

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ENGENHARIA FLORESTAL

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO DE FAVA-
D'ANTA (*Dimorphandra mollis* BENTH.)**

LETÍCIA VAZ MOLINARI

Montes Claros-MG

2017

Letícia Vaz Molinari

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO DE FAVA-D'ANTA
(*Dimorphandra mollis* BENTH.)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para a obtenção do título de bacharel em Engenharia Florestal.

Orientadora: Profa. Dra. Claudineia Ferreira Nunes

Co- orientador: Prof. Dr. Ernane Ronie Martins

Montes Claros-MG
Instituto de Ciências Agrárias - UFMG

2017

Letícia Vaz Molinari. **GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO DE FAVA-D'ANTA (*Dimorphandra mollis* BENTH.)**

Aprovada pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Ernane Ronie Martins – Co-orientador ICA/UFMG

Dra. Messulan Rodrigues Meira ICA/UFMG



Profa. Dra. Claudineia Ferreira Nunes- Orientador ICA/UFMG

Montes Claros, 23 de novembro de 2017.

Dedico a toda a minha família, principalmente meus pais Josiana e Carlos, meus irmãos Carlos Henrique, Laís e Larissa, pelo apoio incondicional, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força para chegar até aqui.

Aos meus pais Josiana e Carlos, por serem as pessoas mais importantes da minha vida, por todo o apoio, carinho, dedicação e investimento na minha carreira.

Aos meus irmãos Carlos Henrique, Larissa e Laís, por me apoiarem diante das dificuldades e por compartilhem comigo os melhores momentos da minha vida.

Aos meus cunhados Eduardo e Thiago por toda convivência, carinho e apoio.

Ao professor Co-orientador Ernane Ronie Martins pelo apoio de sempre na elaboração e execução de todos os trabalhos.

À professora Lourdes pelo carinho e ensinamentos durante toda a minha trajetória acadêmica.

À professora Orientadora Claudineia pela paciência, ensinamentos e amizade construída nesses anos.

À família brutas que ajudou a confortar a saudade que sinto de casa, Lisandra, Adelaide, Paulinha, Naiara, Maíra, Amanda, Elaine, Jessika e Ana Paula.

À SAIDERA (Amanda, Débora, Jessika, Suzinha e Daisy) pela amizade, companheirismo, e compreensão.

Aos meus queridos amigos de sala Amanda Karoline, Amanda Rodrigues, Caique, Carol, Cris, Daisy, Daniel, Denniel, Débora Dom, Eça, Felipe, Gabriel, Gi, Jessika, Karol, Lucas, Patrícia, Poliana, Paulo, Rafael, Rodrigo, pela amizade e zoeira de sempre.

Ao meu melhor amigo e companheiro nesses últimos anos Elves, pelo apoio, carinho e dedicação.

Aos colegas, funcionários e professores do Laboratório de Biotecnologia / CPCA.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, pela oportunidade de realizar a presente pesquisa.

Enfim, obrigada a todos que de alguma maneira me ajudaram a realizar esta pesquisa.

*“Fazer-me discernir o propósito dos teus preceitos;
então meditarei nas tuas maravilhas. A minha alma
se consome de tristeza fortalece-me conforme a tua
promessa”.*

(Salmo c.119, v. 27-28)

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar métodos de desinfestação de sementes para o estabelecimento *in vitro* e concentrações de regulador de crescimento vegetal para a micropropagação de *Dimorphandra mollis* Benth. Foram realizados três experimentos: O primeiro, estabelecimento *in vitro* de sementes com o uso de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*; *Lippia origanoides*; *Ocimum gratissimum*; *Lippia rotundifolia* e hipoclorito de sódio. O segundo, multiplicação e alongamento com o uso de diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mgL⁻¹). O terceiro, enraizamento de brotações com o uso de diferentes concentrações de AIB (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mgL⁻¹). Os experimentos foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições. Os explantes foram inoculados individualmente em tubo de ensaio contendo 15 mL de meio MS, distribuídos nos diferentes tratamentos e mantidos em ambiente de cultivo, sob condições ambientais controladas. Após o tempo de incubação determinado em cada experimento foram realizadas as seguintes avaliações: porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de contaminação e oxidação, comprimento da parte aérea, número de brotos e número de raízes, número de folhas, presença e ausência de raízes, presença e ausência de calos. Verificou-se no presente trabalho que a oxidação foi controlada com o uso do PVP. A maior porcentagem de germinação foi observada no tratamento com capim santo (92%) seguida pelo hipoclorito de sódio (58%). Para desenvolvimento das plântulas, quanto ao comprimento da raiz, comprimento da parte aérea, número de raízes e número de folhas apresentaram resultados superiores para os tratamentos com óleo essencial de capim santo e hipoclorito de sódio, sendo que esses parâmetros foram ausentes para o óleo essencial de rosmaninho. Dentre todas as concentrações de BAP testadas, verificou-se que para o número médio de brotos, número médio de folhas e comprimento da parte aérea a aplicação de 1,0 mgL⁻¹ proporcionou a melhor resposta. Os calos foram encontrados durante toda a fase de multiplicação e não houve emissão de raízes. De posse dos resultados conclui-se que o capim santo, agente não nocivo à saúde humana, é recomendado para a remoção de contaminantes em sementes de fava d'anta destinadas ao cultivo *in vitro* e emissão de primórdios radiculares (adventícias) e folhas. A utilização de 1,0 mgL⁻¹ de BAP promove o surgimento de brotações em segmentos nodais de fava d'anta.

Palavras- chave: Plantas medicinais. Cerrado. Cultivo *in vitro*. Faveira.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mapa de domínio do bioma Cerrado no Brasil.....	13
Figura 2- Detalhes da inflorescência disposta em espigas corimbiformes da fava - d'anta (<i>Dimorphandra mollis</i> Benth.). (A) inflorescência com botões florais e (B)- inflorescência pós a antese	15
Figura 3- Frutos e sementes de fava d'anta (<i>Dimorphandra mollis</i> Benth.).....	16
Figura 4- Germinação <i>in vitro</i> de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth	29
Figura 5- Plântulas de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. com 21 dias de estabelecimento <i>in vitro</i>	30
Figura 6- Propágulos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. cultivadas em meio contendo o regulador de crescimento BAP.....	34
Figura 7- Propágulos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. com 75 dias de adição de BAP no meio de cultura.....	36
Figura 8- Propágulos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. cultivadas em meio contendo o regulador de crescimento AIB.....	37
Gráfico 1- Efeito de concentrações de BAP sobre o comprimento da parte aérea de propágulos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i>	33
Gráfico 2- Efeito de concentrações de BAP sobre o número de folhas de propágulos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. após 75 dias de cultivo <i>in vitro</i>	34
Gráfico 3- Efeito de concentrações de BAP sobre a presença de calos em propágulos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i>	35
Gráfico 4- Efeito de concentrações de BAP sobre a presença de calos em propágulos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. após 75 dias de cultivo <i>in vitro</i>	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo estatístico das análises da influência dos tratamentos sobre o Comprimento da Raiz, Comprimento da Parte Aérea, Número Folhas, Número Raízes, Sementes germinadas (%), Sementes contaminadas (%) e o IVG para <i>Dimorphandra mollis</i> Benth	25
Tabela 2- Valores médios para as variáveis: Comprimento da Raiz (CR), Comprimento da Parte Aérea (CPA), Número de Folhas (NF), Número de Raízes (NR), Sementes germinadas (%), Sementes contaminadas (%) e o IVG. para sementes de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. submetidas a diferentes agentes desinfestantes.....	26
Tabela 3- Análise de variância para as características Número de brotos (NB), Número de folhas (NF) e Comprimento da parte aérea (CPA) de propágulos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. cultivadas em diferentes concentrações de BAP (mgL ⁻¹)	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB – Ácido indolbutírico

BAP - 6 – benzilaminopurina

BOD - Biochemical Oxygen Demand

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MMA - Ministério do Meio Ambiente

MS – Murashige e Skoog

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Bioma Cerrado	13
2.2 Plantas Medicinais	14
2.3 <i>Dimorphandra mollis</i> Benth.	15
2.4 Propagação	16
2.4.1 Cultura de Tecidos	17
2.4.1.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> : Agentes desinfestantes e Tempo de imersão	18
2.4.2.1 Reguladores de Crescimento	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Local de estudo	21
3.2 Material genético	21
3.3 Obtenção dos óleos essenciais	22
3.4 Tratamentos e delineamento estatístico	22
3.5 Detalhes sobre a condução	23
3.6 Variáveis avaliadas	23
3.7 Análise estatística	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Estabelecimento da Cultura <i>in vitro</i>	24
4.2 Multiplicação e Alongamento	31
6 CONCLUSÃO	37
7 CONSIDERAÇÕES	38
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXO 1	45

1 INTRODUÇÃO

Espécie nativa do território brasileiro e considerada uma importante fonte de compostos químicos para a indústria farmacológica sendo comercializada apenas por meio do extrativismo. Essa espécie tem seus frutos coletados nas áreas de Cerrado e na grande maioria das vezes de forma desordenada. Sendo que tal atividade extrativista, pode acarretar a perda da variabilidade genética da espécie (NUNES *et al.*, 2012).

Isso se deve ao fato de ter intensificado os estudos sobre as plantas medicinais, principalmente para a compreensão de espécies que fornecem fármacos importantes para a indústria (BLANK *et al.*, 2006). Dentre as plantas medicinais estudadas pelo potencial econômico, destaca-se a *Dimorphandra mollis* Benth. Trata-se de uma espécie arbórea decídua, característica do bioma Cerrado sentido restrito, pertencente à família Fabaceae, popularmente conhecida como fava- d'anta, favela ou faveira (SOUZA *et al.*, 2016).

Devido a sua relevância medicinal e a necessidade de conservação da fava- d'anta, diversos estudos da propagação têm sido realizados, a fim de obter maior quantidade de indivíduos, homogêneos e de boa qualidade fitossanitária. Um dos setores que busca obter tal produto é a cultura de tecidos, por meio da técnica da micropropagação. Entretanto, para se micropropagar uma espécie *in vitro*, deve-se primeiro promover o estabelecimento da espécie. No entanto, a fava- d'anta, assim como a grande maioria das plantas nativas e lenhosas apresentam dificuldades ao cultivo *in vitro* (SATO *et al.*, 2001). Principalmente matrizes em estágio adulto, que além das dificuldades em respostas do propágulo vegetativo a propagação, normalmente esses explantes¹ apresentam alta contaminação por fungos e bactérias, e ainda liberação de compostos fenólicos que podem oxidar o meio nutritivo (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Para espécies nativas e lenhosas, assim como para as espécies em geral, a primeira etapa a ser considerada para a realização do ótimo estabelecimento *in vitro* é a desinfestação de explantes. A segunda etapa é a multiplicação dos propágulos, sendo esta considerada de fundamental importância para a obtenção e manutenção de um número satisfatório de plantas, as quais podem ser reintroduzidas nos seus habitats naturais ou para uso em programas de conservação *in vitro*. Diante do exposto, a presente pesquisa objetiva avaliar métodos de desinfestação de sementes para o estabelecimento *in vitro* e concentrações de regulador de crescimento vegetal para a micropropagação de fava - d'anta.

