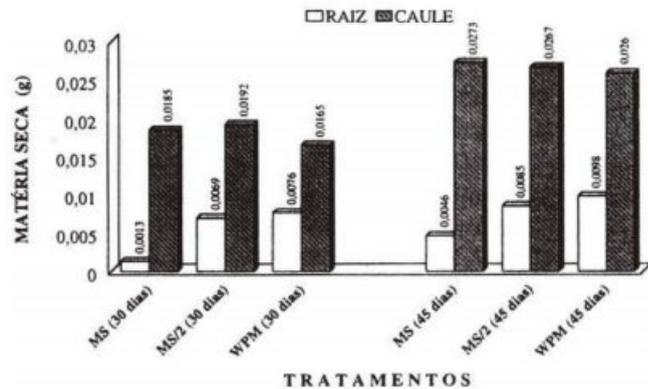


**FIGURA 3-** Número de raízes formadas a partir de segmentos nodais de marmelinho cultivados "in vitro" em meios de cultura MS; MS/2 e WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.



**FIGURA 4-** Altura média das raízes formadas a partir de segmentos nodais de marmelinho cultivados "in vitro" em meios de cultura MS; MS/2 e WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

Em relação a matéria seca das raízes do marmelinho cultivadas "in vitro" (Figura 5) confirma-se a superioridade do meio básico WPM em relação ao meio básico MS e MS/2. Certamente, uma boa formação do sistema radicular "in vitro" propicia uma melhor aclimação das plântulas.



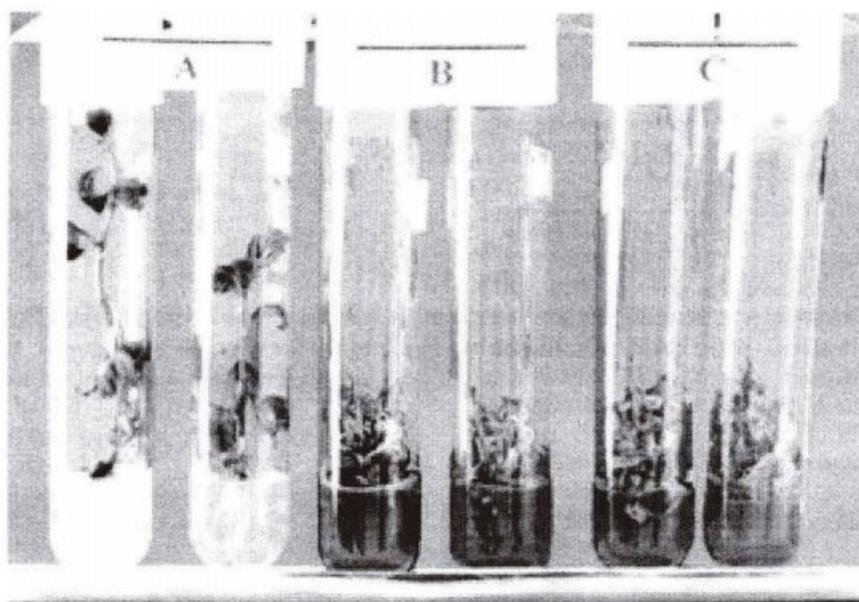
**FIGURA 5-** Matéria seca da raiz e parte aérea dos segmentos nodais de marmelinho cultivados "in vitro" em meios de cultura MS; MS/2 e WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

O BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e, é citado como a citocinina por excelência na multiplicação de brotações e indução de gemas adventícias, (Grattapaglia e Machado, 1990).

De fato, diante dos dados obtidos, o BAP mostrou-se eficiente para a indução de roseta (multibrotos) em segmentos nodais de marmelinho como mostra a Figura 6. Cerqueira (1999), em estudos com a propagação "in vitro" de *Tridax procumbens* L. (Asteraceae), concluiu que entre o BAP e o TDZ, o BAP foi o melhor regulador de crescimento em todas as variáveis de respostas analisadas (altura da plântula; número de brotos e raízes, peso da matéria fresca e seca da parte aérea). Os mesmos resultados já haviam sido obtidos por França et al. (1995), citados por França

(1999), quando estudaram a indução de brotações em segmentos nodais de *Eclipta alba* L. Hassk. (Asteraceae).