¹ Segmento de tecido ou órgão vegetal retirado do seu sítio natural e utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bioma Cerrado

O Cerrado é considerado o segundo bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional (MMA, 2017). Ocupa a totalidade do Distrito Federal, mais da metade dos estados de Goiás (97%), Maranhão (65%), Mato Grosso do Sul (61%), Minas Gerais (57%) e Tocantins (91%), além de porções de outros seis estados (IBGE, 2017). Há relatos também de ocorrência em áreas disjuntas dos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Roraima e sul do Paraná. Esse bioma é muito importante para o abastecimento hídrico do país, já que é banhado por três das maiores bacias hidrográficas brasileiras, a Bacia do Rio da Prata, São Francisco e Tocantins-Araguaia (MMA, 2017) (FIGURA 1).

Figura 1- Mapa de domínio do bioma Cerrado no Brasil



Fonte: World Wildlife Fund, 2017

Devido a sua elevada biodiversidade biológica e alto grau de endemismo, Cerrado é considerado como o primeiro bioma brasileiro a entrar na classificação de *hotspots* para a conservação de biodiversidade mundial (MMA, 2017). Dentro do Cerrado existem três centros de endemismo: Cadeia do Espinhaço, localizada em Minas Gerais e Bahia; Vão do Paraná, em Goiás e Tocantins e Vale do Araguaia, Mato Grosso, Tocantins e leste do Pará (SILVA; BATES, 2002).

O Cerrado possui vegetação muito diversificada, sendo composta por gramíneas, arbustos e predominância de espécies arbóreas, que podem formar um dossel contínuo ou descontínuo. As árvores encontram-se esparsas pelo terreno, com adaptações morfológicas e

ecofisiológicas, como cascas espessas, caules tortuosos, raízes profundas que facilitam a absorção de água presente no solo (DURIGAN *et al.*, 2011). O solo apresenta características ácidas, devido ao elevado teor de alumínio e óxidos de ferro (PINTO, 2012). Entretanto apesar da elevada biodiversidade encontrada nesse bioma, ainda é pouco o conhecimento sobre a ecologia das suas espécies (EMBRAPA, 2017).

Entre tantas espécies presentes nesse bioma, as com propriedades medicinais estão entre as mais importantes. Porém, apenas 1 % das espécies medicinais do bioma Cerrado foram estudadas (VIEIRA *et al.*, 2002 *apud* NUNES, 2010). Isto evidencia o potencial de compostos químicos que poderiam ser aproveitados pelas indústrias farmacológica e de cosméticos.

2.2 Plantas Medicinais

Desde a Antiguidade as espécies medicinais são usadas pelos povos asiáticos, e depois passaram a ser objeto de desejo dos europeus durante a Idade Média. No Brasil, os povos indígenas já utilizavam de algumas plantas nativas para alimentação e curas de enfermidades e dentre outras utilizações domésticas, antes mesmo de ser colonizado pelos portugueses, (CORRÊA JUNIOR; MING; SCHEFFER, 1994).

A procura por hábitos mais saudáveis tem aumentado a demanda por produtos naturais a base de espécies vegetais, principalmente nos países desenvolvidos e nos emergentes. Com este aumento na demanda, muitas espécies tem sido exploradas de forma desordenada. Onde o uso consciente, parte das comunidades tradicionais, devido aos aspectos culturais de cada região. Portanto, são poucas as espécies exploradas de forma sustentável (NUNES, 2010).

A busca por hábitos mais saudáveis de vida tem aumentado a procura por produtos oriundos de espécies medicinais, principalmente nos países mais desenvolvidos ou em países emergentes (SILVA; ANDRADE, 2005). Geralmente, as populações mais tradicionais valorizam mais os potenciais de utilização das espécies com propriedades medicinais, já que essas estão ligadas aos aspectos culturais de cada região (SILVA; ANDRADE, 2005; PIRES *et al.*, 2014).

Neste contexto, o Brasil encontra-se privilegiado, pela elevada diversidade da flora nativa. Por essa razão, inúmeras pesquisas são realizadas em todo o território nacional, na busca de elucidar informações sobre manejo e comercialização, tanto para exploração sustentável como para conservação de diversas espécies medicinais, visando a conservação do bioma. Destaca-se, a fava- d'anta espécie arbórea nativa do bioma, que têm sofrendo forte

pressão antrópica, especificamente diante da procura indiscriminada de seus frutos (favas), para a exploração da rotina de interesse do mercado internacional (NUNES *et al.*, 2012).

2.3 *Dimorphandra mollis* Benth.

Dimorphandra mollis Benth. (fava - d' anta) é uma espécie da família Fabaceae, leguminosa que ocorre em áreas do cerrado e semiárido (centro-oeste), norte de Minas Gerais (OLIVEIRA *et al.*, 2008). É popularmente conhecida como faveira, favela, falso- barbatimão, farinheiro, faveiro-do-cerrado, farinha e barbatimão-de-folha-miúda (ALMEIDA *et al.*, 1998; NUNES *et al.*, 2012).

A espécie é arbórea, podendo atingir até 15 metros de altura e seu tronco possui uma casaca cinza-vinho (FERRI, 1969; NUNES *et al.*, 2012). As folhas são alternas, compostas, pinadas, pecioladas e sem estípulas; as pinas possuem de 6 a 12 pares; os folíolos são ovados ou oblongos e alternos (LORENZI; MATTOS, 2002). Suas inflorescências são amarelas, do tipo espiga corimbiformes terminais) e nós superiores desfolhados, pode apresentar até 500 folhas, com cálice cupuliforme, 5 lobos arredondados, pentâmeras livres e subiguais, cinco estames e anteras rimosas. O ovário é súpero, unilocular, subséssil, com muitos óvulos parietais (CORRÊA JUNIOR; MING; SCHEFFER, 1994) (FIGURA 2).

Figura 2- Detalhes da inflorescência disposta em espigas corimbiformes da fava - d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.). (A) inflorescência com botões florais e (B)- inflorescência pós a antese



Fonte: NUNES, 2010, página 27

Esta espécie possui frutos do tipo semideiscentes a deiscentes achatados (LORENZI e MATOS, 2002), com abertura longitudinal, com grande quantidade de sementes, que tem aproximadamente 16 a 26 mm de comprimento (FERRI, 1969; ALMEIDA *et al.*, 1998) (FIGURA 3). Os frutos e sementes possuem um flavanóide conhecido como

rutina, que é utilizado pela indústria farmacológica em remédios para hipertensão arterial, prevenção de hemorroidas, auxilia na absorção de vitamina C, promove resistência dos vasos capilares, atua na oxidação de radicais livres, etc (YOKOZAWA; DONG; LEIU; SHIMIZU, 1997; PAULA *et al.*, 2007).

Figura 3- Frutos e sementes de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)



Legenda: A) Fruto verde e (B) Fruto seco

Fonte: NUNES, 2010, página 28

Essa espécie produz grande quantidade de sementes viáveis, porém com dormência tegumentar, o que dificulta a sua germinação. Sua floração ocorre somente entre os meses de outubro a fevereiro, com pico no mês de novembro e a frutificação ocorre nos meses de janeiro a julho (ALMEIDA *et al.*, 1998). Sabe-se que no Cerrado, atividades como o extrativismo, garimpo e mineração, praticadas de forma intensa e desordenada reduz a variabilidade genética da espécie, prejudica sua propagação e conseqüentemente diminui a população de indivíduos adultos (NUNES, 2010).

2.4 Propagação

Grande parte das espécies lenhosas são heterozigóticas, impostas por alogamia obrigatória para a reprodução dessas plantas, sendo a via seminal a principal forma de propagação (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). *D. mollis* produz anualmente 3.700

unidades/KG fruto, com viabilidade acima de quatro meses (LORENZI, 1992). Apesar da grande quantidade de sementes viáveis (LORENZI, 1992), suas sementes apresentam tegumento rígido, que dificulta a sua embebição e, conseqüentemente, a sua germinação, apresentando dormência física (RIZZINI, 1965 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2008).

As sementes de fava - d'anta ainda apresentam alta contaminação por microorganismos fitopatogênicos que interferem na germinação e vigor. Segundo Giuliano *et al.* (2005) depois de germinadas, a maioria das plântulas morrem precocemente. E para aumentar a viabilidade do cultivo e manutenção dessa espécie a cultura de tecidos, é uma alternativa para propagação.

Os óleos essenciais são produtos secundários presentes nas plantas, que possuem composição química variada, o que garante a espécie vantagens adaptativas (MIRANDA *et al.*, 2016). A presença diferenciada de constituintes químicos nos óleos essenciais faz com que esses apresentem diferentes finalidades, uma das mais importantes é a capacidade de reduzir a contaminação por fungos e bactérias (GUTIERREZ, BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

2.4.1 Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos promove o crescimento e desenvolvimento de células, tecidos ou órgãos vegetais em meio de cultura e sob condições controladas de temperatura e luminosidade. Tal área se tornou uma alternativa de grande interesse para o setor florestal, visando a aquisição de materiais selecionados (XAVIER; WENDLING, SILVA, 2013).

O sucesso da propagação *in vitro* requer domínio da técnica e escolha adequada do propágulo para o estabelecimento e manutenção da cultura (CARVALHO *et al.*, 2011). É interessante realçar que o propágulo² se refere a uma parte de uma planta, o qual responderá a estímulos fisiológicos e apresentará competência para produzir novas plantas, devido a totipotência (XAVIER; WENDLING, SILVA, 2013).

A cultura de tecidos apresenta inúmeras vantagens como a produção de plantas isentas de pragas e doenças, propagação clonal e maciça de espécies vegetais, controle das condições de cultivo, produção independente da época do ano, menor espaço físico para produção das mudas, conseqüentemente menos tempo gasto para produção. Além de conseguir a reprodução de espécies que naturalmente são difíceis de ser propagadas por outros métodos convencionais (CARVALHO *et al.*, 2011).

² Entre os tipos de propágulos incluem-se sementes, estacas, estruturas florais, segmentos vegetativos, gemas, bulbos e estalões, etc.

Dentre as aplicações da cultura de tecidos na área florestal tem-se a conservação de germoplasma *in vitro*; auxílio em programas de melhoramento; sementes sintéticas através da embriogênese somática; introdução de genes de interesse por meio da polinização *in vitro* (XAVIER; WENDLING, SILVA, 2013).

Dentre as diferentes técnicas aplicadas ao cultivo *in vitro*, a micropropagação ou propagação vegetativa é a mais utilizada pela rápida geração de plantas e com aplicações já comprovadas (XAVIER; WENDLING, SILVA, 2013). Atualmente a micropropagação já se encontra dentro dos programas de melhoramento florestal que buscam a maximização ou manutenção do valor genético do clone a ser propagado. O que permite acelerar os métodos convencionais de propagação já empregados. No entanto, antes de se micropropagar uma determinada espécie é necessário realizar o estabelecimento da cultura em condições *in vitro*. O sucesso no estabelecimento depende da não ocorrência de alguns eventos, tais como, oxidação e contaminação.

2.4.1.1 Estabelecimento *in vitro*: Agentes desinfestantes e Tempo de imersão

O estabelecimento *in vitro* de plantas é uma etapa importantíssima para o posterior sucesso de uma determinada técnica de cultura de tecidos a ser aplicada. No estabelecimento, o uso do álcool para quebrar a tensão superficial do material a ser inoculado, a concentração adequada de um desinfestante, agente responsável pela remoção de contaminantes na superfície do material, seja o hipoclorito de sódio, água oxigenada, cloreto de mercúrio ou bicloreto de mercúrio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e outros agentes alternativos como óleos essenciais (MIRANDA *et al.*, 2016). Fatores relevantes para que o estabelecimento *in vitro* promova o cultivo sem perdas por contaminação, principalmente fungos e bactérias.

A origem do local de coleta dos propágulos para obtenção dos explantes e a assepsia realizada é diretamente proporcional ao sucesso do cultivo *in vitro*. Por exemplo, material vegetal oriundo de plantas em condições de campo são suscetíveis às intempéries do ambiente e ao ataque de pragas e doenças. Tais materiais, quando coletados nessas condições, o estabelecidos *in vitro*, apresentam um maior índice de contaminação, diferente de materiais que são cultivados em condições protegidas, como casa de vegetação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Encontra-se na literatura vários procedimentos de assepsia realizados para diferentes espécies medicinais, os quais são relatados por Resende *et al.* (2015) que obteve 90% da cultura de *Lippia rotundifolia* Cham. livre de contaminação por fungos e bactérias,

por meio da utilização de álcool 70% (v/v), hipoclorito de sódio (2%) e fungicida 1,72 mM . Outro exemplo é *Lippia sidoides* Cham. com submersão em hipoclorito de sódio 0,8% e cefotaxima sódica 200 mg L⁻¹ correspondendo à redução na oxidação dos explantes e contaminação (COSTA *et al.*, 2007).

Protocolos de assepsia e estabelecimento também são encontrados para outras espécies, como relatado por Pereira *et al.* (2011) que trabalharam com a desinfestação de explantes de *Musa* sp. e observaram que com o cloro ativo na concentração de 2% não foi verificada nenhuma contaminação. Já para jabuticabeira (*Myrciaria* spp.) a utilização de hipoclorito de sódio a 5% foi satisfatória na redução da contaminação (PICOLOTTO *et al.*, 2007). Para o barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] recomenda-se a aplicação do fungicida comercial Benomyl a 2% (Castro *et al.*, 2009).

De posse do protocolo de assepsia adequado, além do e consequente estabelecimento dos explantes, é viável sua multiplicação em condições *in vitro*, ou seja, a aplicação da micropropagação (XAVIER; WENDLING, SILVA, 2013).

A micropropagação é uma técnica da cultura de tecidos que busca reproduzir plantas idênticas à planta mãe, também conhecida como propagação vegetativa *in vitro* (CARVALHO *et al.*, 2011). As fases da micropropagação incluem desde a seleção do explante que possibilita uma cultura livre de contaminantes, até a multiplicação de propágulos vegetativos, considerando todas as etapas do cultivo como: enraizamento, alongamento e aclimatização das mudas obtidas (XAVIER; WENDLING, SILVA, 2013).

Assim sendo as fases são: **Fase I-** seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento da cultura em condições *in vitro*; **Fase II-** multiplicação dos propágulos através de sucessivas subculturas em meio de cultura adequado a propagação; **Fase III-** enraizamento e alongamento dos propágulos vegetativos obtidos no estágio anterior e **Fase IV-** aclimatização das plantas obtidas na condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (XAVIER; WENDLING, SILVA, 2013).

Apesar da técnica da micropropagação apresentar elevado custo inicial, a mesma disponibiliza a produção de mudas em escala comercial, homogêneas e isentas de pragas e doenças. Características desejáveis para a indústria farmacêutica, a qual demanda quantidade de material, principalmente plantas com metabólicos secundários satisfatórios (LIMA *et al.*, 2007).

Existem diversas formas de se realizar a micropropagação, as mais usuais são proliferação e indução de gemas apicais e axilares, organogênese e embriogênese somática

(THORPE *et al.*, 1991). Para os autores Mantovani; Heinz e Vestena (2001) as plantas lenhosas são mais fáceis de serem propagadas utilizando como explantes as gemas axilares. Essa técnica envolve o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados, como gemas axilares ou apicais, que são estimulados a crescer mediante a adição de reguladores de crescimento no meio de cultura (CARVALHO *et al.*, 2011).

Para a micropropagação, os explantes a serem trabalhados devem ser de preferência mais juvenis e também responsivos aos estímulos induzidos pelos reguladores de crescimento (auxinas e citocininas), os quais são responsáveis pelo crescimento celular e divisão celular dos explantes *in vitro*. Material juvenil possui alto grau de atividade meristemática e dessa forma mais plasticidade ao cultivo *in vitro* (MURASHIGE & SKOOG, 1977).

2.4.2.1 Reguladores de Crescimento

Os reguladores de crescimento ou substâncias reguladoras de crescimento vegetal são compostos sintéticos incluídos no meio de cultura, em quantidade pequena a fim de estimular, inibir ou modificar o crescimento e desenvolvimento do explante *in vitro*. Reguladores de crescimento são adicionados ao meio com a função de induzir resposta fisiológica de acordo com o objetivo proposto, sendo bastante utilizados nos protocolos de micropropagação de diferentes espécies (CARVALHO *et al.*, 2011).

As auxinas estimulam o desenvolvimento da parte aérea através do crescimento e alongamento das células, além da indução de raízes adventícias e o controle da morfogênese na micropropagação (CARVALHO *et al.*, 2011). Para os autores Taiz e Zeiger (2004) as auxinas também promovem o crescimento de caules e coleótilos, regulam a dominância apical, retardam a abscisão foliar e regulam a formação de gemas florais e frutos. Já as citocininas são responsáveis pela quebra da dominância apical e indução das gemas axilares (NASCIMENTO; FRANCO; FRASSETTO, 2007).

A citocinina BAP (benzilaminopurina), objeto de estudo do presente trabalho atua na divisão celular e em condições *in vitro*, combinada com auxina, é responsável pela formação da parte aérea da planta e formação de brotações adventícias (LUCAS *et al.*, 2007). Além das divisões celulares, as citocininas também são importantes na morfogênese *in vitro* através da indução do caule, na expansão foliar, movimento de nutrientes, retardamento da senescência foliar, etc (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Vários trabalhos com plantas medicinais foram desenvolvidos no sentido de elucidar a influência das substâncias reguladoras de crescimento no cultivo *in vitro*. Asmar *et*

al. (2012) trabalhando com *Lippia javanica* (Burm.f.) Spreng obteve sobrevivência máxima em tratamentos onde se aplicou BAP no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), independente da concentração. No entanto, trabalhos com *Lippia alba* Kavach promoveram a regeneração de brotos apicais em meio MS com concentração de 2.0 mg L⁻¹ de BAP (GUPTA; KHANUJA; KUMAR, 2001).

De acordo com os resultados encontrados por Castro *et al.* (2009) em meios acrescidos de BAP e na ausência de luz, 25% das áreas dos explantes de *Stryphnodendron adstringens* foram cobertos por calos, sendo que na ausência de regulador de crescimento e presença de luz não houve presença de calos. Estudos realizados por Santos *et al.* (2008) verificaram que concentrações 1,78 e 3,55 µM promoveram maiores porcentagens de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti) e Cordeiro *et al.* (2007), trabalhando com paricá (*Schizolobim amazonicum* Huber ex Duck), notaram formação de calos em explantes mantidos na presença de BAP, combinado com AIB. Entretanto, os mesmos explantes cultivados apenas com AIB não formaram calos, evidenciando que a combinação de auxina/citocinina em determinada concentração favorece a formação de calos.

Tais trabalhos mostram a importância do uso adequado de reguladores de crescimento para lograr êxito na micropropagação. É importante ressaltar que o equilíbrio entre auxina e citocinina é fundamental para o sucesso da propagação das plantas, onde alta relação favorece o enraizamento, a baixa relação deste regulador, favorece a formação de brotações e o alto nível de ambas favorece o desenvolvimento de calo (QUADROS, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia/ Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), entre os meses de maio a agosto de 2017.

3.2 Material genético

Os frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. foram coletados no entorno da cidade de Montes Claros- Minas Gerais, na comunidade Planalto Rural. As sementes foram beneficiadas e armazenadas em sacos de papel Kraft em temperatura ambiente, durante aproximadamente um ano, momento da análise. As sementes foram utilizadas para o

experimento de germinação *in vitro*. Plântulas oriundas da germinação *in vitro* de *D. mollis* foram utilizadas como fonte de explante para o experimento de micropropagação.

3.3 Obtenção dos óleos essenciais

O material para obtenção dos óleos essenciais foi coletado no Horto Medicinal do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. As folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, (capim-santo); *Lippia origanoides* Kunth. (alecrim-pimenta); *Ocimum gratissimum* L. (alfavacão); *Lippia rotundifolia* Cham. (rosmaninho) tiveram suas massas frescas determinadas, sendo acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa de circulação forçada de ar à 45° C até obterem peso constante. Os óleos essenciais foram obtidos das folhas previamente secas, pela técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger por 4 a 5 horas (SANTOS *et al.*, 2004). Após extração, os óleos essenciais foram mantidos à -10°C até o momento do estudo.

3.4 Tratamentos e delineamento estatístico

Foram realizados três experimentos:

(1): Estabelecimento *in vitro* de sementes de *D. mollis* : utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo os tratamentos: óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, (capim-santo); *Lippia origanoides* Kunth. (alecrim-pimenta); *Ocimum gratissimum* L. (alfavacão); *Lippia rotundifolia* Cham. (rosmaninho) e hipoclorito de sódio como controle, concentrados a 1%, com 15 repetições, cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um explante (semente).

(2): Multiplicação e Alongamento de segmentos nodais de *D. mollis*: Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo cinco concentrações de 6- benzilaminopurina (BAP) (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mgL⁻¹), com 15 repetições, cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um explante. Adicionou-se ácido indol-3-butírico (AIB) na concentração de 0,5 mgL⁻¹, exceto no tratamento 0% de BAP.

(3): Enraizamento de segmentos nodais de *D. mollis*: Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo cinco concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mgL⁻¹), com 15 repetições, cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um explante. Adicionou-se benzilaminopurina (BAP) na concentração de 0,5 mgL⁻¹, exceto no tratamento 0 mgL⁻¹ de AIB.

3.5 Detalhes sobre a condução

(1): Estabelecimento *in vitro* de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth.: As sementes foram escarificadas com lixa, lavadas por 1 minuto em água destilada e submersas em etanol 70% (v/v) por 30 segundos. Em câmara de fluxo adicionou-se aos tratamentos 0,25 μM de Tween 20, seguida da imersão destas, por 15 minutos, nos diferentes tratamentos. Posteriormente, realizou-se a tríplice lavagem em água estéril. Após a realização dos tratamentos, as sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (TABELA 1).