Analisando a Tabela 2, pode-se observar que no meio básico WPM não ocorreu indução de brotações múltiplas, apenas o crescimento e desenvolvimento das brotações que apresentaram uma média de 1,0278 brotações/explante. Entretanto, na suplementação deste meio com 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP notou-se indução de múltiplas brotações.



**FIGURA 6-** Efeito das concentrações crescentes de BAP em segmentos nodais de *Tournefortia cf. paniculata* cultivadas in vitro em meio WPM suplementado com 0,0 (A); 0,5 (B); 1,0 (C) mg.L<sup>-1</sup> do regulador de crescimento. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

**TABELA 2-** Valores das médias ajustadas por equação de regressão para AB (altura dos brotos em centímetros); NB (número de brotos) e PSPA (peso seco da parte aérea em gramas) em segmentos nodais de marmelinho em concentrações crescentes de BAP no meio WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

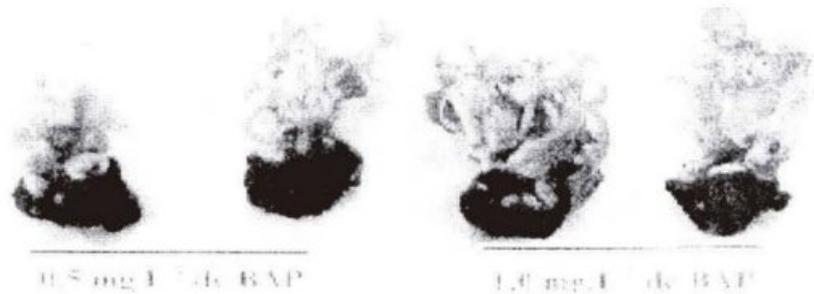
B A P ( m g . L <sup>-1</sup> )	A B ( c m )	N B	P S P A ( g )
0 , 0	4 , 9 3 0 0 a	1 , 0 2 7 8 c	0 , 0 3 2 5 a
0 , 5	2 , 8 1 5 0 b	3 , 9 4 4 4 b	0 , 0 2 8 1 a
1 , 0	0 , 7 0 0 0 c	6 , 8 6 1 1 a	0 , 0 2 3 8 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

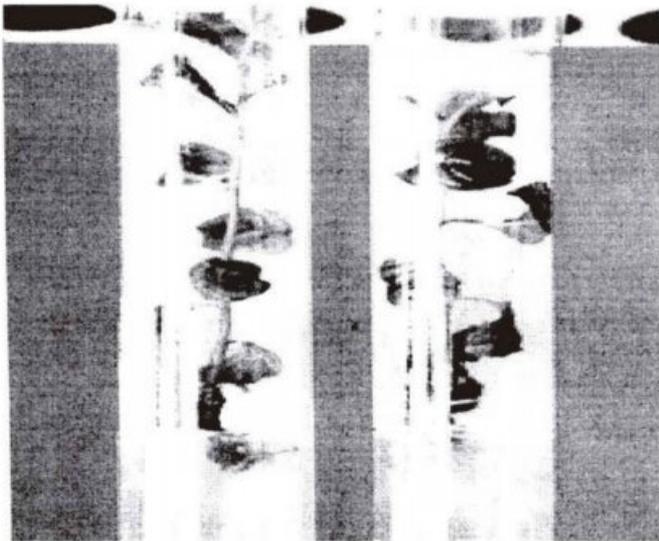
Após a indução das multibrotações, é necessário o alongamento e o enraizamento das brotações. Deste modo, os multibrotos formados no meio básico WPM suplementado com 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP foram individualizados e cultivados em meio básico WPM para alongar e enraizar (Figura 7). As brotações provenientes de ambos os meios de cultura enraizaram em WPM e tiveram um bom crescimento e desenvolvimento, sem a necessidade de utilizar reguladores de crescimento, conforme pode-se observar na Figura 8. Pereira (1999), ao individualizar as multibrotações obtidas

na inoculação de segmentos nodais de *Echinodorus cf scaber* Rataj (Alismataceae) em meio MS suplementado com 6 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, obteve, também, enraizamento e desenvolvimento das brotações em meio MS ausente de regulador de crescimento.