(2): Multiplicação e Alongamento de segmentos nodais de *Dimorphandra mollis* Benth.: Segmentos nodais oriundos de plântulas *in vitro*, contendo um par de gemas axilares foram inoculados individualmente em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura MS, distribuídos nos diferentes tratamentos (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

(3): Enraizamento de segmentos nodais de *Dimorphandra mollis* Benth.: Segmentos nodais obtidos no experimento anterior e com brotações desenvolvidas foram inoculados individualmente em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura MS, distribuídos nos diferentes tratamentos (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Em todos os experimentos, foi adicionado ao meio de cultura 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ e 1,05 atm, durante 20 minutos. A fim de controlar a oxidação de compostos fenólicos, foi adicionado ao meio de cultura 1 g L⁻¹ de polivinilpolipirrolidona (PVP). A cultura foi mantida em câmara de germinação tipo BOD com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

3.6 Variáveis avaliadas

Para o experimento (1) as avaliações foram realizadas com base nas seguintes características: porcentagem de germinação, considerando-se germinada a semente que apresentava a radícula protundida. O índice de velocidade de germinação (IVG), adaptado da fórmula de Maguire (1962), sendo: $\text{IVG} = (G1 / N1) + (G2 / N2) + \dots + (Gn / Nn)$, onde: G1 = número de sementes germinadas na primeira contagem; N1 = número de dias decorridos até a primeira contagem; G2 = número de sementes germinadas na segunda contagem; N2 = número de dias decorridos até a segunda contagem; n = última contagem. Após 21 dias da inoculação avaliou-se as características: porcentagem de contaminação e oxidação e ao final de

30 dias: comprimento da parte aérea (por meio de régua milimetrada), número de brotos e número de raízes (por contagem direta).

Para o experimento (2) e (3) foram realizadas as avaliações aos 45 e 75 dias, com base nas seguintes características: número de brotos, número de folhas por brotos, comprimento da parte aérea, presença e ausência de raízes, presença e ausência de calos.

3.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade e ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. As médias de fator quantitativo foram comparadas por regressão polinomial, e as de fator qualitativo, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Com a relação à presença e ausência de calos e raízes foi utilizada a regressão PROBIT, essa análise de regressão é usada quando se tem um conjunto de dados, onde a variável dependente é avaliada nas unidades sim ou não, morreu ou não morreu (UFV, 2017). O programa utilizado para as análises estatísticas foi o software R®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento da Cultura *in vitro*

Os resultados obtidos, observou-se que a oxidação foi controlada com o uso de PVP, não foi verificado o escurecimento do meio de cultura nem do explante, ou seja, não houve ação das polifenóis oxidases durante a germinação. Tal observação é explicada por Resende *et al.* (2015) que reportam que o antioxidante PVP é um polímero amorfo usado para reduzir os efeitos tóxicos de compostos fenólicos, mas que não possui atividade fisiológica sobre as células. Na literatura encontram-se estudos com plantas medicinais, um exemplo é encontrado com *Lippia sidoides* Cham. onde verificaram uma baixa oxidação usando uma concentração de PVP de 0,5 gL⁻¹ (COSTA *et al.* 2007) e para *Lippia rotundifolia* Cham. o uso de 1,0 gL⁻¹ foi suficiente para controlar a oxidação do meio (RESENDE *et al.*, 2015).

Na Tabela 2 estão dispostos os resultados da influência dos tratamentos com os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (capim-santo), *Lippia origanoides* Kunth.(alecrim-pimenta), *Ocimum gratissimum* L. (alfavacão), *Lippia rotundifolia* Cham. (rosmaninho) e hipoclorito de sódio em relação às variáveis analisadas neste estudo.

Tabela 1- Resumo estatístico das análises da influência dos tratamentos sobre o Comprimento da Raiz, Comprimento da Parte Aérea, Número Folhas, Número Raízes, Sementes germinadas (%), Sementes contaminadas (%) e o IVG para *Dimorphandra mollis* Benth

Variável resposta	QM	F	p-valor
Comprimento da Raiz	31,351	5,593	0,0007*
Comprimento da Parte Aérea	35,529	8,612	0,0000*
Número Folhas	4,267	3,356	0,0158*
Número Raízes	45,233	4,959	0,0017*
Sementes germinadas (%)	1,433	8,759	0,0000*
Sementes contaminadas (%)	2,058	17,417	0,0000*
IVG	0,0719	1,009	0,0000*

Fonte: Da autora, 2017

Observou-se que houve diferença significativa para todas as variáveis analisadas no presente estudo, ou seja, os tratamentos aplicados corresponderam às expectativas do estudo, apresentando diferenças entre si. Os tratamentos desinfestantes com óleos essenciais e hipoclorito de sódio influenciaram na germinação das sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. e conseqüentemente no crescimento e desenvolvimento das plântulas. Os agentes desinfestantes promoveram a remoção de microrganismos indesejáveis presentes na superfície do explante, viabilizando assim o cultivo livre de contaminantes. É importante ressaltar que a ausência do desinfestante aumenta a possibilidade das culturas serem contaminadas por microrganismos indesejáveis (CARVALHO *et al.*, 2011). Pode-se dizer que os produtos utilizados mostraram ser eficientes na inativação ou redução do número de microrganismos e conforme informações obtidas na literatura, tais produtos apresentam ação germicida (CARVALHO *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2016).

A seguir são apresentados os valores médios para as variáveis do estudo (TABELA 3):

Tabela 2- Valores médios para as variáveis: Comprimento da Raiz (CR), Comprimento da Parte Aérea (CPA), Número de Folhas (NF), Número de Raízes (NR), Sementes germinadas (%), Sementes contaminadas (%) e o IVG. para sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. submetidas a diferentes agentes desinfestantes

TRATAMENTO	CR	CPA	NF	NR	Germinadas (%)	Contaminadas (%)	IVG
Óleo Rosmaninho	0,000 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,000 c	91,667 ab	0,000 e
Óleo Alfavacão	0,767 bc	0,925 c	0,166 b	0,333 b	25,000 bc	100,000 a	0,670 a
Óleo Alecrim-pimenta	1,550 bc	1,075 bc	0,250 ab	1,167 b	41,667 bc	58,333 bc	0,600 b
Hipoclorito	3,100 ab	3,308 ab	0,500 ab	2,167 ab	58,333 ab	0,000 d	0,0570 c
Óleo Capim Santo	3,900 a	4,050 a	1,500 a	4,833 a	91,667 a	33,333 cd	0,450 d

Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si estatisticamente, pela análise estatística a 5% de significância

Fonte: Da autora, 2017

As sementes que foram desinfestadas com hipoclorito de sódio, capim santo e alecrim-pimenta apresentaram respostas satisfatórias para as variáveis analisadas, observando valores superiores aos demais tratamentos. Resultados inferiores foram encontrados quando as sementes foram sanitizadas com óleo essencial de rosmaninho, podendo observar um índice de contaminação próximo a 100%, provavelmente devido à alelopatia, efeito prejudicial, direto ou indireto, de uma planta sobre outra pela produção de compostos químicos que são liberados no meio (RICE, 1974). Os resultados revelam que o hipoclorito de sódio, agente já consolidado na cultura de tecidos, é um excelente agente desinfestante, pois no quesito contaminação, o mesmo foi o mais eficiente, não se observando presença de contaminação, diferentemente dos demais tratamentos. No entanto, para as demais características, o uso do capim santo foi sem dúvida o mais interessante, correspondendo a médias superiores aos demais.

Durante o experimento notou-se que as plantas que tiveram boa assepsia se desenvolveram mais que as demais, bem como a germinação que teve início com as sementes bem assépticas. Segundo Carvalho *et al.* (2011) os agentes desinfestantes são capazes de eliminar ou inibir a proliferação de microrganismos na superfície dos explantes. Para Pinheiro *et al.* (2016) a boa assepsia proporciona melhores desempenhos na germinação e diminuição da contaminação. Este autor afirma também que, existe uma carência de métodos de assepsia

para testes de germinação para espécies florestais nativas, exceto para as espécies que estão prevista em lei federal 3.123 de 2015, conforme Instrução Normativa nº 44, de 23 de dezembro de 2010 (BRASIL, 2010) que trata de oficializar os métodos para testes de germinação de sementes de *Astronium fraxinifolium*, *Ceiba speciosa*, *Cybistax antisyphilitica*, *Enterolobium contortisiliquum*, entre outras espécies nativas. De acordo com a legislação as sementes devem ser imersas em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% (20% da solução comercial com 2,5% de princípio ativo) por 2/ 5 minutos e depois lavá-las em água corrente.

Segundo Rocha (2005) *apud* Souza *et al.* (2011) o hipoclorito de sódio é um potente oxidante, as suas propriedades modificam as membranas celulares do tegumento da semente e, ou, influencia na disponibilidade de oxigênio adicional, o que proporciona aumento da taxa germinativa. Também o vigor das plântulas formadas é influenciado pelo tipo de assepsia aplicada, se esta for bem realizada as plantas tendem a apresentar maior crescimento e desenvolvimento, como foi observado durante a condução do experimento.

A ação germicida dos óleos essenciais é explicada por alguns autores como Shankar e Karuppayil (2014) que afirmam que a espécie *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. possui atividade antibacteriana em relação a bactérias Gram positivas e Gram negativas, e também antifúngica. Sua atividade antibacteriana e antifúngica tem sido remetida a presença dos compostos químicos citral, geraniol e mirceno (MIRGHANI; LIYANA; PARVEEN, 2012). Quando o agente desinfestante tem ação germicida sobre as bactérias e fungos, estes não se desenvolvem no meio de cultura, e desta forma, não competem com a plântula pelo meio e nem interfere negativamente em seu crescimento.

Para comprimento da raiz, comprimento da parte aérea e número de raízes observa-se que a aplicação do óleo essencial de capim santo correspondeu a resultados superiores, ou seja, melhor desenvolvimento e crescimento da plântula, mostrando que a utilização do óleo de capim santo foi eficiente e semelhante para todas as características analisadas. Verifica-se que o óleo essencial de rosmaminho não foi eficiente, pois não se observou um comportamento satisfatório.

Ressalta-se que o óleo essencial de capim santo mesmo apresentando baixa taxa de contaminação (TABELA 3) apresentou resultados interessantes para crescimento e desenvolvimento das plântulas. Os contaminantes podem estar presentes em duas formas no material biológico: 1) microrganismos que colonizam a superfície ou o interior do explante e

2) microrganismos introduzidos na manipulação no laboratório (DEBERGH; ZIMMERMAN, 1991 *apud* MALDONADO, 2014). O índice de contaminação foi baixo com a utilização do óleo de capim santo e a ação deste possivelmente influenciou uma das formas de ocorrência dos patógenos, ou seja, limitou a ocorrência do contaminante no material *in vitro*. Contrapondo tais resultados, o óleo essencial de rosmaninho não apresentou boa ação germicida, pois verificou-se a presença de patógenos, os quais provavelmente inibiram a germinação e posterior desenvolvimento das plântulas.

Pinheiro *et al.* (2016) trabalhando com *Bauhinia forficata* obteve maior comprimento das plântulas utilizando como agente desinfestante o NaClO a 2% por 1 min, o mesmo autor trabalhando com *Cedrela fissilis* observou maior comprimento da parte aérea utilizando NaClO 1% por 3 min. O uso de um bom agente desinfestante promove o maior desenvolvimento da plântula, conseqüentemente maior crescimento da parte aérea, maior número de raízes e maiores tamanhos de raízes. Nascimento; Franco; Frassetto (2007) estudando a espécie *Parapiptadenia rigida* Benth (Brenan) da família Leguminosae – Mimosoideae, observaram que sementes desinfestadas com 2,5 e 5,0 % de hipoclorito de sódio durante 30 e 15 minutos, respectivamente, apresentaram maior porcentagem de germinação e forneceram as menores porcentagens de contaminação fúngica e/ou bacteriana.

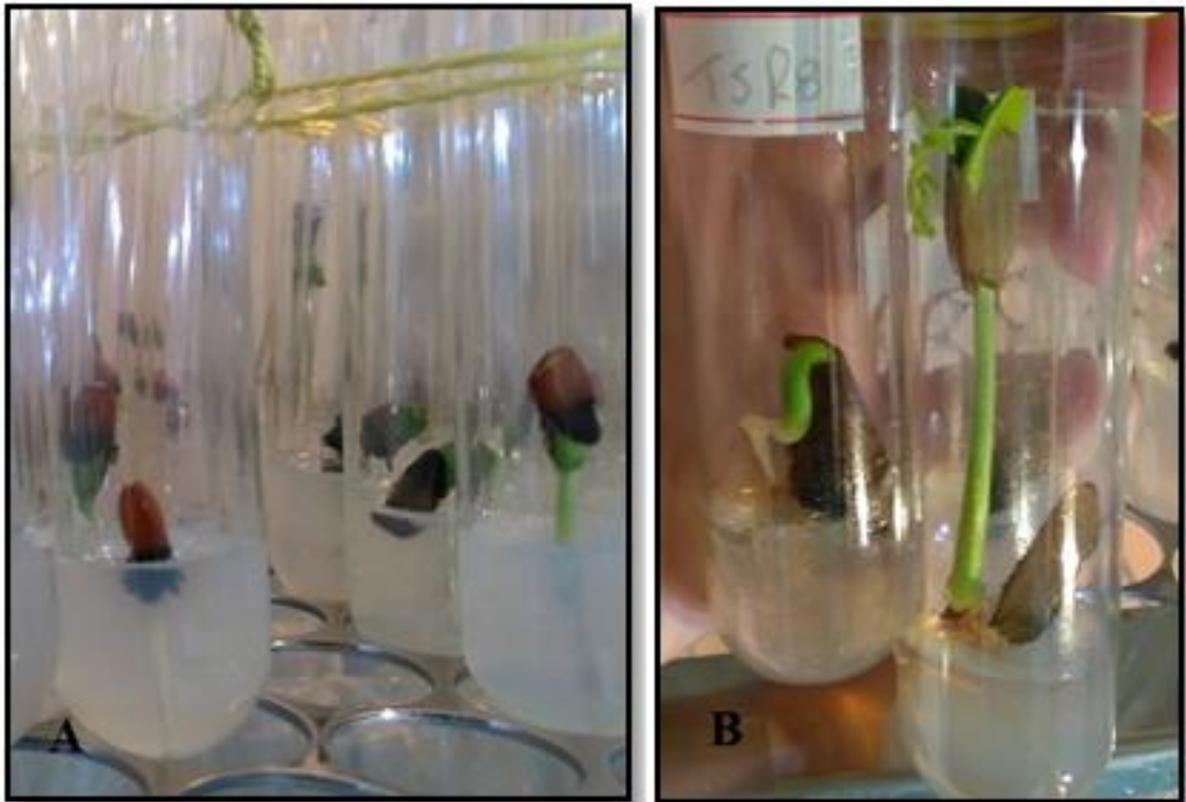
Para número de folhas observou-se também resultado semelhante às demais características apresentadas acima. Novamente o óleo de capim santo proporcionou resposta fisiológica mais satisfatória quando em comparação com o hipoclorito de sódio. Pode se inferir que um bom tratamento de assepsia, com um agente desinfestante adequado, resulta em adequado estabelecimento da espécie *in vitro* e garante o cultivo asséptico das espécies, durante as fases *in vitro*.

As sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. iniciaram a germinação *in vitro* após 7 dias de inoculação (FIGURA 4), sendo que aos 21 dias (FIGURA 5) apresentaram a maior porcentagem de germinação (91,67%), resultado observado no tratamento com óleo de *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecido como capim santo. É importante ressaltar que as sementes usadas no presente estudo, foram coletadas do chão, já que existe alguns trabalhos que correlacionam o tipo de coleta com o potencial germinativo da espécie.

Porcentagens semelhantes de germinação foram obtidas por Araújo *et al.* (2009), no qual relata que a germinação de fava d'anta, em condições *ex vitro* foi de (56,67%) para

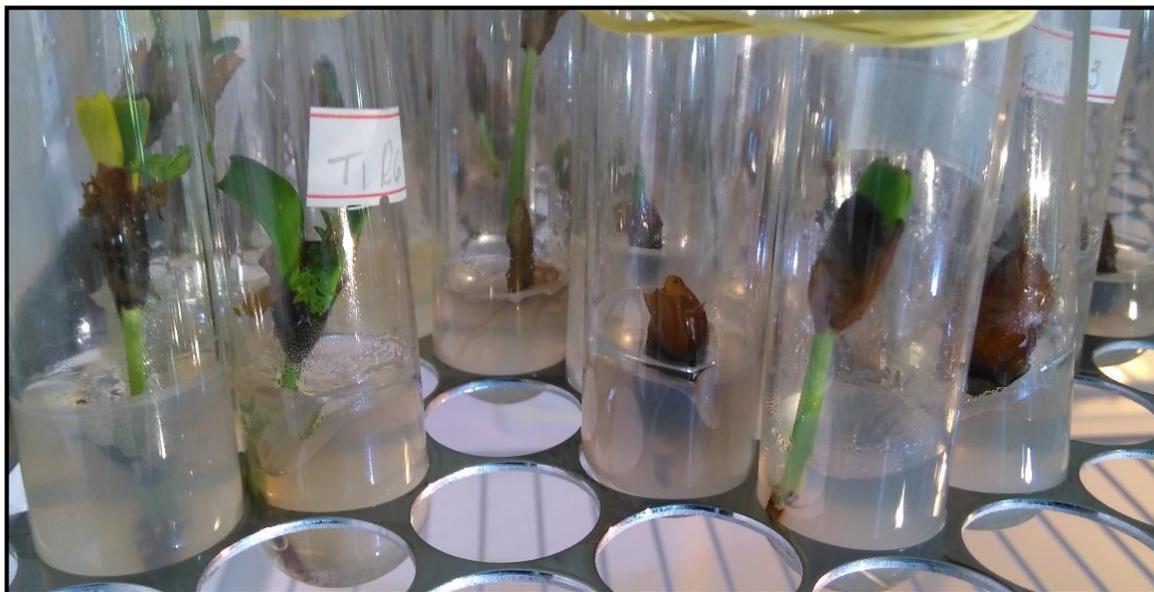
sementes coletadas no chão e de (85,93%) para sementes coletadas na planta. Em condições diferentes das apresentadas no trabalho, porém com a mesma espécie, Souza *et al.* (2016) trabalhando com diferentes solos e adubações, reportaram emergência variada de acordo com as características naturais de cada tratamento utilizado, solo local de cerrado (66%); solo argiloso (38%); esterco bovino (47%); adubação fosfatada (61%); esterco bovino+ adubação fosfatada (57%).

Figura 4- Germinação *in vitro* de *Dimorphandra mollis* Benth



Legenda: (A) Início da germinação. e (B) Desenvolvimento das plântulas

Figura 5- Plântulas de *Dimorphandra mollis* Benth. com 21 dias de estabelecimento *in vitro*



A maioria dos óleos essenciais utilizados no presente estudo não demonstraram efeito desinfestante desejado, uma vez que a contaminação foi alta. Observa-se pelo gráfico que a utilização do óleo de alfavacão foi totalmente ineficiente correspondendo a (100%) de contaminação da cultura *in vitro*, semelhante ao uso do óleo de rosmaninho. Resultado satisfatório foi verificado com óleo essencial de capim santo e hipoclorito de sódio que apresentaram as menores médias de contaminação.

Pode-se identificar que aos 21 dias após o estabelecimento, as sementes que receberam o tratamento com hipoclorito de sódio não apresentaram contaminação e o tratamento com óleo essencial de capim-santo também revelou resultado satisfatório, ou seja, a porcentagem de contaminação foi relativamente baixa (33%). No entanto, os óleos rosmaninho, alecrim pimenta e alfavacão demonstraram ser inferiores e não corresponderam ao resultado esperado, não se caracterizaram como bons agentes de desinfestação.

A ação germicida do cloro não é bem esclarecida, contudo, algumas hipóteses sugerem que há uma combinação com proteínas da membrana celular dos microrganismos, que formam compostos tóxicos, levando a inibição das enzimas essenciais (DONINI *et al.*, 2005). Picolotto *et al.* (2007) ao estudarem a jabuticabeira (*Myrciaria* spp.) observaram que o hipoclorito de sódio a 5% tem boa eficiência como desinfestante na remoção de contaminantes fúngicos, proporcionando redução nas taxas de contaminação.

Em relação ao IVG observa-se que a maior velocidade de germinação foi

verificada na desinfestação com óleo essencial de alfavacão, em média 0,67. Este também apresentou a maior porcentagem de contaminação, seguido pelo rosmaninho. O rosmaninho apresentou IVG igual a zero, uma vez que, as sementes não germinaram. Segundo o autor Scalon *et al.* (2007) trabalhando com a mesma espécie em diferentes ambientes de incubação, observaram que o IVG correspondeu a 1,22 a 25°C; 0,31 a 20/30°C e 1,33 para casa de vegetação. Percebe-se que houve variação na porcentagem de germinação, os autores explicam que as sementes de fava d'anta perdem seu poder germinativo durante o armazenamento. Neste caso, as sementes utilizadas no presente trabalho se encontravam armazenadas a mais de um ano, isso explica o resultado baixo encontrado para índice de velocidade de germinação.

Em condições diferentes da apresentada no trabalho, Masetto *et al.* (2014) encontraram em seu estudo com salinidade e condicionamento osmótico sobre a germinação de *Dimorphandra mollis* Benth. IVG variando de 0,2 a 2,9 quando submetido a estresse salino com NaCl e CaCl₂ e para condicionamento osmótico entre 3,9 a 7,8, nesse último caso a germinação teve início em média 12 dias após a inoculação, enquanto que no presente estudo as sementes iniciaram a germinação com 7 dias.

4.2 Multiplicação e Alongamento

Para as diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) observou-se significância para número de folhas e comprimento da parte aérea aos 45 e 75 dias, respectivamente. Já para número de brotos não foram verificadas diferenças significativas (TABELA 4). É interessante ressaltar que houve emissão de brotos até no tratamento com ausência de regulador de crescimento, isso provavelmente se deve à presença de hormônio vegetal endógeno presente em pequena quantidade nas plantas. O BAP é uma citocinina sintética rotineiramente utilizada para a multiplicação de brotações. Sabe-se que as citocininas isoladamente ou em combinação com auxina, promovem a divisão celular e o desenvolvimento da parte aérea (CARVALHO *et al.*, 2011).

No presente trabalho, pode-se observar que as concentrações utilizadas não foram satisfatórias para a variável número de brotos, provavelmente, o uso da citocinina exógena não foi adequado para promover resposta fisiológica significativa.