Todas as plântulas aclimatizadas sobreviveram. Na Figura 9, observa-se plantas de marmelinho aclimatizadas aos 30 e 150 dias, após a transferência para substrato comercial Plantimax® em casa de vegetação.



**FIGURA 7-** Multibrotações de *Tournefortia cf paniculata* desenvolvidas no meio WPM suplementado com 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.



**FIGURA 8-** Plântulas de *Tournefortia cf paniculata* desenvolvidas a partir da individualização de rosetas cultivadas em meio WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.



**FIGURA 9-** Plântulas de *Tournefortia cf paniculata* com 30 e 150 dias após a aclimação. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

Assim, concluímos que os segmentos nodais são explantes eficientes para o estabelecimento da planta "in vitro", sendo o meio WPM ausente de regulador de crescimento, o meio mais eficiente para o desenvolvimento e crescimento da plântula. A suplementação com 1,0 mg/L de BAP induz a formação de múltiplas brotações (7 brotações/segmento), as quais enraizam no meio básico WPM, sendo as plântulas aclimatadas com 100% de sobrevivência. Deste modo, a micropropagação também pode ser aplicada às espécies vegetais produtoras de princípios ativos úteis e ser explorada economicamente, da mesma forma que a micropropagação de espécies leguminosas, frutíferas, florestais e ornamentais (Pletsch, 1998).

#### AGRADECIMENTO

As agências de fomento a pesquisa FINEP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- CALDAS, L.S. Cultura de tecidos e biotecnologia. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1986, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1986. p.37-38.
- CALDAS, L.S.; TAKETOMI, C. Desinfestação e controle de oxidação de explantes lenhosos de jabuticabeira e goiabeira para cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.107, jun. 1993. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FIOLOGIA VEGETAL, 4, Fortaleza, 1993.
- CERQUEIRA, E.S. **Propagação e calogênese in vitro em erva-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal**. Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- COELHO, M.C.F. **Germinação de sementes e propagação in vitro de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. Lavras, MG: UFLA, 1999. 119p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- FARIA, J.L.D; PINTO, J.E.B.P.; DESCHAMPS, C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Solidago microglossa* a partir de gemas apicais e basais. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.113, jun. 1993. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FIOLOGIA VEGETAL, 4., 1993, Fortaleza.
- FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; et al. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.101-121.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-170.
- ISHIDA, J.S. : PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. et al. Efeitos dos sais do "MS", ácido indolbutírico, sacarose e ágar sobre o enraizamento *in vitro* de brotações adventícias do porta-enxerto de macieira "M-7". **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.105, jun. 1993. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FIOLOGIA VEGETAL, 4., 1993, Fortaleza.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 11.ed. São Paulo: Nacional, 1993. p.578.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. **Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture**. Int. Plant Prop. Soc. Proc., n.30, p.421-427, 1980.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- PEREIRA, F.D. **Propagação in vitro e identificação de metabólitos secundários em chapéu de couro (*Echinodorus cf scaber* Rataj), uma planta medicinal**. Lavras, MG: UFLA, 1999. 111p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v.4, p.12-15, jan/fev, 1998.
- SCRAGG, A.H. Secondary products from cultured cells and organs: II. Large scale culture. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (eds). **Plant Cell Culture: a practical approach**. 2.ed. Oxford: Oxford University Press, 1994. (The practical Approach Series)