Tabela 3- Análise de variância para as características Número de brotos (NB), Número de folhas (NF) e Comprimento da parte aérea (CPA) de propágulos de *Dimorphandra mollis* Benth. cultivadas em diferentes concentrações de BAP (mgL⁻¹)

Fonte de Variação	NB (Pr > Fc)		NF (Pr > Fc)		CPA (Pr > Fc)	
	45	75	45	75	45	75
BAP	0,078957ns	0,059062ns	0,053436ns	0,035185*	0,031124*	0,070361ns
CV (%)	55,02%	78,39%	98,11%	97,49%	70,74%	77,96%

Fonte: Da autora, 2017

Dentre todas as concentrações de BAP testadas, verificou-se que, para o número médio de brotos, o tratamento em que se utilizou 1,0 mgL⁻¹ de regulador foi o melhor para a espécie, produzindo pelo menos uma brotação por explante (dados não informados). Resultado semelhante foi observado por Nascimento *et al.* (2008) que também não encontraram diferenças significativas para número médio de brotos nas concentrações de BAP de (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), porém observaram que a concentração de 1,0mg L⁻¹ foi a mais eficiente, proporcionando em média duas brotações por explante. No presente trabalho observou-se o surgimento de calos em todos os tratamentos, independentemente da concentração de BAP utilizada, porém, não foi possível determinar com exatidão o dia.

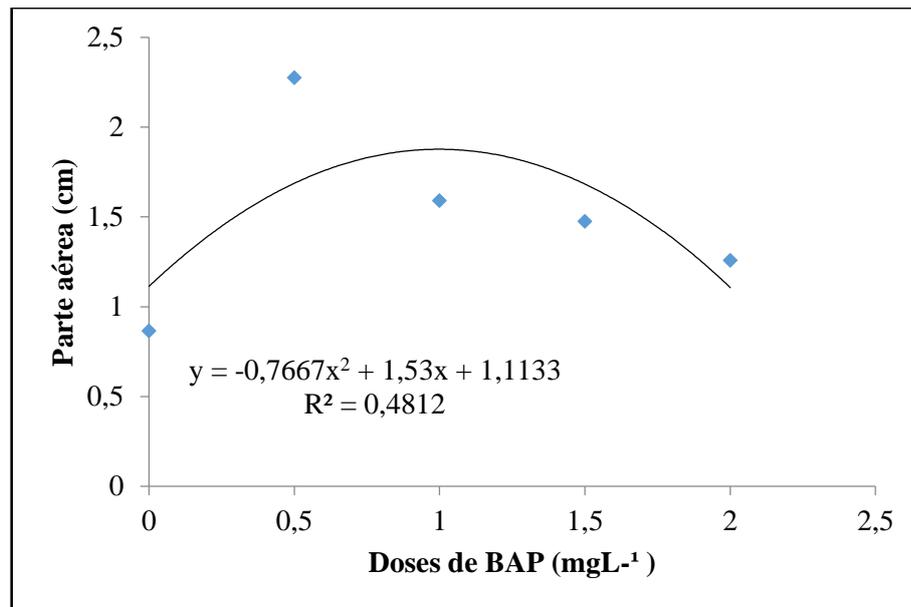
Contudo, aos 75 dias não foi verificada diferença estatística entre os tratamentos, mas mesmo assim, a concentração de 0,50 mgL⁻¹ foi superior aos demais tratamentos, apresentando parte aérea com média de 2,7cm de comprimento.

Para a variável comprimento da parte aérea foi verificada diferença significativa entre as avaliações, podendo ser observado pelo Gráfico (1) que a aplicação de 1,0 mgL⁻¹, proporcionou resposta favorável para a variável avaliada e a partir desse ponto da curva, concentrações mais elevadas de BAP não corresponderam ao esperado, havendo diminuição do comprimento da parte aérea. A aplicação exógena do regulador de crescimento BAP induz o explante à resposta fisiológica, nesse caso, crescimento da parte aérea, porém, essa resposta dependerá de vários fatores, tais como, tipo e idade do explante, meio de cultura, concentração do regulador de crescimento e condições de cultivo.

Respostas similares foram também observadas pelos autores Costa (2016) e Vicente, Almeida; Carvalho (2009), trabalhando com *Conobea scoparioides* Benth (patanqueira) e *Vernonia condensata* Baker (alumã), nas concentrações de 1 (mgL⁻¹). Segundo Grattapaglia e

Machado (1998) *apud* Vicente; Almeida e Carvalho (2009), as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas das brotações até determinada concentração, a partir de 1 (mgL⁻¹) ocorre diminuição da altura em virtude do possível efeito fitotóxico da citocinina.

Gráfico 1- Efeito de concentrações de BAP sobre o comprimento da parte aérea de propágulos de *Dimorphandra mollis* Benth. após 45 dias de cultivo *in vitro*

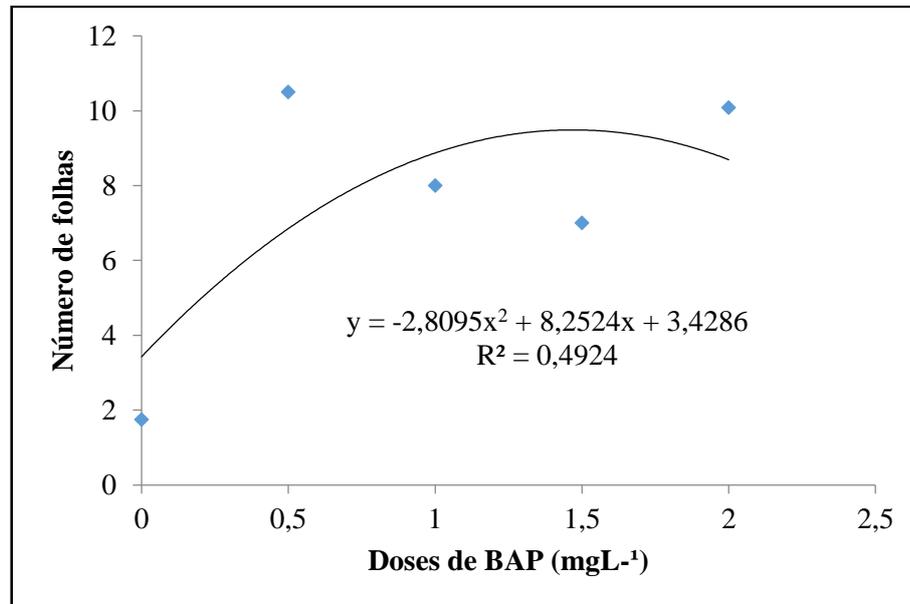


A maior quantidade de folhas apresentada pelo Gráfico (2) foi verificada no tratamento contendo 1,0 mgL⁻¹ de BAP. A primeira avaliação aos 45 dias não teve diferenças significativas entre os tratamentos, o número médio de folhas foi de 7,6. Já na segunda avaliação que ocorreu aos 75 dias, observaram-se diferenças significativas entre as concentrações da citocinina, em média 10,5 folhas por explante. Verificou-se que a concentração de 1,0 mgL⁻¹ proporcionou quantidade superior de folhas (GRÁFICO 2). Também é possível observar que concentrações superiores não foram satisfatórias para número de folhas.

As citocininas são responsáveis pela síntese de proteína, e conseqüentemente promovem a divisão celular, por isso doses crescentes de BAP até a concentração ótima, tem a capacidade de apresentar mais folhas, mas ao mesmo tempo em concentrações muito elevadas e dependendo da condição de cultivo, as citocininas podem promover a inibição das mesmas, o que pode ser visto no presente trabalho (PASQUAL, 2001). Resultado similar foi encontrado por Cantagallo *et al.* (2005), que notaram que brotações de citrumelo 'Swingle' provenientes de meio de cultura com concentrações abaixo de 1,0 mgL⁻¹ de BAP apresentaram desenvolvimento vegetativo superior. Diferindo dos resultados encontrados por

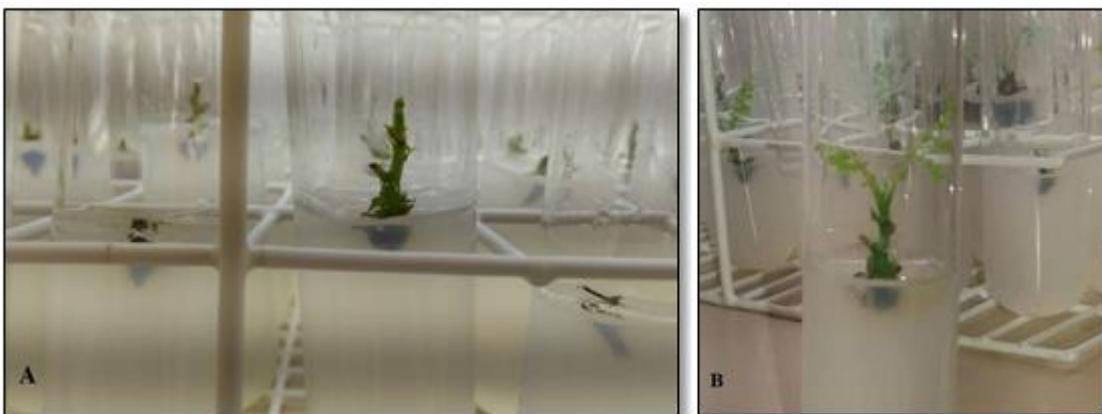
Freitas *et al.* (2016) com a espécie anador (*Justicia pectoralis*), que ao elevar as concentrações da citocinina observaram aumento no número de folhas.

Gráfico 2- Efeito de concentrações de BAP sobre o número de folhas de propágulos de *Dimorphandra mollis* Benth. após 75 dias de cultivo *in vitro*



Abaixo é apresentado as plântulas com 45 dias e aos 75 dias de cultivo em meio contendo o regulador BAP (FIGURA 6).

Figura 6- Propágulos de *Dimorphandra mollis* Benth. cultivadas em meio contendo o regulador de crescimento BAP

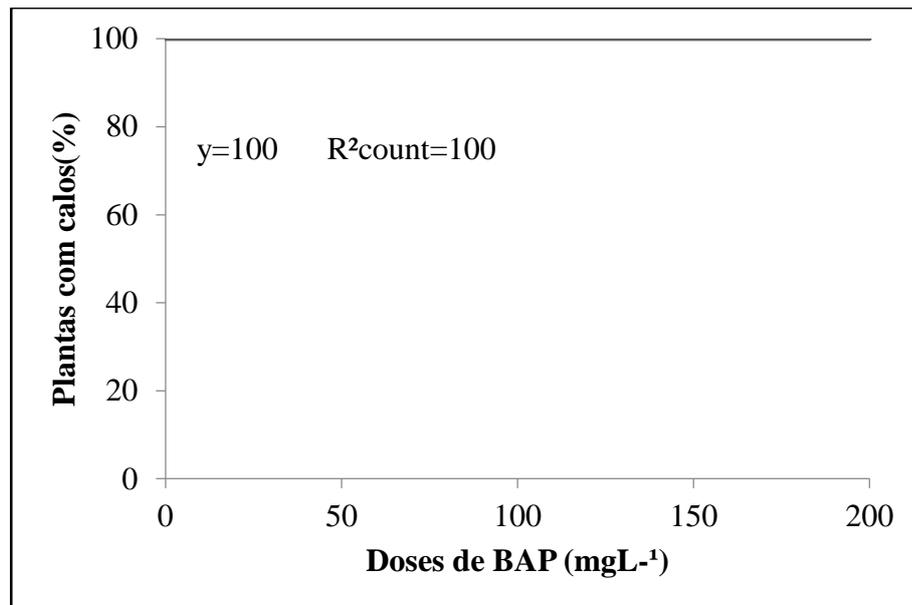


Legenda: (A) Propágulos com 45 dias e (B) Propágulos com 75 dias

Verificou-se que em ambas as avaliações não houve presença de raízes, diferentemente da presença de calos que foi verificada aos 45 e 75 dias (GRÁFICO 3 e 4) (FIGURA 7). Os calos são caracterizados como massa de células em crescimento

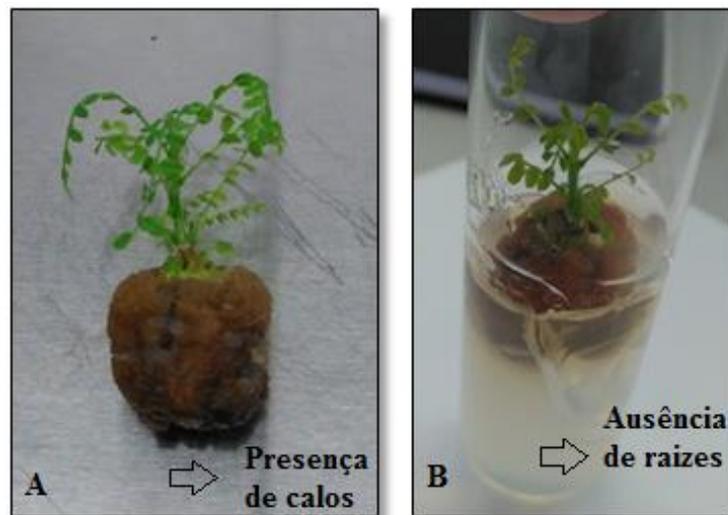
desordenado, que podem apresentar certo grau de diferenciação. Geralmente possuem tamanhos e paredes celulares variados, não prejudicam o desenvolvimento das plantas, pelo contrário as protegem formando tecido protetor (CARVALHO *et al.*, 2011).

Gráfico 3- Efeito de concentrações de BAP sobre a presença de calos em propágulos de *Dimorphandra mollis* Benth. após 45 dias de cultivo *in vitro*



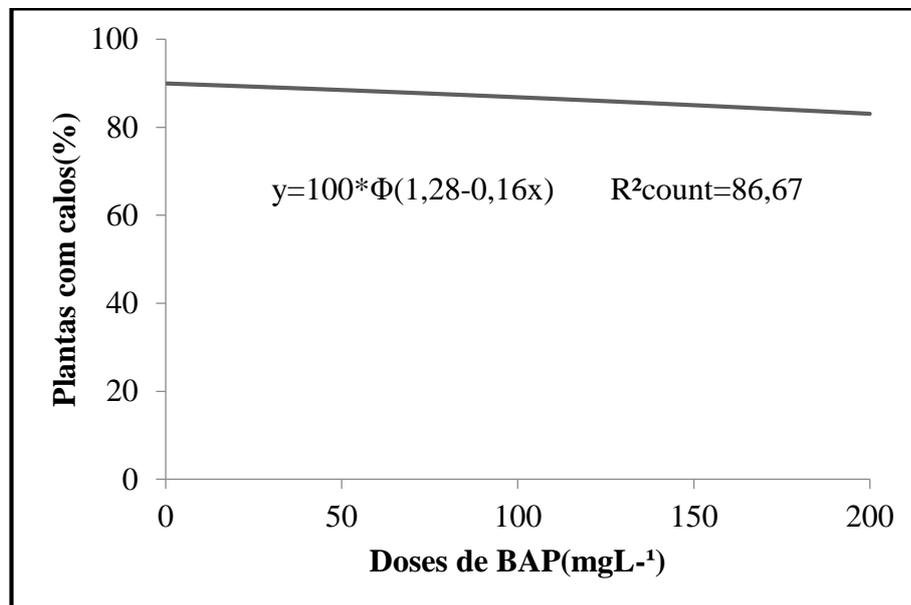
Estudos mostram que uma alta relação citocinina/auxina favorece a formação de brotações e que o inverso promove a formação de raízes, a combinação de ambos os reguladores em altas concentrações favorecem a formação de calos (HARTMANN *et al.*, 2002). No presente trabalho, o uso isolado do regulador BAP foi suficiente para o surgimento de calos na base do propágulo. Durante a multiplicação de explantes, o aparecimento de calo pode não ser um problema, desde que consiga reduzir o surgimento dos mesmos nos próximos subcultivos e que não limite o surgimento e desenvolvimento das raízes.

Figura 7- Propágulos de *Dimorphandra mollis* Benth. com 75 dias de adição de BAP no meio de cultura



Legenda: A- Presença de calos; B- Ausência de raízes

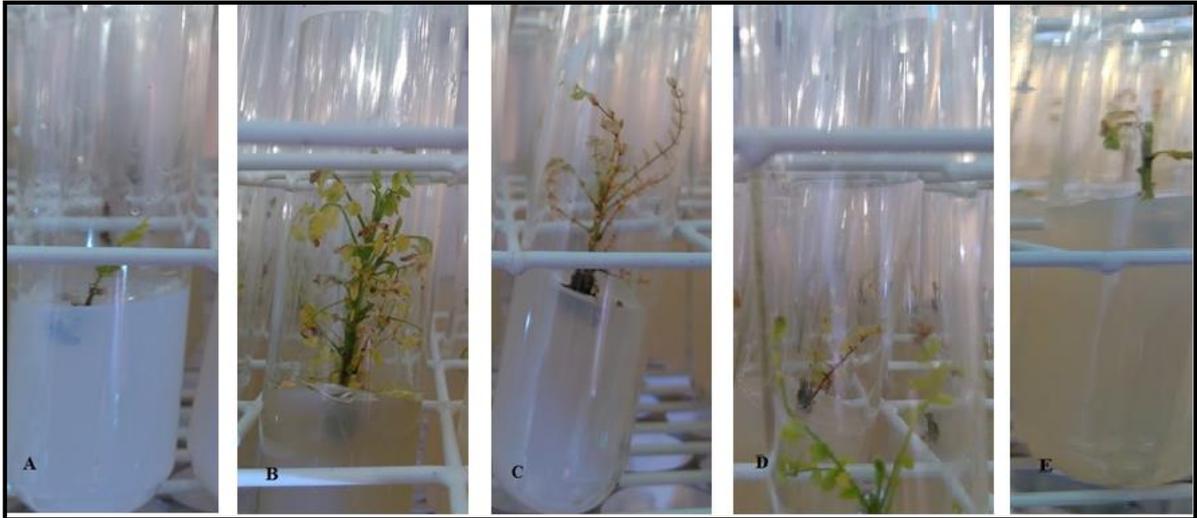
Gráfico 4- Efeito de concentrações de BAP sobre a presença de calos em propágulos de *Dimorphandra mollis* Benth. após 75 dias de cultivo *in vitro*



No que diz respeito ao enraizamento das brotações oriundas do experimento anterior, não foi verificado a emissão de raízes como mostra a Figura (8) abaixo, possivelmente devido às concentrações testadas não serem adequadas para estimular o enraizamento da espécie. Entretanto, em todos os tratamentos foi observada presença de calos, sendo que a partir do 14º dia observou-se também a ocorrência de senescência foliar. A hipótese que pode ser explicada pela alta umidade, baixa concentração de CO₂ e de O₂ e alta

concentração de gases como o etileno no interior dos recipientes de cultivo, no qual pode ter favorecido a queda precoce das folhas.

Figura 8- Propágulos de *Dimorphandra mollis* Benth. cultivadas em meio contendo o regulador de crescimento AIB



Legenda: (A) 0,0 mgL⁻¹, (B) 0,5 mgL⁻¹, (C) 1,0 mgL⁻¹, (D) 1,5 mgL⁻¹ e (E) 2,0 mgL⁻¹

Após a avaliação das condições de cultivo para o estabelecimento do protocolo de micropropagação via segmentos nodais de *Dimorphandra mollis* Benth, recomenda-se: assepsia das sementes com hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos; cultivo das sementes em luz branca (ambiente de cultivo); obtenção da plântula *in vitro* após 30 dias de cultivo; retirada do segmento nodal para iniciar a micropropagação; inoculação de segmentos nodais em meio MS, sendo 1,0 mg. L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de AIB, 30g.L⁻¹ de sacarose; 7 g.L⁻¹ de ágar e filme plástico como vedação; manter a cultura na presença de luz (ambiente de cultivo); realizar subcultivos com a mesma composição do meio de cultivo utilizado para multiplicação das brotações e realizar novos testes para promover o enraizamento das brotações obtidas.

Recomenda-se nesse caso, que novas concentrações sejam testadas para a espécie afim de estabelecer o protocolo completo e adequado para a sua micropropagação da espécie.

6 CONCLUSÃO

O capim santo é recomendado para desinfestação, pois além de controlar agentes contaminantes, promoveu a emissão de radículas.

A concentração de BAP (1,0 mg. L⁻¹) promove o surgimento de brotações em segmentos nodais de fava - d'anta e emissão foliar.

Nas condições de cultivo "*in vitro*", não foi possível estabelecer as plântulas para formação do sistema radicular.

7 CONSIDERAÇÕES

Recomenda-se realizar outros estudos, para definição das melhores concentrações de regulador de crescimento para o enraizamento, sendo possível assim propor protocolo de micropropagação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. N. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- ASMAR, S.A.; RESENDE, R.F.; ARARUNA, E.C.; MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.. Concentrações de BAP sobre a proliferação in vitro de brotos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Revista brasileira de plantas medicinais**. vol.14 no.spe Botucatu, 2012.
- ARAÚJO, A.V.; SALES, N.L.P.; FERREIRA, I.C.P.V.; BRANDÃO JUNIOR, D.; MARTINS, E.R.. Germinação, vigor e sanidade de sementes de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) obtidas de frutos coletados no solo e na planta. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, vol.11, n.º.2 Botucatu-SP, 2009.
- BLANK, A. F.; OLIVEIRA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; FAQUIN, V.. **Efeitos da adubação e da calagem na nutrição de melissa e hortelã-pimenta**. Horticultura Brasileira, v. 24, n. 2, p. 195-198, abr./ jun. 2006.
- BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 44**, de 23 de dezembro de 2010. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/INN44de23dedezembrode2010.pdf> > Acesso em 20 out. 2017.
- CANTAGALLO, F.DE S.; AZEVEDO, F.A.DE; SCHINOR, E.H.; FILHO, F.DE A.A.M.; MENDES, B.M.J.. Micropropagação de Citrumelo ‘Swingle’ pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 136-138, abril 2005.
- CARVALHO, A.C.P.P.; TORRES, A.C.; BRAGA, E.J.B.; LEMOS, E.E.P.D.; SOUZA, F.V.D.; PETTERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.7, n.1, 2011.
- CASTRO, A.H.F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.DE.; VITOR, S.M.M. Calogênese e teores de fenóis e tatinos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (mart.) coville]. **Ciências agrotécnicas** vol.33, n.º.2, Lavras –MG, 2009.
- CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162 p.
- CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; O.S.T.; REIS, L.R.S. Indução de calos in vitro de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.3, n.1, p. 35-40, 2007.
- COSTA, S.; ARRIGONI-BLANK M. F.; BLANK A. F.; MENDONÇA A. B.; AMANCIO V. F.; LEDO A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.25, n.1, p. 68-72, 2007.
- COSTA, M.P.DA.. **Protocolo de Micropropagação da *Conobea scoparioides* Benth.-Plantaginaceae**. 2016. 57 f. Tese (Agronomia/Fitotecnia), Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza- CE, 2016.

DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. **Micropropagation Technology and Application**. Dordrech: Ed. Kluwer Academic Publishers, 1991, 484p.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. 256p.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.

DURIGAN, G; MELO, A. C. G. de; MAX, J. C. M.; BOAS, O. V.; CONTIERI, W. A.; RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. 3. ed. São Paulo: SMA, 19 p, 2011.

EMBRAPA, 2017. Disponível em: <www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/abertura.html>. Acesso em: 14 abr. 2017.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil: espécies do cerrado**. São Paulo: Edgard Blücher, 1969. 239 p.

FILTER, M.; FREITAS, E.M.; PÉRICO, E.. Influência de diferentes concentrações dos fitorreguladores ácido 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na propagação vegetativa de *Malva sylvestris* L.. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Campinas, v.16, n.1, p.47-53, 2014.

FREITAS, R.M.O.; NOGUEIRA, N.W.; PRAXEDES, S.C.. Multiplicação de anador (*Justicia pectoralis*) in vitro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.11, nº 3, p. 159-163, Pombal- PB, 2016.

GIULIANO, I.; SILVA, T. G. M.; NAPOLEÃO, R.; GUTIÉRREZ, A. H.; SIQUEIRA, C. S. Identificação de fungos em sementes de *Dimorphandra mollis* e efeito de diferentes tratamentos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 93 v. 30, n. 5, p. 553, set./out. 2005.

GRATTAPAGLIA D; MACHADO M.A. Micropropagação. In: TORRES A.C; CALDAS L.S; BUSO J.A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica/Embrapa Hortaliças. p. 183-260, 1998.

GUPTA, S.K.; KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S.. Micropropagação in vitro de *Lippia alba* . **Current Science**, 81: 206-210, 2001.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, Issue 1, 10 may 2008.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, J.F.T.; GENEVE, R.L. **Plant Propagation: Principles and Pratices**. 7 th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. 880 p.

IBGE. 2017. **Área de ocupação do Cerrado**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em:

13 fev. 2017.

LIMA, C.S.M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.669-71, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, J. F. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, v.1, 1992.

LUCAS, M.A.K.; FAGUNDES, J.D.; PEREIRA, D.D.; SARMENTO, M.B.. Micropropagação de violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.): efeito da benzilaminopurina na multiplicação. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.5, p.1380-5, 2007.

MALDONADO, A.C.D. **Propagação *in vitro* da gabirobeira (*Campomanesia* spp.)**. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, 2014.

MANTOVANI, N. C.; HENZ, E.T.; VESTENA, S.. Regeneração *in vitro* de Louro-Pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, ISSN 0103-9954, 2001.

MASETTO, T.E.; SCALON, S.D.P.Q.; RESENDE, R.K.S.; OBA, G.C.; GAMBATTI, M.; PATRICIO, V.S. Germinação de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth.: efeito de salinidade e condicionamento osmótico. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 12, n. 3, p. 127-131, jul./set. 2014.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017. **O Bioma Cerrado**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acessado dia 16/08/2017.

MIRANDA, C.A.S.F.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; RODRIGUES, L.M.A.; FIGUEIREDO, A.C. S.. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento de espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, Fortaleza-Ce, jan-mar, 2016.

MIRGHANI, M.M.; LIYANA, Y.; PARVEEN, J. Bioactivity analysis of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Internacional Food Research**, v.19, n.2, p.569-575, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Um meio previsto para o crescimento rápido com culturas de tecidos de tabaco. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-479, 1962.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. Bot. Bull. **Academia Sinica**, v. 18, p.1-24, 1977.

NASCIMENTO, A.C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; PORTO, J.M.P.; NOGUEIRA, G.F.; SOARES, F.P.. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess.. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambientais**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 223-228, abril/junho, 2008.

NASCIMENTO, P.K.V.D.; FRANCO, E.T.H.; FRASSETTO, E.G.. Desinfestação e Germinação in vitro de Sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, jul. 2007.

NUNES, J.D.; NERY, P.S.; FIGUEIREDO, L.S.; COSTA, C.A.; MARTINS, E.R. O extrativismo da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) na região do Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.2, p.370-375, 2012.

NUNES, J. D. **Manejo, extrativismo e análise morfológica da fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) na região do norte de Minas Gerais.** 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

OLIVEIRA, D. A.; PAULA, M. F. B.; PIMENTA, M. A. S.; BRAGA, R. F.; FERREIRA, M. F. M.; RODRIGUES, L. A. Variabilidade genética de população de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth) da região norte do Estado de Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 355-363, mar./abr. 2008.

OLIVEIRA, D.A.D.; NUNES, Y. R. F.; ROCHA, E.A.; BRAGA, R.F.; PIMENTA, M.A.S.; VELOSO, M. D. M.. Potencial germinativo de sementes de fava-d' anta (*Dimorphandra mollis* Benth. – Fabaceae: Mimosoideae) sob diferentes procedências, datas de coleta e tratamentos de escarificação. **Revista Árvore**, vol.32, n°.6, Viçosa-MG, nov./dez. 2008.

PAULA, M.F.B.; BRAGA, R.F.; MOREIRA, P.A.; RODRIGUES L.A.; PIMENTA, M.A.S.; OLIVEIRA, D. A.. Caracterização de acessos de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) por meio de marcadores moleculares RAPD. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 282-284, jul. 2007.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura.** Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PEREIRA, G.A., CORREA, L.S., BOLIANI, A.C .. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira 'Grande naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Edição Especial: 222-226, 2011.

PICOLOTTO, L.; SHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento in vitro de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.1, p.19-23, 2007.

PINHEIRO, C.G.; LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M.F.B.; REDIN, C.G.; SANTOS, M.V. Efeito da assepsia superficial na germinação e incidência de fungos em sementes de espécies florestais. **Pesquisa florestal brasileiro**, Colombo, v. 36, n. 87, p. 253-260, jul./set. 2016.

PINTO, F. A.. **Sorção e Dessorção de Fósforo em Solos de Cerrado.** 2012. 46 f. Dissertação (Mestrado Agronomia/Produção Vegetal) – Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, 2012.

PIRES, I. F. B.; SOUZA, A.A.; FEITOSA, M.H.A.; COSTA, S.M.. **Plantas medicinais como opção terapêutica em comunidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.** Revista brasileira de plantas medicinais, vol.16, n°.2, supl.1, Botucatu-SP, 2014.

QUADROS, K.M.D.. **Propagação Vegetativa da erva- mate (*Ilex paraguariensis* Saint**

Hilaire – Aquifoliaceae). 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal, Área de concentração em Silvicultura) – Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

RESENDE, C.F.; BIANCHETTI, R.E.; OLIVEIRA, A. M. S.; BRAGA, V. F.; PEIXOTO, P. H. P.. In vitro propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. **Revista Ciências Agrônômicas**, v.46, n°3, Fortaleza- CE, julho/ setembro, 2015.

RIZZINI, C. T. Estudos preliminares sobre o xilopódio e outros órgãos tuberosos de plantas do cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.37, n.1, p.87-113, 1965. Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti) utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP. **Acta Sci. Biol. Sci.**,v.30, n° 2, p.127-131, 2008.

Rice, E.L. (1974). Allelopathy. **Academic Press**, New York, 353pp.

ROCHA, S.C. **Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SCALON, S.D.P.Q.; FILHO, H.S.; MUSSURY, R.M.; MACEDO, M.C.D.; KISSMANN, C. Potencial germinativo de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. em armazenamento, tratamentos pré-germinativos e temperatura de incubação. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 321-328, jul./set. 2007.

SANTOS, J.DA P.; DORNELLES, A.L.C.; PEREIRA, F.D.; OLIVEIRA, L.M. SATHYANARAYANA, B.N., VARGHESE, D.B. Plant Tissue Culture. **Practices and new experimental protocols.I. K. InternationalPvtLtd**. 316p. 2007.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; SOUZA, V.C. Micropropagação de *Celtis sp*: controle da contaminação e oxidação. **Cerne** 7: 117-123, 2001.

SHANKAR RAUT, J.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, n.3, p. 250-264, 2014.

SILVA, A. J. R.; ANDRADE, L. H. C. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral – Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 19, n. 1, p. 45-60, 2005.

SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **Bioscience**, Washington, DC, v. 52, n. 1, p. 225-233, 2002.

SOARES, E. P S.; SOUZA, A. P. R.; OLIVEIRA, P. C.; FLÁVIO, N. S. D. S.; AZEVEDO, D. M. Q.; SALES, N. L. P.. Fisiologia das sementes de fava d' anta (*Dimorphandra mollis* Benth) após tratamento térmico, biológico e extratos. **Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934 – Vol 6, No. 2, Dez 2011**.

SOUZA, G.A.; MARTINS, E.R. Análise de risco de erosão genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.6, n.3, p.42-47, 2004.

SOUZA, M.F.; MARTINS, E.R.; FERNANDES, L.A.; NERE, P. S.. Emergência e

desenvolvimento inicial de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. em campo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n. 1, Botucatu, janeiro/março, 2016.

SOUZA, L.D.S.D.; FIOR, C.S.; SOUZA, P.V.D.D.; SCHWARZ, S.F. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.Berg) d. Legrand. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 691-697, Setembro 2011.

SOUZA, A.S.; A. S.D.M.; FIGUEIREDO, F.J.C.; NETO, O.G.D.R. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Comunicado Técnico da EMBRAPA**, ISSN 1517-2244, Novembro, Belém-PA, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009. 848 p.

TAVARES, M. A. G. C. **Bioatividade da Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium Ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col.: Curculionidae)**. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

UFV, 2017. **Sistema para Análise Estatística**. Disponível em: <<http://arquivo.ufv.br/saeg/saeg31.htm>> .Acessado dia 05/09/2017.

VIEIRA, R. F.; SILVA, S. R. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas**. Brasília: EMBRAPA/IBAMA/CNPq, 2002. 184 p.

VICENTE, M. A. A; ALMEIDA, W. A. B; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 176-183, 2009.

WWF, 2017. **Mapa do bioma Cerrado**. Disponível em <http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_cerrado/map_a_bioma_cerrado/> .Acessado dia 21/08/2017.

YOKOZAWA, T., DONG, E., LEIU, Z. W., SHIMIZU, M..Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro. **Phytotherapy Research.**, v. 11, p. 446-450, 1997.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L.da.. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. 2º edição, Viçosa-MG, Editora UFV, 2013, 279 p.

ANEXO 1

Meio de cultura Murashige e Skoog (1962) com a formulação salina original dos respectivos sais minerais

Solução Estoque	Compostos	Concentração da solução estoque (mg L⁻¹)	Volume da solução estoque adicionada ao meio (mL L⁻¹)
Sais minerais			
A	NH ₄ NO ₃	82500	20
B	KNO ₃	95000	20
C	H ₃ BO ₃	1240	5
	KH ₂ PO ₄	34000	
	KI	166	
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	50	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	5	
D	CaCl ₂ .2H ₂ O	8800	50
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	74000	5
	MnSO ₄ .4H ₂ O	4460	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1720	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	5	
F	NaEDTA.2H ₂ O	7450	5
	FeSO ₄ .7H ₂ O	5570	
Componentes diversos			
Hexitol	Mio-inositol	100	0,1 g
Vitaminas	Tiamina	50	10
	Ác. Nicotínico	50	
	Piridoxina	50	
Aminoácido	Glicina	80	25
Carboidrato	3%		30 g
Agente gelificante	0,7%		7 g

Fonte: Murashige e Skoog (1962)